



Salud Pública de México

ISSN: 0036-3634

spm@insp.mx

Instituto Nacional de Salud Pública
México

Cruz Hernández-Hernández, Fidel de la; Rodríguez, Mario H
Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas
Salud Pública de México, vol. 51, núm. 3, 2009, pp. 424-438
Instituto Nacional de Salud Pública
Cuernavaca, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10612557008>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas

Fidel de la Cruz Hernández-Hernández, Dr en C,⁽¹⁾ Mario H Rodríguez, MC, PhD.⁽²⁾

Hernández-Hernández FC, Rodríguez MH.
Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.
Salud Pública Mex 2009;51 suppl 3:S424-S438.

Resumen

La detección de moléculas de patógenos (antígenos y material genético) y moléculas de respuesta de los hospederos ante la infección (anticuerpos) es el principio básico de las pruebas diagnósticas moleculares. Estas pruebas han hecho innecesaria la detección directa del microorganismo patógeno agresor. Los nuevos avances en biología molecular y el desarrollo de tecnología robótica y secuenciación genómica y proteica han permitido el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas altamente específicas y de gran rendimiento. La genómica y proteómica contribuyen a la identificación de biomarcadores y la biotecnología aporta métodos para producir reactivos de alta pureza. La identificación de genes codificantes de antígenos específicos, su clonación y producción recombinante y la producción de anticuerpos monoclonales, fragmentos de éstos y anticuerpos de una sola cadena han hecho posible el desarrollo de nuevas técnicas inmunológicas más seguras y de sensibilidad y especificidad elevadas. Nuevas moléculas de reconocimiento, incluidos los aptámeros, podrán pronto superar la necesidad de producir anticuerpos mediante inmunización. Para la detección de material genético se han desarrollado nuevas medidas metodológicas basadas en la hibridación y amplificación (PCR, de punto final y en tiempo real) en formatos multiplex y en microarreglos y para su detección se han diseñado moléculas reporteras que permiten su cuantificación. Aunque estos métodos requieren instrumentación compleja, puede ya anticiparse que pronto serán accesibles para su aplicación en salud pública.

Palabras clave: biotecnología; diagnóstico; enfermedades infecciosas; PCR; anticuerpos; espectrometría de masas

Hernández-Hernández FC, Rodríguez MH.
Biotechnological advances
in infectious diseases diagnosis.
Salud Pública Mex 2009;51 suppl 3:S424-S438.

Abstract

The detection of molecules of pathogens (antigens and genetic material) and host molecules in response to infections (antibodies) is the basic principle involved in molecular diagnostic tests. These tests have avoided the need to detect the attacking pathogen. New advances in molecular biology and the development of robotic technology and genomic and protein sequencing have allowed for the development of new high performance and highly specific tests. Genomics and proteomics contribute to the identification of biomarkers and biotechnology provides methods to produce high purity reagents. The identification of coding genes of specific antigens, their cloning and recombinant production, the production of monoclonal antibodies, their fragments and single chain antibodies enabled new, safer, high sensitivity and specificity immunological techniques to develop. New recognition molecules, including aptamers, will soon replace the need to produce antibodies by immunization. For the detection of genetic material, new methodological strategies based on hybridization and amplification (PCR, end point and real time) in multiplex and microarray formats have been developed, and for their detection new reporter molecules have been designed that enable their quantification. Although these methods require sophisticated instrumentation, they will soon be accessible for application in public health.

Key words: biotechnology; diagnosis; infectious diseases; PCR; antibodies; mass spectrometry

(1) Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN. Zacatenco, México DF, México.

(2) Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.

Fecha de recibido: 28 de julio de 2008 • **Fecha de aceptado:** 26 de marzo de 2009
 Solicitud de sobretiros: Dr. Mario H. Rodríguez. Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública.
 Av. Universidad 655, col. Santa María Ahuacatitlán. 62100 Cuernavaca Morelos, México.
 Correo electrónico: mhenny@correo.insp.mx

La eficacia de los métodos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas depende de su sensibilidad y especificidad para la detección inequívoca de la presencia de organismos patógenos o la respuesta específica del hospedero infectado ante su presencia. Las nuevas tecnologías basadas en la biología molecular han permitido la identificación de componentes (biomarcadores) exclusivos de los agentes infecciosos (bacterias, protozoarios, virus), moléculas que participan en la interacción de los patógenos con sus hospederos (de reconocimiento e interacción con sus células y organismos blanco, productos metabólicos y toxinas) y moléculas que producen los hospederos en respuesta a la agresión. Éstas pueden utilizarse para la detección e identificación, a nivel de grupo y especie, de los agentes agresores y son la base para el diseño de pruebas diagnósticas moleculares. Para este efecto, los nuevos desarrollos en biotecnología han posibilitado la ingeniería molecular de reactivos para pruebas que dependen de la interacción de moléculas de reconocimiento, la producción a gran escala de reactivos altamente purificados, el desarrollo de pruebas más sensibles con alta especificidad y la automatización de protocolos diagnósticos para el procesamiento simultáneo de un número grande de muestras, lo cual las hace útiles en estudios de salud pública.¹

Detección específica de moléculas mediante pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas están diseñadas para detectar antígenos circulantes de los patógenos o la presencia de anticuerpos producidos en respuesta a agentes infecciosos. Algunas de las moléculas que participan en la interacción hospedero-parásito pueden permanecer en el suero de los sujetos infectados por períodos prolongados y son detectables aun en casos en los que la infección es asintomática y después de su resolución. La detección de estas moléculas, si bien no siempre es útil para identificar infecciones activas, lo es para determinar su frecuencia y el grado de dispersión de los agentes infecciosos en la población humana.

La detección de antígenos circulantes en una persona es prueba fehaciente de una infección activa o muy reciente; la presencia de anticuerpos específicos es evidencia de que el agente microbiano se encuentra o estuvo presente en ese individuo, por lo que su reconocimiento puede servir como prueba diagnóstica de una infección aguda o reciente (IgM), o bien de una infección pasada o crónica (IgG).²

En la práctica, las mayores limitaciones para el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico por métodos inmunológicos son la producción de antígenos y anticuerpos específicos para las moléculas de interés.

La producción de proteínas y secuencias nucleotídicas por medio de técnicas de biología molecular hace posible la obtención de reactivos de alta pureza en grandes cantidades. De manera adicional, la estructura de las moléculas producida por estas técnicas puede modificarse para incrementar su reactividad. La preparación de anticuerpos específicos requiere antígenos en cantidad y pureza suficientes. Si bien los antígenos proteicos pueden obtenerse directamente del organismo que se desea detectar en la prueba diagnóstica, el uso de moléculas producidas por metodología recombinante tiene varias ventajas:³ dado que se conoce la secuencia del gen y su producto correspondiente, es posible introducir en estas secuencias modificaciones que al cambiar algún grupo químico específico facilitan su purificación, o la hacen más antigénica y por tanto más eficiente para la producción de anticuerpos específicos. Además, la producción de antígenos por medio de tecnología recombinante permite aumentar la cantidad y pureza del antígeno producido, además de acelerar y disminuir los costos de producción.^{4,5} Por otra parte, los antígenos de microorganismos peligrosos pueden producirse en organismos inocuos, con lo que se reduce el riesgo de infección durante la producción.^{5,6}

Entre las pruebas inmunológicas más utilizadas en métodos diagnósticos figuran las de hemaglutinación, inmunodifusión e inmunofluorescencia indirecta (IFI); algunas de éstas constituyen las pruebas de referencia ("estándar de oro") para la detección de agentes patógenos.⁷ En la actualidad se utilizan los métodos automatizados en cámaras de multipozos tipo ELISA y las pruebas rápidas (*rapid diagnostic tests*, RDT), en las cuales los antígenos a detectar se fijan a una tira de membrana que se sumerge directamente en los reactivos de detección (anticuerpos) y revelado, con obtención en pocos minutos de un resultado. Estas pruebas permiten procesar en forma expedita un número elevado de muestras, con buena sensibilidad y especificidad.

El análisis del desarrollo de pruebas rápidas (RDT) ejemplifica los procedimientos moleculares empleados para el diseño de nuevas técnicas inmunológicas, así como las ventajas y limitaciones de este tipo de pruebas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, incluidas malaria, SIDA y sífilis. Las RDT son tiras diagnósticas que tienen como principio la inmunoensayo para identificar antígenos o anticuerpos; un reactivo (antígeno o anticuerpo) es reconocido por otro reactivo (anticuerpo o antígeno) contenido en un líquido que migra a través del papel. El objetivo de estas pruebas es contar con instrumentos diagnósticos que sean simples, con resultados inmediatos para el diagnóstico *in situ* (junto al paciente) y, de esa manera, poder instituir tratamiento oportuno (por tal razón se conocen como pruebas de punto de atención), y al mismo tiempo

tomar decisiones acerca del control de la dispersión de los agentes patógenos.

Las tiras diagnósticas son producto de la aplicación de la biología molecular a varios niveles, la identificación de biomarcadores específicos, su clonación y producción por medio de tecnología recombinante y la producción de anticuerpos monoclonales para su captura y detección. El caso de las RDT para la detección de pacientes maláricos es un buen ejemplo. El diagnóstico de infección con el parásito de la malaria (*Plasmodium spp.*) se basa en la identificación de un biomarcador como la proteína rica en histidinas 2 (PRH2), la enzima deshidrogenasa de lactato (pLDH)

o una aldolasa parasitaria.^{8,9} Las tiras diagnósticas contienen en su extremo distal anticuerpos monoclonales que reconocen pLDH o aldolasa, comunes entre las especies del parásito, pero todas contienen anticuerpos específicos contra *P. falciparum*, de tal modo que pueden servir para establecer diagnósticos diferenciales o de infecciones mixtas.

Para el diagnóstico se coloca en el extremo proximal de la tira la muestra sanguínea, junto con un amortiguador de lisis celular que contiene además un anticuerpo marcado con un colorante. La migración del líquido pone en contacto a los tres reactivos y la fijación en una banda del anticuerpo marcado¹⁰ (figura 1). La presencia

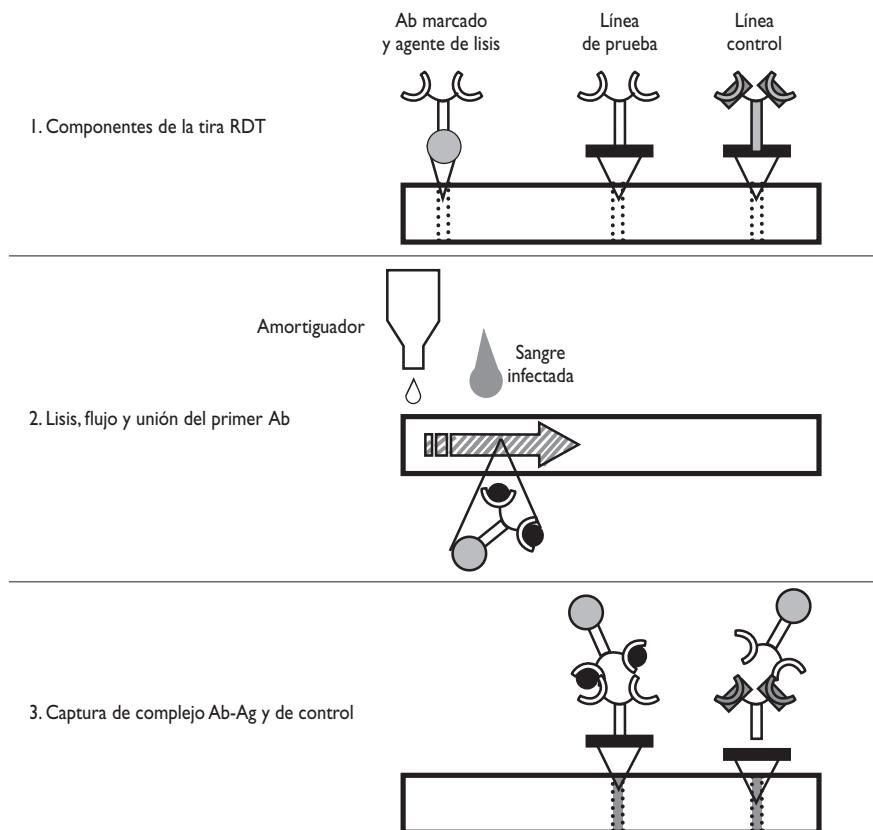


FIGURA 1. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS RÁPIDAS (RAPID DIAGNOSTIC TEST, RDT). 1. SOBRE UNA MEMBRANA POROSA SE TRAZAN TRES LÍNEAS; EN LA PRIMERA SE FIJA UN ANTICUERPO (Ab) DIRIGIDO CONTRA EL ANTÍGENO BLANCO DEL PARÁSITO (Ag) Y SE MARCA CON UNA ENZIMA; EN LA SEGUNDA, LLAMADA DE PRUEBA, SE FIJA UN ANTICUERPO DIRIGIDO CONTRA EL ANTÍGENO BLANCO DEL PARÁSITO Y EN LA TERCERA, O CONTROL, SE FIJA TAMBÍEN UN ANTICUERPO DIRIGIDO CONTRA EL ANTICUERPO MARCADO. 2. EL EXTREMO DE LA TIRA SE HIDRATA CON UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA QUE FLUYE A LO LARGO DEL SISTEMA, EL AGENTE DE LISIS SOLUBILIZA Y LIBERA LOS Ag Y EL Ab MARCADO, LO CUAL HACE POSIBLE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS QUE SON ARRASTRADOS A LO LARGO DE LA TIRA. 3. LOS COMPLEJOS Ab-Ag SON CAPTURADOS EN LA LÍNEA DE PRUEBA Y LOS ANTICUERPOS LIBRES EN LA LÍNEA CONTROL. EN PRESENCIA DE UN CROMÓGENO, SUSTRATO DE LA ENZIMA UNIDA AL ANTICUERPO, SE DESARROLLAN LÍNEAS QUE REPORTAN EL RECONOCIMIENTO DEL ANTICUERPO. LA LÍNEA CONTROL DEBE EMITIR SEÑAL SIEMPRE PARA GARANTIZAR LA INTEGRIDAD DE LOS REACTIVOS. LA SEÑAL EN LA LÍNEA DE PRUEBA INDICA LA PRESENCIA DEL PARÁSITO

de pLDH o aldolasa en la muestra sanguínea indica infección activa, pero la PRH2 persiste en circulación hasta por 14 días después del tratamiento, por lo que en ese caso puede tratarse de una infección resuelta o persistente. La sensibilidad de la prueba es de 95%, en comparación con un análisis por microscopia, con un límite inferior de 100 parásitos/ μl .⁸ Sin embargo, existen variaciones regionales de HPR2, lo que hace que en algunas áreas la prueba genérica no reconozca parasitemias por debajo de 500 parásitos/ μl .

Varias pruebas de la efectividad y el costo-beneficio de las RTD se han realizado en varias partes del mundo. Por ejemplo, debido al aumento de la resistencia de los parásitos del paludismo a los medicamentos anti-maláricos, se han introducido nuevos esquemas de tratamiento con combinaciones farmacológicas que requieren una evaluación oportuna de su efectividad; para ello las RTD proporcionan ventajas en relación con el manejo rápido y masivo de muestras para la detección parasitaria.^{11,12}

La disponibilidad de aparatos robóticos ha posibilitado la manipulación automatizada de cantidades muy pequeñas de reactivos y la fijación de moléculas reactivas (ácidos nucleicos, proteínas o azúcares) en hilera, muy próximas entre sí, sobre una matriz sólida plana (una membrana o un vidrio), lo que se denomina microarreglos¹³ (figura 2). Para el desarrollo de pruebas diagnósticas existen dos tipos de microarreglos de proteínas: los que contienen fijados en la matriz sólida anticuerpos para la detección de diversos antígenos (biomarcadores de patógenos) y los que contienen antígenos específicos de los patógenos para la detección de anticuerpos en muestras sanguíneas. Un ejemplo de estos últimos se desarrolló para la detección simultánea de anticuerpos en sueros humanos contra *Toxoplasma gondii*, el virus de la rubeola, citomegalovirus y el virus del herpes simple tipos 1 y 2.¹⁴ El desempeño diagnóstico de estos microarreglos se comparó con el de una prueba ELISA comercial, lo cual puso de manifiesto las ventajas de este tipo de pruebas de alto desempeño respecto de las técnicas inmunológicas tradicionales: ambas pruebas pueden utilizarse para el diagnóstico de infecciones recientes (detección de IgM), pero en los microarreglos, además de la investigación simultánea de varios patógenos, la reproducibilidad de los resultados es mayor, se utilizan cantidades de reactivos menores y, por último, la incorporación de curvas de calibración en la matriz permite que ésta se procese bajo las mismas condiciones que las muestras, de tal modo que se eliminan las variaciones debidas al tiempo de manipulación, temperatura, contenido de grasa, proteínas, y otros factores, en los sueros problema.

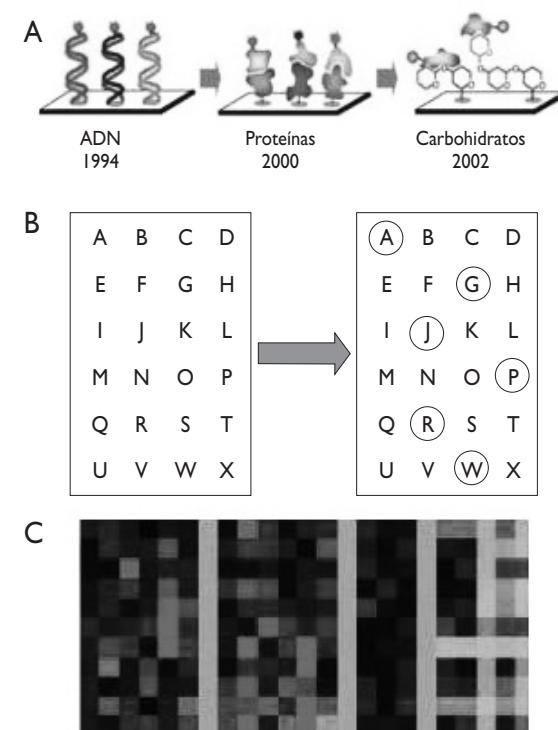


FIGURA 2. MICROARREGLOS. A. EN UNA MATRIZ SÓLIDA SE FIJA UNA COLECCIÓN DE MOLÉCULAS ACOMODADAS EN FORMA DE HILERAS PARALELAS (MICROARREGLOS) QUE FORMAN UN PUNTO MUY PEQUEÑO Y CON UNA LOCALIZACIÓN CONOCIDA. ESTAS MOLÉCULAS PUEDEN SER ADN (AÑO 1994), PROTEÍNA (2000) O AZÚCARES (2002). B. A LA MATRIZ SE LE AÑADE UNA SOLUCIÓN “SONDA” CON UNA MEZCLA DE MOLÉCULAS QUE POR AFINIDAD SE PEGAN A LAS QUE ESTÁN UNIDAS A LA MATRIZ. ESTA MEZCLA PUEDE CONTENER ÁCIDOS NUCLEICOS O PROTEÍNAS QUE SE MARCAN, CASI SIEMPRE CON FLUORESCENCIA, LO QUE PERMITE SU DETECCIÓN Y MEDICIÓN POR FLUORÓMETROS AUTOMATIZADOS EN LOS PUNTOS DONDE SE UNIERON. C. ESTE FORMATO PERMITE ANALIZAR UNA GRAN CANTIDAD DE MOLÉCULAS A LA VEZ. EL SISTEMA PERMITE CALCULAR LA CANTIDAD DE LAS MOLÉCULAS SONDA FIJADAS A LA MATRIZ Y LAS DESPLIEGA COMO CUADROS DE COLORES.

Ingeniería molecular de anticuerpos

Los anticuerpos se unen con alta especificidad y sensibilidad a proteínas, azúcares, lípidos y moléculas diversas; en consecuencia, usados como reactivos, pueden identificar de forma eficaz una gran variedad de biomarcadores de agentes patógenos. No obstante, éstos presentan algunas

dificultades de producción e inconvenientes para las aplicaciones biotecnológicas. Por consiguiente, la producción tradicional de anticuerpos contra el antígeno deseado, por medio de inmunizaciones de animales, no siempre es exitosa; asimismo, es posible que la especificidad y la sensibilidad de los anticuerpos producidos puede ser limitada por las características genéticas de la especie animal utilizada.^{15,16} Si bien la tecnología recombinante ha revolucionado la producción, diseño y adecuación para funciones específicas de proteínas, la estructura de los anticuerpos formada por dos cadenas pesadas y dos ligeras dificulta su producción por medio de esta tecnología. Además, estas moléculas requieren modificaciones postraduccionales, como glucosilación, doblamiento y formación de puentes disulfuro, lo que impide su producción en forma recombinante en organismos procariotes. La metodología para la preparación de anticuerpos monoclonales revolucionó la producción de anticuerpos, ya que hace posible obtener anticuerpos dirigidos contra un solo epitopo, se pueden almacenar las células para volver a elaborarlos cuando sea necesario y se pueden producir cantidades suficientes de reactivos.^{17,18} No obstante, esta medida es todavía costosa y encarece su inclusión en pruebas diagnósticas.

Varias intervenciones moleculares se han empleado para resolver las limitaciones de producción y el diseño de anticuerpos con mayor afinidad por sus antígenos y estructuras más sencillas y estables. Las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) que conforman los anticuerpos pueden producirse de manera aislada y conservar su capacidad de unirse de manera específica a sus antígenos,^{19,20} pero con afinidad y solubilidad reducidas.²¹ Las moléculas que contienen aparejadas las regiones complementarias (CDR) de las cadenas VH y VL son suficientes para mantener su unión específica a los antígenos.²² Los métodos de biología molecular se emplean para generar proteínas semisintéticas derivadas de los anticuerpos,^{23,24} estructuralmente más sencillas, que incluyen las regiones variables funcionales, con capacidad de unión a un antígeno y estables en diversas condiciones ambientales; entre éstas figuran las siguientes: fragmentos ab (Fab),²⁵ fragmentos variables (Fv),²⁶ y regiones variables conformadas con una sola cadena (scFv).²⁷ Estas moléculas se producen como fragmentos Fab de anticuerpos monovalentes, como cadenas únicas (SCFv) que contienen las regiones VH y VL unidas por un polipéptido puente y que mantienen su funcionalidad, como por ejemplo su capacidad de inhibir el desarrollo de patógenos.²⁸ Las moléculas formadas por un solo dominio variable (V_H^s) se pueden diseñar por computadora para hacerlas complementarias a la estructura de su molécula blanco.²⁹⁻³¹ También se producen fragmentos correspondientes a las regiones variables de

los anticuerpos conformados con dos cadenas peptídicas ensambladas en una sola cadena peptídica (dsFv).^{30,31} Algunas de estas variantes de anticuerpos se producen a gran escala en organismos modelo como *Escherichia coli* o sistemas de virus, procariotes y eucariotes.^{32,33} La producción de fragmentos de proteínas en bacteriófagos filamentosos de tipo f (fagos f1, fd y M13) también se ha empleado para la elaboración de scFvs, para cuyo fin se clona el fragmento de interés para producirla fusionada con una proteína de cápside expuesta en la superficie del virión (*phage display*) (figura 3).³⁴ Los fagos son muy convenientes para expresar dominios de anticuerpos, ya que son estables en forma cristalizada o liofilizada y ello facilita su almacenaje y transporte y se pueden producir en gran cantidad y a bajo costo. Ejemplos de la aplicación de esta tecnología son la producción de fagos capaces de identificar antígenos de bacterias del género *Bacillus spp.*, incluido *B. anthracis*, los cuales tienen alto potencial para diagnóstico ya que son específicos y sensibles y se pueden manipular en diversas plataformas de ensayos diagnósticos^{35,36} y se experimenta con fagos útiles para la neutralización de ataques terroristas, ya que se ha demostrado que la inmunización pasiva tiene efectos significativos en el tratamiento.^{37,38}

Una alternativa para la producción de nuevos reactivos de reconocimiento es la ingeniería de moléculas (proteínas y otras moléculas) diferentes de las IgGs, con capacidad de unirse de manera específica a un antígeno. Una ventaja adicional de estos moldes es que pueden generarse moléculas que no tengan reacciones inmunitarias cruzadas y que para el revelado de sus pruebas no dependan, a su vez, de segundos anticuerpos que puedan presentar reconocimiento cruzado. Entre estas moléculas se encuentran las proteínas ricas en leucina, lipocalinas y tendamistat.³⁹

Por otra parte, por medio de la síntesis química de oligonucleótidos, se generan moléculas de ARN y ADN (genes sintéticos), con propiedades de reconocimiento altamente específico de moléculas que en algunos casos es superior al de los anticuerpos.⁴⁰ Los aptámeros son muy estables ante condiciones ambientales, pueden producirse contra moléculas poco inmunogénicas y su afinidad y especificidad de unión a los antígenos pueden mejorarse clonando los aptámeros como genes sintéticos y la introducción dirigida de variaciones en su secuencia "evolución dirigida". Por otra parte, durante la síntesis de los aptámeros se pueden introducir átomos que funcionan como etiquetas para su detección como los *quantum dots* (Q-dots) y al aplicarse se puede inducir su unión covalente al sitio blanco, lo que permite que el complejo aptámero-molécula blanco pueda lavarse en condiciones extremas, antes de su lectura, para mejorar la especificidad y estabilidad de las pruebas diagnósticas.

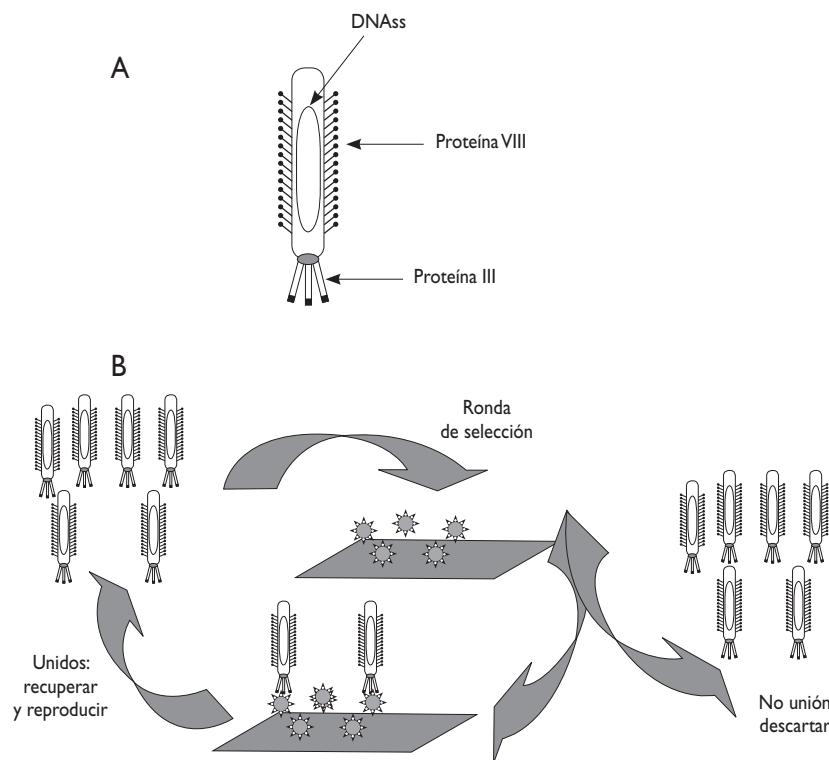


FIGURA 3. DESPLIEGUE DE PROTEÍNAS EN FAGOS. A. EN EL ADN DE UN FAGO FILAMENTOSO COMO M13 SE CLONA (ANIDADA DENTRO DE LA SECUENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE CÁPSIDE III O VII) LA SECUENCIA DE UNA PROTEÍNA HETERÓLOGA, DE TAL MODO QUE AL PRODUCIRSE NUEVAS PARTÍCULAS VIRALES ÉSTAS PRESENTAN EN SU SUPERFICIE EL FRAGMENTO DE LA PROTEÍNA QUE SE CLONÓ. B. AL CLONAR EN LOS FAGOS UNA POBLACIÓN DE ADNc QUE CODIFIQUE LA REGIÓN DE RECONOCIMIENTO DE UN ANTICUERPO, UNA POR FAGO, Y CADA SECUENCIA CON LIGERAS DIFERENCIAS GENERADAS AL AZAR, SE GENERA UNA POBLACIÓN DE FAGOS TAL QUE CADA UNO DESPLIEGA UNA PROTEÍNA DIFERENTE. ESTA POBLACIÓN SE PUEDE SELECCIONAR POR SU UNIÓN A UN ANTÍGENO ESPECÍFICO, PARA OBTENER LOS FAGOS QUE EXPRESAN LAS MOLÉCULAS CON MAYOR AFINIDAD A LA MOLÉCULA BLANCA. ESTOS FAGOS SE RECUPERAN Y SE MULTIPLICAN PARA OBTENER CANTIDADES ÚTILES DE VIRUS QUE SE ADHIEREN A UN SUSTRATO ESPECÍFICO

cas. Los aptámeros son eficientes en pruebas y formatos bien establecidos y pueden competir con los anticuerpos en diagnóstico e investigación.⁴¹⁻⁴⁴

Biología molecular de ácidos nucleicos y métodos diagnósticos

Si bien los organismos comparten de manera variable en su genoma genes comunes (ortólogos), estos genes y otros no compartidos presentan secuencias específicas de género, especie y cepa que hacen posible su identificación inequívoca. Una vez identificadas las secuencias exclusivas de patógeno, éstas pueden utilizarse para el desarrollo de reactivos para pruebas diagnósticas. En la práctica se desarrollan de forma constante nuevos equipos para

la manipulación, secuenciación y detección de ácidos nucleicos, lo que permite que esté en desarrollo una gran cantidad de proyectos de secuenciación de genomas de microorganismos; de igual modo, muchas de las bases de datos generadas, completas o en proceso, y las herramientas informáticas para su análisis están disponibles libremente en internet (*Portal NCBI National Institute for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>).⁴⁵ También están disponibles bases de datos con información sistematizada sobre microorganismos con potencialidad patogénica, según sean la agresividad, potencialidad de dispersión, datos epidemiológicos y técnicos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas; estas bases de datos se pueden consultar en línea (<http://www.cdc.gov/page.do>)⁴⁶ (cuadros I a III).

Detección de ácidos nucleicos. La detección del material genético de un microorganismo en muestras biológicas indica la presencia del patógeno en los sujetos de estudio en el momento de obtener la muestra. Esta detección permite la identificación de infecciones de manera directa sin la necesidad del cultivo del agente patógeno causal y la detección de ARN mensajeros indica que el organismo en cuestión está metabólicamente activo.⁴⁷ Las pruebas diagnósticas basadas en ácidos nucleicos se basan en la detección directa de su presencia por medio de sondas específicas (hibridación), pero también es posible incrementar su sensibilidad por medio de la amplificación de secuencias específicas diagnósticas (reacción en cadena de la polimerasa) del material genético presente en las muestras.

La hibridación se basa en la capacidad de dos cadenas sencillas de ácido nucleico, ADN o ARN, complementarias en su secuencia de bases, de formar enlaces específicos y crear una doble hélice en cualquier combinación: ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. Durante la hibridación una molécula de secuencia conocida (la sonda diagnóstica) "busca" e identifica a su complementaria en una mezcla de moléculas de ácido nucleico, aunque ésta sea muy compleja. La hibridación se puede efectuar en diversos formatos, en solución o con la cadena blanco unida a un soporte sólido o incluso *in situ*, esto es, en un corte de tejido o un microorganismo completo fijado. La sonda diagnóstica puede producirse por síntesis química o técnicas recombinantes y durante su producción se le incorporan etiquetas para su detección.

Cuadro I

GENOMAS DE BACTERIAS REPRESENTATIVAS DE IMPORTANCIA MÉDICA HUMANA. ESTAS BASES DE DATOS SON ACCESIBLES EN EL SITIO DEL NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV).
SE LISTAN LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ORGANISMO: TG, TAMAÑO DEL GENOMA; GCc, CONTENIDO DE GC

ID #	Microorganismo	TG	GCc	Enfermedad causada
269801	<i>Bacillus anthracis</i> *	5.50	35.2	Ántrax
257313	<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	4.09	67.7	Síndrome respiratorio
224326	<i>Borrelia burgdorferi</i> B31	1.52	28.2	Enfermedad de Lyme
195099	<i>Campylobacter jejuni</i> RM1221 *	1.78	31	Envenenamiento alimenticio
272561	<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/CX *	1.04	40	Faringitis, bronquitis y neumonitis
36826	<i>Clostridium botulinum</i> A *	3.96	28	Botulismo
212717	<i>Clostridium tetani</i> E88	2.87	27	Tétanos
257309	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 13129	2.49	53.5	Difteria
216592	<i>Escherichia coli</i> 536 *	4.9	50.5	Infección urinaria
281310	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP	1.91	38.5	Meningitis, septicemia, otitis, sinusitis y bronquitis
85962	<i>Helicobacter pylori</i> 26695	1.67	38.9	Inflamación gástrica y úlcera péptica
169963	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	2.94	37	Listeriosis
272631	<i>Mycobacterium leprae</i> TN *	3.27	57.79	Lepra
164513	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11 *	4.4	65.6	Tuberculosis
272634	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129 *	0.82	40	Neumonía atípica juvenil
242231	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090	2.15	52.7	Gonorrea
272831	<i>Neisseria meningitidis</i> FAM18	2.19	51.6	Meningitis y septicemia
267747	<i>Propionibacterium acnes</i> KPA171202	2.56	60	Acné
208964	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	6.26	67	Infecciones oportunistas
295319	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> *	4.59	52.2	Fiebre paratifoidea
216598	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197 *	4.59	51.10	Disentería
198215	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T	4.6	50	Disentería
93062	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> COL *	2.81	37	Síndrome de choque tóxico y fiebre "escarlata"
243276	<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> str. Nichols	1.14	52	Sífilis
345075	<i>Vibrio cholerae</i> O395 *	4.1	47.5	Enfermedad gastrointestinal

* Por razón de espacio se eliminaron organismos del mismo género o especie. Se seleccionaron sólo genomas completos

Cuadro II

GENOMAS REPRESENTATIVOS DE PROTISTAS ACCESIBLES EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI (JULIO DE 2008). ESTAS BASES DE DATOS ESTÁN DISPONIBLES EN EL SITIO WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV. SE LISTAN CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MICROORGANISMO. LA ID TAXONÓMICA CORRESPONDE A LA BASE DE DATOS DE CLASIFICACIÓN DE ORGANISMOS (TAXBROWSER) ACCESIBLE EN EL MISMO SITIO. EL TAMAÑO DEL GENOMA SE EXPRESA EN MEGABASES (Mb). EL NÚMERO CROMOSÓMICO (CROM) SE DETERMINÓ POR DIVERSOS MÉTODOS, EN PARTICULAR PFGE.

Microorganismo	Subgrupo	ID taxonómica	Tamaño genoma	Crom.	Estatus	Fecha liberación
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Apicomplexa	237895	8.74	8	Ensamblado	10/27/2004
<i>Cryptosporidium parvum Iowa</i>	Apicomplexa	5807	9.1	8	Ensamblado	03/27/2004
<i>Dictyostelium discoideum AX4</i>	Otros protistas	44689	34	6	Ensamblado	03/03/2005
<i>Eimeria tenella</i>	Apicomplexa	5802	60	14	Progreso	
<i>Emiliania huxleyi</i> 1516	Otros protistas	2903	220		Progreso	
<i>Entamoeba dispar</i>	Otros protistas	46681			Progreso	02/11/2006
<i>Entamoeba histolytica</i>	Otros protistas	5759	20	14	Completo	12/09/2004
<i>Entamoeba invadens</i> *	Otros protistas	33085			Progreso	02/11/2006
<i>Entamoeba moshkovskii</i>	Otros protistas	41668			Progreso	
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Otros protistas	130081		2	Progreso	
<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803	Otros protistas	184922	12	5	Ensamblado	03/26/2003
<i>Leishmania infantum</i>	Cinetoplástidos	5671			Progreso	
<i>Leishmania major</i> Friedlin	Cinetoplástidos	5664	5.44	8	Completo	03/17/1999
<i>Naegleria gruberi</i>	Otros protistas	5762			Progreso	
<i>Paramecium tetraurelia</i>	Otros protistas	5888			Progreso	11/03/2006
<i>Physarum polycephalum</i>	Otros protistas	5791			Progreso	
<i>Phytophthora infestans</i>	Otros protistas	4787			Progreso	
<i>Phytophthora infestans</i>	Otros protistas	4787			Progreso	11/15/2006
<i>Phytophthora ramorum</i>	Otros protistas	164328			Progreso	09/01/2006
<i>Phytophthora sojae</i>	Otros protistas	67593			Progreso	09/01/2006
<i>Plasmodium berghei</i> strain ANKA	Apicomplexa	5823	26	14	Ensamblado	12/09/2004
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Apicomplexa	5825	30	14	Ensamblado	12/09/2004
<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	Apicomplexa	36329	23	14	Progreso	11/06/1998
<i>Plasmodium gallinaceum</i>	Apicomplexa	5849	25	14	Progreso	
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Apicomplexa	5850	25	14	Progreso	
<i>Plasmodium reichenowi</i>	Apicomplexa	5854		14	Progreso	
<i>Plasmodium vivax</i> (strain Salvador I)	Apicomplexa	126793	30	14	Progreso	09/20/2005
<i>Plasmodium yoelii</i> yoelii	Apicomplexa	73239	23	14	Ensamblado	10/09/2002
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Otros protistas	5911			Progreso	02/14/2005
<i>Theileria annulata</i>	Apicomplexa	5874	10	4	Progreso	
<i>Theileria parva</i>	Apicomplexa	5875	9	4	Progreso	06/30/2005
<i>Toxoplasma gondii</i>	Apicomplexa	5811	30	9	Progreso	05/05/2006
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Otros protistas	5722			Progreso	05/25/2005
<i>Trypanosoma brucei</i>	Cinetoplástidos	5691	26	22	Ensamblado	08/09/2003
<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000	Cinetoplástidos	5692			Progreso	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cinetoplástidos	5693	34		Completo	07/14/2005
<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	Cinetoplástidos	5699			Progreso	

(enzimas para detección colorimétrica, fluorescencia). El número de moléculas blanco presentes en la muestra determina el número de moléculas de la sonda que se fijan al formato, lo cual determina la intensidad de la señal. La especificidad de la señal obtenida depende del grado de complementariedad entre las dos cadenas de ADN (la sonda y el gen investigado) y su sensibilidad (que se limita al número de copias del gen investigado en el material biológico).

En formato individual, la hibridación es útil para detectar o confirmar los resultados de otras pruebas.⁴⁸

Nuevos desarrollos que usan el principio de hibridación son los microarreglos.⁴⁹ En este formato, las sondas de ADN se imprimen o sintetizan (con formación de celdas) por medios automáticos directamente⁵⁰ sobre soportes sólidos de vidrio o polipropileno y estas secuencias, fijadas en el soporte sólido, se incuban con muestras que contienen el material genético en estudio, previamente marcado, de tal modo que al hibridarse se presenta una señal en la celda reconocida.

En el momento presente, los altos costos de los métodos basados en microarreglos impiden su empleo

Cuadro III

BASES DE DATOS DE GENOMAS DE INSECTOS. EXISTEN 57 PROYECTOS DE SECUENCIA DE GENOMA, SÓLO SE HA COMPLETADO EL DE DROSOPHILA MELANOGASTER, 31 SE HALLAN EN FASE DE ENSAMBLADO Y 31 EN PROCESO. SE LISTAN MICROORGANISMOS REPRESENTATIVOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

Microorganismo	ID taxonómica	Tamaño genoma	Crom.	Estatus	Fecha de liberación	Centro/Consorcio
<i>Aedes aegypti</i> Liverpool	7159	800	3	Ensamblado	02/11/2005	TIGR Broad Institute The International Consortium for the Sequencing of Anopheles Genome Celera
<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST	180454		3	Ensamblado	03/22/2002	Genomics Genoscope
<i>Apis mellifera</i> DH4	7460	200	16	Ensamblado	12/19/2003	Baylor College of Medicine
<i>Bombyx mori</i> (2)	7091	530	28	Ensamblado	04/27/2004	International Lepidopteran Genome Project
<i>Culex quinquefasciatus</i>	7175	540	3	Ensamblado	04/19/2004	Broad Institute
<i>Drosophila melanogaster</i> (varias)	7227	180	4	Completo	12/18/2002	Berkeley Drosophila Genome Project
<i>Nasonia vitripennis</i> AsymCX	7425		5	Ensamblado	05/04/2007	Baylor College of Medicine
<i>Rhodnius prolixus</i>	13249	670	11	Progreso		Washington University (WashU)
<i>Tribolium castaneum</i> Georgia GA2	7070	200	10	Ensamblado	08/17/2005	Baylor College of Medicine

en estudios poblacionales; no obstante, esta técnica se ha utilizado para estudios epidemiológicos que incluyen números pequeños de muestras, como la genotipificación de cepas de virus de la inmunodeficiencia humana resistentes a tratamiento,⁵¹ y para determinar el origen de infecciones sintomáticas y asintomáticas con poliovirus en una población previamente vacunada.⁵²

PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento muy sensible que utiliza una polimerasa de ADN; este procedimiento permite amplificar y detectar de manera específica, a partir de una sola molécula blanco, secuencias particulares de ADN. La reacción depende de oligonucleótidos cortos (cebadores o sondas) que tienen la secuencia adecuada (complementaria) para hibridar en los extremos de cadenas sencillas del ADN blanco, las cuales se obtienen mediante la desnaturación del ADN original. Una vez unida, la sonda sirve como ancla para que la polimerasa inicie la producción de la cadena complementaria a la secuencia blanco, de tal manera que se forman moléculas de ADN de doble cadena. La desnaturación de este ADN, la hibridación con la sonda y la síntesis de la cadena complementaria con ciclos repetidos permiten la obtención de grandes cantidades de ADN específico del microorganismo investigado, lo cual facilita su detección. El reconocimiento del material producido se obtiene mediante electroforesis en geles de agarosa y la identificación de bandas del tamaño molecular esperado por medio de tinción con bromuro de etidio. La sensibilidad y especificidad de la PCR han permitido el desarrollo de métodos diagnósticos para una gran varie-

dad de agentes infecciosos: bacterias, protozoarios, virus y helmintos.^{53,54} La prueba de PCR descrita se conoce como de “punto final”, ya que la reacción se detiene hasta que todos los reactivos necesarios para la amplificación se han utilizado. A partir del método básico de PCR se han desarrollado variantes para detectar ADN o ARN, con objeto de hacerlo cuantitativo (véase más adelante) y aplicar sistemas diagnósticos automatizados que realizan el procesamiento de las muestras desde la purificación del material genético hasta su análisis.⁵⁴

Existen numerosas pruebas diagnósticas que usan la PCR con el formato de “punto final”; en éstas, la reacción se realiza en un número predeterminado de ciclos y los productos se analizan por electroforesis. Por ejemplo, las especies de *Corynebacterium*: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis*, son patógenas sólo cuando producen la toxina diftérica, para lo cual necesitan copias completas del gen *tox*. Mediante pruebas de PCR se puede reconocer la presencia del gen *aun* en muestras de pacientes que han recibido antibióticos, en quienes ya no es posible cultivar la bacteria. Sin embargo, en algunas cepas que poseen el gen *tox*, debido a mutaciones en la región de control del gen, éste no es activo, por lo que los pacientes positivos por PCR aún se los considera como casos presuntivos.^{55,56}

La PCR de punto final también se usa para el diagnóstico y clasificación de los parásitos del género *Leishmania spp.*, los cuales poseen una mitocondria modificada llamada cinetoplasto en la que existen dos tipos de moléculas de ADN, los maxicírculos y los minicírculos. En la secuencia de los minicírculos, se

presentan regiones conservadas y variables, entre las cuales se encuentran algunas específicas de especie/aislado (oxidasa de citocromo y regiones espaciadoras intergénicas), a partir de las cuales se pueden diseñar pares de oligonucleótidos iniciadores que al amplificar permiten distinguir entre géneros, especies y poblaciones de parásitos.⁵⁷⁻⁵⁹ Este método se puede aplicar a diferentes tipos de muestras, como sangre o aspirados de nódulos linfáticos, y en la actualidad se ha probado para la evaluación de la efectividad de nuevos fármacos,⁵⁹ la identificación de portadores asintomáticos y de animales que sirven como reservorios en la naturaleza.⁶⁰

En la PCR multiplex se incorporan a la reacción de amplificación más de un par de sondas específicas para diferentes secuencias blanco. Los fragmentos generados pueden reconocerse por su tamaño o por medio de marcadores incluidos en las sondas. Entre las aplicaciones de este sistema figuran el análisis de muestras en las que hay varias moléculas blanco del mismo organismo, la confirmación de que éste se halla presente, o bien la investigación de forma simultánea de varios patógenos, para lo cual se incluyen sondas específicas para cada microorganismo. La dificultad principal de la PCR multiplex es el diseño adecuado de los oligos con el fin de evitar interacciones inespecíficas entre ellos y reconocimientos cruzados y lograr que los amplicones resultantes se puedan diferenciar unos de otros. Para el diseño de estos cebadores se han desarrollado programas computacionales⁶¹ que incluyen como elementos de selección secuencias específicas de los patógenos en estudio y composición de éstos para que los procesos de amplificación requieran las mismas condiciones (temperatura de " fusión"). De esta manera se genera un "sistema de tubo único", en el cual se coloca la muestra en un tubo que se cierra con los reactivos de purificación y amplificación y ya no se abre sino hasta obtener el resultado, lo cual reduce el riesgo de manipular muestras peligrosas.⁶²⁻⁶⁴

Para la identificación de los productos amplificados se han propuesto varias alternativas, además del uso de la electroforesis en agarosa. En un sistema para la detección de productos de PCR en una reacción multiplex, los oligos iniciadores se acoplaron a microesferas, de tal modo que los productos quedaron acoplados a éstas y eran distinguibles en un citómetro de flujo, lo que permitía la automatización de la lectura y la distinción de hasta de 80 blancos diferentes en una reacción.^{65,66} De la misma forma, los oligos pueden acoplarse a moléculas de tamaño diverso disponibles en el comercio (Qiagen Masscode Technology, Qiagen, Hilden, Alemania), con capacidad de distinguir hasta 64 diferentes tamaños y por tanto el mismo número de secuencias específicas.⁶⁷ Otra manera de identificar productos diferentes en una

PCR multiplex consiste en utilizar oligos marcados con faros moleculares (*beacons*, véase más adelante), los cuales emiten señales fluorescentes a distintas longitudes de onda.⁶⁸ Las pruebas basadas en la PCR multiplex son útiles para reconocer infecciones por patógenos que comparten cuadros sintomáticos comunes; con este propósito se diseño una prueba para investigar la causa de las fiebres virales hemorrágicas, que incluye sondas para identificar 10 diferentes virus.⁶⁹

Para mejorar la sensibilidad en los ensayos multiplex se aplica también el principio de las reacciones "anidadas", en las cuales la reacción se realiza primero con un juego de iniciadores "externos", que en los primeros ciclos genera un fragmento "grande". En una segunda etapa, el producto de la primera ronda de amplificación se convierte en el molde con un segundo juego de iniciadores que se hallan dentro del producto primario ("anidados"), lo cual asegura la especificidad del amplificado de la primera ronda.^{68,70} Las pruebas diagnósticas veterinarias pueden consultarse en el sitio <http://pcr.sdstate.org/>.

PCR en tiempo real. Los "puntos finales" de las reacciones de PCR varían entre las muestras debido a la cantidad de ADN blanco presente en éstas. Además, el punto final es difícil de precisar ya que la amplificación, después de una fase exponencial, alcanza una meseta en la que los reactivos comienzan a agotarse. Estas condiciones son determinantes de las limitaciones de este método, entre ellas bajas precisión y sensibilidad, además de que no puede ser cuantitativa. En los métodos de PCR "en tiempo real", las moléculas del fragmento blanco que se amplifican se detectan al mismo tiempo que se generan (durante la fase exponencial de la amplificación), con base en varias estrategias que dependen de moléculas fluorescentes (fluoróforos) cuya emisión es proporcional al número de moléculas producidas, lo que permite hacer la prueba de forma cuantitativa.^{71,72} Un fluoróforo es una molécula que absorbe radiación de una longitud de onda determinada (luz UV o láser) y luego emite la energía absorbida en forma de luz de una longitud de onda determinada, pero diferente a la empleada para su excitación; esto hace posible su identificación. La utilización de fluoróforos también permite realizar reacciones de amplificación multiplex y detectar cada molécula blanco con un fluorocromo diferente.⁷³

El método más sencillo de detección de los productos de PCR en tiempo real es la aplicación de un fluoróforo marcador, como el SYBRgreen, el cual emite fluorescencia cuando se intercala en el surco mayor de la doble hélice del ADN. Otra forma de reconocer productos de PCR en tiempo real consiste en usar los *beacons* ("faros moleculares"). En este sistema se generan sondas que poseen un fluoróforo "principal" en el

extremo 5' y otro fluoróforo de menor intensidad en el extremo 3' con diferente espectro de emisión (*beacons*). Cuando estas sondas se encuentran como moléculas únicas se pliegan sobre sí mismas y la proximidad de los fluoróforos genera el efecto "FRET" (*fluorescence resonance energy transfer*), en el cual el fluoróforo secundario apaga la emisión del primario. Al ocurrir la reacción de PCR, el *beacon* forma parte de las moléculas amplificadas, con lo que el fluoróforo principal se separa del secundario y recupera su fluorescencia, de tal manera que la población de híbridos se puede medir porque su número es directamente proporcional a la magnitud de la fluorescencia. Los *beacons* pueden prepararse con diferentes fluoróforos, como SYBRgreen™, fluoresceína (FAM), Texas red, Rhodamina 6G, Cy3, Cy5, entre otros, y DABCYL como apagador, lo que posibilita realizar combinaciones para la detección multiplex.^{73,74} Pueden consultarse las páginas electrónicas <http://www.molecular-beacons.org/> y <http://www.appliedbiosystems.com/support/apptech/>.

En un ejemplo de aplicación se investigó en muestras sanguíneas humanas la presencia de los genes *gag* de HIV-1, *env* HIV-2, *tax* del virus T-linfotrópico tipo 1 y *pol* del tipo 2, mediante los juegos de *beacons* correspondientes, marcados con diferentes fluoróforos; esto permitió determinar la carga viral en las muestras;^{74,75} el método es rápido, sensible, específico y seguro para el operador.

En la PCR llamada TaqMan™ además del efecto FRET se utilizan las actividades de la polimerasa Taq, que actúa como polimerasa en dirección 5'>3' y como exonucleasa en dirección 3'>5' (figura 4).^{76,77} A diferencia de la reacción de la PCR estándar, en el TaqMan se lleva a cabo una hibridación con una sonda complementaria de una región interna de la secuencia blanco, antes de la amplificación. La sonda interna tiene una temperatura

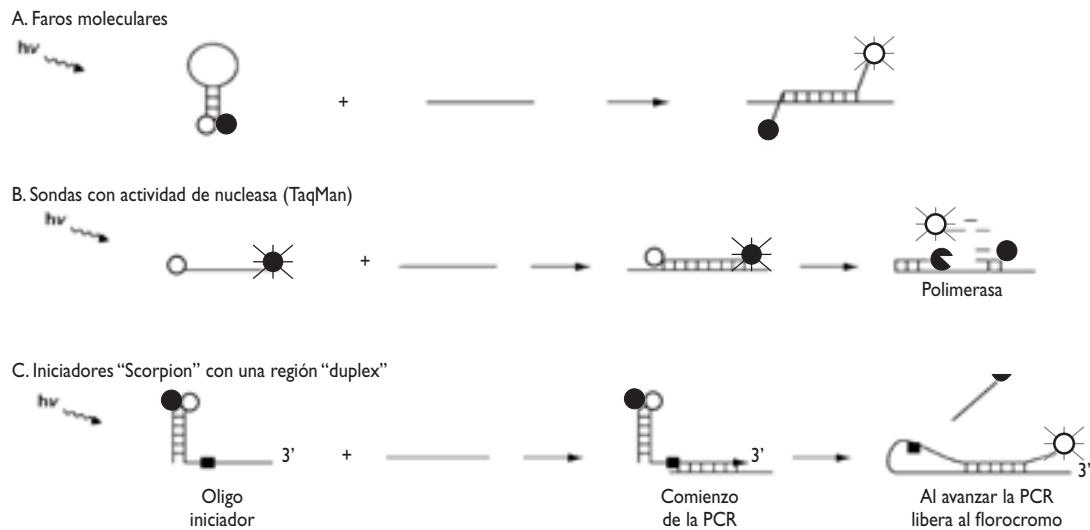


FIGURA 4. TRES FORMAS DE MEDIR EN TIEMPO REAL LA APARICIÓN DE MOLÉCULAS AMPLIFICADAS POR PCR. LA EMISIÓN DE UNA MOLÉCULA FLUORESCENTE PRINCIPAL (FLUORÓFORO, CÍRCULO BLANCO) SE APAGA CUANDO ESTÁ PRÓXIMA A UNA SEGUNDA MOLÉCULA FLUORESCENTE (QUENCHER, CÍRCULO NEGRO) CON UNA ABSORCIÓN Y EMISIÓN DIFERENTE. A. LOS FAROS MOLECULARES SON OLIGOS CON UNA REGIÓN DE APAREAMIENTO QUE FORMA UNA DOBLE CADENA QUE MANTIENE JUNTO AL FLUORÓFORO Y AL QUENCHER Y POR TANTO APAGA LA EMISIÓN DE LA SEÑAL DEL PRIMERO. CUANDO EN EL MEDIO AUMENTA LA CONCENTRACIÓN DE MOLÉCULAS BLANCO SE FORMAN DOBLES CADENAS, SE SEPARA EL FLUORÓFORO DEL QUENCHER Y ELLO LIBERA LA FLUORESCENCIA. B. EN EL SISTEMA TAQMAN, EL OLIGO CON EL FLUORÓFORO ES DESTRUIDO POR ACCIÓN DE LA POLIMERASA QUE CONSERVA LA ACTIVIDAD DE NUCLEASA 3'-5' Y SE ACTIVA LA FLUORESCENCIA; LA SONDA TAQMAN, POR SU AFINIDAD MAYOR, SE UNE A SU SITIO BLANCO ANTES DE LOS INICIADORES DE AMPLIFICACIÓN. CUANDO EMPIEZA LA CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN Y LOS CEBADORES SE UNEN, LA POLIMERASA TAQ AVANZA Y, CUANDO ENCUENTRA LA SONDA, LA DEGRADA Y LIBERA LA SEÑAL FLUORESCENTE. C. LOS INICIADORES TIPO ESCORPIÓN ESTÁN FORMADOS POR DOS OLIGOS HIBRIDADOS DE MANERA PARCIAL, CON UNA COLA QUE ES COMPLEMENTARIA DE LA SECUENCIA BLANCO. AL HIBRIDAR LA SECUENCIA ESPECÍFICA CON SU BLANCO E INICIAR LA PCR, LOS FLUORÓFOROS SE SEPARAN, LO QUE ACTIVA LA SEÑAL

de " fusión" 10°C superior a la de los iniciadores en los extremos y posee en su extremo 5' un fluoróforo verde (6-carboxifluoresceína, FAM), cuyo espectro de emisión está "apagado" (*quenched*) por la proximidad espacial de un segundo colorante fluorescente (<http://www.appliedbiosystems.com/support/apptech/>). En una reacción de PCR, el primer paso de cada ciclo es un aumento de la temperatura para la desnaturalización de las cadenas de ADN, seguido de un descenso de la temperatura para la renaturalización, durante la cual se unen los iniciadores a los lados de la secuencia blanco. En la reacción TaqMan, durante la renaturalización la sonda TaqMan, en virtud de su afinidad mayor, se une a su sitio blanco antes de que lo hagan los iniciadores de amplificación. Para la fase de síntesis los iniciadores se unen, empieza la conformación de moléculas de ADN y durante el avance de la polimerasa Taq, ésta "choca" con la sonda y por su actividad de exonucleasas la degrada (se "come la sonda", de tal modo que el fluoróforo de la sonda se libera y la señal se activa, lo que posibilita su medición. Se han publicado varios ensayos diagnósticos con base en este método, como el descrito para reconocer *Chalmydia trachomatis*⁷⁸ y tuberculosis.⁷⁹ En este tipo de prueba también se pueden hacer combinaciones de juegos de iniciadores y sondas con fluoróforos que emitan a distintas longitudes de onda para identificar varios blancos en reacciones multiplex.⁸⁰⁻⁸² El sistema Scorpions^{83,84} es similar al anterior en tanto que incluye el juego de fluoróforos, principal y apagador, y el uso de un iniciador para la reacción de PCR, pero con la incorporación covalente de una secuencia adicional formada por un "bloqueador" en la región 5'; empero, a diferencia del anterior, no hay degradación de moléculas. En este formato se han diseñado métodos diagnósticos, como los descritos para *Helicobacter pylori*⁸⁵ y *Mycoplasma*.⁸⁶

En el mercado ya están disponibles varios estudios diagnósticos basados en la reacción de PCR en tiempo real [sistema Roche Amplicor; (<http://www.roche.com/products/product-list.htm?type=diagnostics&id=29>)]; éstos se someten de forma continua a evaluaciones y comparaciones con nuevos productos, aún no comerciales. Por ejemplo, la prueba PCR para *Mycobacterium tuberculosis* usa como blanco de amplificación una región del ARN ribosomal 16S de la micobacteria, con una sensibilidad de 47 a 58.2% y especificidad de 94 a 97%, según sea el tejido del que se obtiene la muestra. La sensibilidad varía con el tratamiento usado para purificar el material genético y, aunque esta prueba fue superior a los métodos tradicionales, todavía se identificó a un grupo de pacientes en el que no pudo establecerse un diagnóstico definitivo.⁶²

Espectrometría de masas y diagnóstico

En la actualidad, los métodos de espectrometría de masas (MS) disponibles permiten identificar moléculas orgánicas e inorgánicas de forma rápida, confiable y con alto rendimiento. La identificación de proteínas por MS es paralela a la acumulación de secuencias de ácidos nucleicos (genómica) y su control por bioinformática para conocer las proteínas codificadas por ellas y con estas proteínas virtuales hacer experimentos *in silico*, consistentes en la predicción de los iones que se generan durante la fragmentación en los diferentes sistemas de análisis. En una sola ronda de fragmentación/separación de iones se obtienen "huellas digitales" (gráfica de valores de masa/carga de los iones, *m/z*), que permiten identificar a la molécula exacta por comparación con las huellas digitales generadas teóricamente a partir de las bases de datos genómicas.⁸⁷ Con estos estudios es posible identificar biomarcadores de patógenos específicos.⁸⁸⁻⁹⁰ La MS también puede usarse para identificar secuencias de ADN, lo que permite emplearla para el análisis automatizado y rápido de productos de PCR.^{91,92} Esta aplicación es útil en ensayos de PCR multiplex, como en el sistema denominado Masstag-PCR, en el cual los oligos para realizar la PCR se marcan con grupos químicos de masa conocida (MassTag) y la cantidad de los productos generados durante la amplificación se mide mediante un sistema de espectrometría de masas en fase líquida por la cantidad de las "etiquetas" incorporadas.⁹¹ Esta técnica se ha aprobado para el diagnóstico diferencial e identificar hasta 22 agentes patógenos de muestras clínicas causantes de enfermedades respiratorias y virales hemorrágicas, con sensibilidad y especificidad elevadas.

Comentarios finales

La investigación básica mediante genómica y proteómica de microorganismos patógenos proporciona nuevos marcadores biológicos potencialmente útiles para desarrollar métodos de diagnóstico. Para cada enfermedad infecciosa es importante el conocimiento de varios biomarcadores entre las moléculas de los patógenos y entre las moléculas de respuesta de los pacientes, ya que éstas pueden variar a lo largo del proceso infeccioso, según sean las características genéticas de los pacientes, los agentes patógenos y las condiciones ambientales.

El uso de pruebas automatizadas y la inclusión de múltiples marcadores permiten en su formato actual investigar de forma simultánea, rápida y a bajo costo el origen de infecciones que comparten cuadros

sintomáticos. Por otra parte, es recomendable aplicar un plan estratificado en la investigación de microorganismos patógenos de acuerdo con las condiciones epidemiológicas en cada caso. En consecuencia, cuando la clínica y los informes epidemiológicos sugieren la participación de uno o pocos patógenos es recomendable el uso de PCR de punto final; si no existe suficiente información para circunscribirse a pocos patógenos sospechosos, el PCR multiplex puede ser útil para investigar un número elevado de microorganismos. Los microarreglos pueden ser de utilidad si el PCR multiplex no provee información.⁹³

La disposición de genomas completos de los patógenos más comunes ha permitido la identificación y producción masiva de genes y antígenos; las técnicas de biología molecular se emplean para la producción de anticuerpos y sus fragmentos con elevadas especificidad y sensibilidad. Las técnicas para la producción química de moléculas complementarias promete la posibilidad de prescindir ya en el futuro de la producción de anticuerpos y evitar la necesidad de inmunizaciones de animales.

Los sensores basados en moléculas biológicas ofrecen oportunidades sin precedentes para el tamizaje genético y la detección. La tecnología de los microarreglos es útil para el análisis masivo de muestras, aunque implica el uso de una instrumentación muy costosa y algoritmos numéricos complejos para interpretar los datos, de modo tal que dichos métodos se han limitado a los laboratorios de investigación. Sin embargo, los costos disminuyen rápidamente y cabe anticipar que, en un futuro próximo, estarán al alcance de la comunidad médica.^{94,95}

Referencias

- Barken KB, Haagensen JA, Tolker-Nielsen T. Advances in nucleic acid-base diagnostics of bacterial infections. *Clin Chim Acta* 2007;384:1-11.
- Kasper DC, Prusa AR, Hayde M, Gerstl N, Pollak A, Herkner KR, et al. Evaluation of Vitros ECiQ immunodiagnostic system for detection of anti-toxoplasma immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies for confirmatory testing for acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *J Clin Microbiol* 2009;47:164-167.
- Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Cell Proteomics* 2006;5:1745-1759.
- Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. Recombinant allergens for analyzing T-cell responses. *Methods* 2004;32:255-264.
- Gamble H, Andrews C, Dubey J, Webert D, Pamley S. Use of recombinant antigens for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 2000;86:459-462.
- Coelho AG, Zamaroli LA, Reis CM, Nascimento AC, Rodrigues JS. Gene probes versus classical methods in the identification of micobacteria. *J Bras Pneumol* 2008;34:922-926.
- González M, Hassanni M, Rivera S, Bracho M. Estudio comparativo entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IIF) y ELISA en la detección del parvovirus B19. *Invest Clin* 2000;41:19-27.
- Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:66-78.
- Kakkilaya BS. Rapid diagnosis of malaria. *Lab Medicine* 2003;34:602-608.
- World Health Organization. The role of laboratory diagnosis to support malaria disease management: focus on the use of rapid diagnostic tests in areas of high transmission. WHO 2006. Disponible en: <http://www.int/malaria/docs/ReportLABdiagnosis-web.pdf>.
- WHO/USAID. New perspectives. Malaria diagnosis. Geneva:WHO, 2000.
- Lubell Y, Hopkins H, Whitty C, Staedke S, Mills A. An interactive model for the assessment of the economic costs and benefits of different rapid diagnostic tests for malaria. *Malaria J* 2008;7:21-32.
- MacBeath G, Scheiber SJ. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000;289:1760-1763.
- Mezzasoma L, Bacarese-hamilton T, Di Cristina M, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. *Clin Chemistry* 2002;48:121-130.
- Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 2005;23:1117-1125.
- Miura K, Zhou H, Muratova OV, Orcutt AC, Giersing B, Miller LH, et al. In immunization with *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1, the specificity of antibodies depends on the species immunized. *Infect Immun* 2007;75:5827-5836.
- Chadd HE, Chamow SM. Therapeutic antibody expression technology. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:188-194.
- Kellerman SA, Green LL. Antibody discovery: the use of transgenic mice to generate human monoclonal antibodies for therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:593-597.
- Utsumi S, Karush F. The subunits of purified rabbit antibodies. *Biochem* 1964;3:1329-1338.
- Yoo Tj, Roholt OA, Pressman D. Specific binding activity of isolated light chains of antibodies. *Science* 1967;157:707-709.
- Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 1989;341:544-546.
- Sundberg Ej, Maruzza RA. Molecular recognition in antibody-antigen complexes. *Adv Protein Chem* 2002;61:119-160.
- Gibbs W. Nanobodies. *Sci Am* 2005;293:66-71.
- Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;77:13-22.
- Better M, Chang C, Robinson R, Horwitz A. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 1998;240:1041-1043.
- Skerra A, Pluckthun A. Assembly of a functional immunoglobulin fragment in *Escherichia coli*. *Science* 1988;240:1038-1041.
- Bird R, Hardman K, Jacobson J, Johnson S, Kauffman B, Lee S, et al. Single chain antigen-binding proteins. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 1988;242:423-426.
- Pokorny NJ, Boulter-Bitzer JI, Hall JC, Trevors JT, Lee H. Inhibition of *Cryptosporidium parvum* infection of a mammalian cell culture by recombinant scFv antibodies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008;94(3):353-364.
- Reiter Y, Brinkman U, Byungkook L, Pastan I. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: bisulfide-stabilized Fv fragments. *Nat Biotechnol* 1996;14:1239-1245.
- Jia L, Yu J, Song H, Liu X, Ma W, Xu Y, et al. Screening of human antibody Fab fragment against HBsAg and the construction of its dsFv form. *Int J Biol Sci* 2008;24;4:103-110.
- Shuntao W, Jiannan F, Jianwei G, Leiming G, Yan L, Yingxun S, et al. A novel designed single domain antibody on 3-D structure of ricin A chain remarkably blocked ricin-induced cytotoxicity. *Mol Immunol* 2006;43:1912-1919.

32. Rader C, Barbas III CF. Antibody engineering. In: Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. *Phage display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: CSH Laboratory Press, 2001:3.1-13.15.
33. Thie H, Schirrmann T, Paschke M, Dübel S, Hust M. SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in *E. coli*. *Nat Biotechnol* 2008;25:49-54.
34. Mechaly A, Zahavy E. Fisher Development and implementation of a single-chain Fv antibody for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. *M Appl Environ Microbiol* 2008;74:818-822.
35. Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng* 2007;24:201-215.
36. Enkhtuya J, Kawamoto K, Kobayashi Y, Uchida I, Rana N, Makino S. Significant passive protective effect against anthrax by antibody to *Bacillus anthracis* inactivated spores that lack two virulence plasmids. *Microbiology* 2006;152(Pt 10):3103-3110.
37. Grabenstein JD. Vaccines: countering anthrax: vaccines and immunoglobulins. *Clin Infect Dis* 2008;46:129-136.
38. Zhou B, Wirsching P, Janda KD. Human antibodies against spores of the genus bacillus: a model study for detection of and protection against anthrax and the bioterrorist threat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5241-5246.
39. Binz HK, Amstutz PA, Plückthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 2005;23:1257-1268.
40. Phillips JA, Lopez-Colon D, Zhu Z, Xu Y, Tan W. Applications of aptamers in cancer cell biology. *Anal Chim Acta* 2008;28:62:101-108.
41. Wen JD, Gray DM. Selection of genomic sequences that bind tightly to Ff gene 5 protein: primer-free genomic SELEX. *Nucl Acids Res* 2004;32:e182.
42. Bunka DH, Stockley PG. Aptamers come of age-at last. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:588-596.
43. Jayasena SD. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 1999;45:1628-1650.
44. Collett JR, Cho EJ, Ellington AD. Production and processing of aptamer microarrays. *Methods* 2005;37:4-15.
45. Carroll S, Grenier J, Weatherbee S. *From DNA to diversity*. USA: Blackwell Publishing, 2005.
46. Bravata D, McDonald K, Smith W, Rydzak C, Szeto H, Buckeridge D, et al. Systematic review: Surveillance systems for early detection of bioterrorism-related diseases. *Ann Intern Med* 2004;140:910-922.
47. Tang Y-W, Procop G, Persing D. Molecular diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 1997;43:2021-2038.
48. Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol* 2007;9:21-39.
49. Southern EM. Microarrays History and Overview. En *DNA Microarrays*. Rampal JD. New Jersey: Humana Press, 2001:9-15.
50. Eaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleotide phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 1981;22:1859-1862.
51. Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-Genotype method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:3022-3028.
52. Chersakova E, Laassri M, Chizhikov V, Korotkova E, Dragunsky E, Agol VI, et al. Microarray analysis of evolution of RNA viruses: evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine-derived polioviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9398-9403.
53. leuen M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J Clin Virol* 2007;40:259-276.
54. Rudi K, Hoidal HK, Katla T, Johansen BK, Nordal J, Jakobsen KS. Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:790-797.
55. Efstratiou A, Engler K, Mazurova I, Giushkevich T, Vuopio-Varkila J, Popovic T. Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 1):S138-S145.
56. Kolodkina V, Titov L, Sharapa T, Grimont F, Grimont PA, Efstratiou A. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus. *BMC Infect Dis* 2006;6:129.
57. Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 2004;189:1729-1733.
58. Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parasitologia* 2004;46:163-167.
59. Reale S, Maxia L, Vitale F, Gloriosos N, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol* 1999;37:2931-2935.
60. Le Fichou Y, Quaranta J, Aufeuve J, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 1999;37:1953-1957.
61. Jabado OJ, Palacios G, Kapoor V, Hui J, Renwick N, Zhai J, et al. Nucleic Acids Res 2006;34:6605-6611.
62. Osores F, Nolasco O, Verdonck K, Arevalo J, Ferrufino JC, Agapito J, et al. Clinical evaluation of a 16S ribosomal RNA polymerase chain reaction test for the diagnosis of lymph node tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2006;43:855-859.
63. Das S, Pingle MR, Muñoz-Jordan J, Rundell MS, Rondini S, Granger K, et al. Detection and serotyping of dengue virus in serum samples by multiplex reverse transcriptase PCR-ligase detection reaction assay. *J Clin Microbiol* 2008;46:276-284.
64. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, et al. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol* 2003;41:2408-2416.
65. Lee WM, Grindle K, Pappas T, Marshall DJ, Moser MJ, Beaty EL, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45:2626-2634.
66. Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl* 1994;3:S65-S75.
67. Bries T, Palacios G, Kokoris M, Jabado O, Liu Z, Renwick N, et al. Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Em Infect Dis* 2005;11:310-313.
68. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004;42:1564-1569.
69. Palacios G, Bries T, Kapoor V, Jabado O, Liu Z, Venter M, et al. MassTag polymerase chain reaction for differential diagnosis of viral hemorrhagic fevers. *Em Infect Dis* 2006;12:692-695.
70. Lam WY, Yeung AC, Tang JW, Ip M, Chan EW, Hui M, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45:3631-3640.
71. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:190-212.
72. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, et al. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 2005;43:5491-5497.
73. Wagenknecht HA. Fluorescent DNA base modifications and substitutes: multiple fluorophore labeling and the DETEQ concept. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1130:122-130.
74. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.

75. Vet JAM, Marras SA. EDesign and optimization of molecular beacon real-time polymerase chain reaction assays. In: Herdewijn P (ed.). Oligonucleotide synthesis: methods and Applications. Totowa, NJ: Humana Press, 2004:273-290.
76. Vet J, Majithia A, Marras S, Tyagi S, Dube S, Poiesz B, et al. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6394-6399.
77. Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by Taqman real-time PCR. *Clin Med Res* 2005;3:176-185.
78. Schaeffer A, Henrich B. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TagMan PCR. *BMC Infect Dis* 2008;8:56.
79. Takahashi T, Tamura M, Takahashi SN, Matsumoto K, Sawada S, Yokoyama E, et al. Quantitative nested real-time PCR assay for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *J Neurol Sci* 2007;255:69-76.
80. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:583-607.
81. Lindgren G, Vene S, Lundkvist A, Falk KI. Optimized diagnosis of acute dengue fever in Swedish travelers by a combination of reverse transcription-PCR and immunoglobulin M detection. *J Clin Microbiol* 2005;43:2850-2855.
82. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T, Borysiewicz LK, et al. Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2001;9:3204-3212.
83. Schweitzer B, Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:21-27.
84. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T, Borysiewicz LK, et al. Novel Method for Detection, Typing, and Quantification of Human Papillomaviruses in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2001;39:3204-3212.
85. Buruoa C, Garnier M, Silvain C, Fauchère JL. Quadruplex real-time PCR assay using allele-specific scorpion primers for detection of mutations conferring clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2008;46:2320-2326.
86. Di Marco E, Cangemi G, Filippetti M, Melioli G, Biassoni R. Development and clinical validation of a real-time PCR using a unique molecular Scorpion-based probe for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates. *New Microbiol* 2007;30:415-421.
87. Veenstra T. Mass spectrometry: the foundation of Proteomics. In: Veenstra T, Yates J, (eds.) *Proteomics for biological discovery*. J Wiley and sons 2006:1-18.
88. Burlak C, Hammer CH, Robinson MA, Whitney A, McGavin MJ, Kreiswirth BN, et al. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced *in vitro* and during infection. *Cell Microbiol* 2007;9:1172-1190.
89. Cowan ML, Vera J. Proteomics: advances in biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 2008;5:21-23.
90. Hodgetts A, Levin M, Kroll JS, Langford PR. Biomarker discovery in infectious diseases using SELDI. *Future Microbiol* 2007;2:35-49.
91. Blyn LB, Hall TA, Libby B, Ranken R, Sampath R, Rudnick K, et al. Rapid detection and molecular serotyping of adenovirus by use of PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2008;46:644-651.
92. Sampath R, Hall TA, Massire C, Li F, Blyn LB, Eshoo MW, et al. Rapid identification of emerging infectious agents using PCR and electrospray ionization mass spectrometry. *Ann NY Acad Sci* 2007;1102:109-120.
93. Lipkin WI. Pathogen discovery. *Plos Pathog* 2008;4.
94. Drummond TG, Hill MG, Barton J. Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol* 2003;21:1192-1199.
95. Sra KK, Torres G, Rady P, Hughes TK, Payne DA, Tyring SK. Molecular diagnosis of infectious diseases in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:749-765.