

Reacción de la polimerasa en cadena. ¿Debe incorporarse en los laboratorios de microbiología clínica?

J.C. Palomares*, M.J. Rodríguez Iglesias**, R.J. Cano*** y M.J. Torres*

*Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla, **Departamento de Microbiología. Universidad de Cádiz. ***Biological Sciences Department. California Polytechnic State University. San Luis Obispo. CA 93407 EE.UU.

amplificación de ácidos nucleicos, ADN, reacción en cadena de la polimerasa

La descripción de la técnica de amplificación del DNA mediante la polimerasa termorresistente (PCR) generó inmediatamente el interés en su uso para detectar los microorganismos infecciosos, ya que, en principio aportaba ventajas substanciales sobre las técnicas existentes¹. Al tratarse de una técnica que pone de manifiesto directamente el ácido nucleico de los microorganismos, deberá superar con amplitud a todas las técnicas que requieran su crecimiento o detecten antígenos específicos del propio microorganismo o la respuesta inmune generada por él.

Ventajas. Entre las ventajas que aporta esta nueva tecnología, destacan: rapidez, pues en sólo tres horas puede detectarse la presencia de cualquier microorganismo buscado en la muestra; especificidad, pues unos cebadores bien elegidos hibridarán exclusivamente con la secuencia de ácido nucleico buscada, la ampliarán y facilitarán su detección, y sensibilidad, ya que bastaría una sola molécula del ácido nucleico diana para obtener millones de copias en apenas dos horas de amplificación. Estas tres propiedades hacen de la PCR una técnica rápida, fiable y segura para la detección de microorganismos en muestras clínicas.

Otras ventajas que cabe citar son las siguientes: no requiere ningún tipo de respuesta por parte del huésped; los microorganismos a detectar no tienen que estar multiplicándose, ni tan siquiera ser viables o infecciosos (provirus); las secuencias a detectar pueden ser de ADN o ARN; las muestras pueden corresponder a cualquier líquido o tejido del organismo (incluso tejidos fijados o incluidos en bloques); su estado de conservación también es hasta cierto grado indiferente (siempre que se conserve la secuencia diana) y, además, al poseer una sensibilidad muy alta, no se requieren isótopos radiactivos (que suelen ser más sensibles con otras técnicas) para detectar las secuencias amplificadas o amplicones.

Mediante esta técnica también se puede cuantificar el número inicial de microorganismos existentes en la muestra y a medida que se vaya mejorando, se llegará a la automatización de su realización y lectura.

Todos estos puntos permiten predecir que la razón costo/beneficio de la aplicación de esta tecnología al diagnóstico de enfermedades infecciosas disminuirá drásticamente, por lo que podrá en muchos casos sustituir a muchas técnicas tradicionales (si no lo ha hecho ya en algunos casos es por ignorancia de las técnicas de biología molecular por muchos microbiólogos).

Correspondencia: Dr. J.C. Palomares.
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.
Apartado 914. 41080 Sevilla.

Manuscrito recibido el 24-3-1992

Med Clin (Barc) 1992; 99: 265-268

Inconvenientes. No obstante, se han de considerar aspectos negativos que implicarán la introducción de la PCR en los laboratorios de microbiología clínica. El laboratorio debe sufrir un acondicionamiento expreso para instaurar la técnica. Deben existir al menos dos (mejor tres) habitaciones bien diferenciadas, en una de las cuales y a ser posible en cabina de seguridad, se prepararán las muestras y se mezclarán con los componentes de la reacción y en otra, se realizará la amplificación y análisis de los productos. Esto es imprescindible debido al alto grado de contaminaciones cruzadas que pueden tener lugar entre los tubos donde se encuentran las muestras ya amplificadas y los tubos donde se preparan nuevas muestras, si no se tiene un cuidado extremo en utilizar distintos materiales, desde pipetear hasta los propios cebadores usados. Algunos autores han tenido que retractarse públicamente por resultados obtenidos tras contaminaciones por amplicones de reacciones previas².

Esta posibilidad de contaminación obliga, asimismo, a definir controles muy estrictos, positivo débil (muestra que se amplifica con seguridad pero con bajo número de copias), negativo (sin ADN molde) y control múltiple de reactivos usados sin el ácido nucleico ya la optimización de la técnica para cada tipo de microorganismo a detectar, que incluye encontrar las condiciones óptimas de cada componente de la reacción de amplificación (son al menos 8 variables) y del proceso de amplificación (temperaturas, tiempos y otros).

Por otro lado, los sistemas actuales de detección del producto pasan, generalmente, por la realización de una hibridación y electroforesis, y al final, para poder realizar la PCR, debe contarse con un personal que posea un alto grado de preparación en la tecnología usada en biología molecular, aunque en la actualidad se trabaja para obtener sistemas capaces de realizar la lectura directamente en placas de *microtiter*, de una forma semejante a la prueba ELISA

Análisis. La consecuencia de lo anteriormente descrito es que antes de comenzar a utilizar la PCR, deben definirse claramente los criterios que debe cumplir la aplicación concreta que se quiera desarrollar, para evitar aplicaciones académicas o inútiles que sólo conllevarían sobrecarga de trabajo y gastos no justificables al laboratorio.

Los parámetros a considerar son los siguientes: 1) incidencia en nuestro medio de la enfermedad infecciosa que se diagnostica; 2) beneficios que el diagnóstico aportará al paciente, al conocimiento de la enfermedad o a la mejora de otras técnicas usadas; 3) infraestructura del laboratorio y costo de adaptación; 4) costo de material fungible y tiempo de trabajo en comparación con las técnicas tradicionales aplicadas al mismo diagnóstico, si las hubiese, valorando también la rapidez y ganancia en sensibilidad y especificidad; 5) formación técnica y capacidad de aprendizaje del personal que desarrollará la tarea, y 6) tiempo empleado para diseñar el protocolo y su optimización.

Aplicaciones actuales

La PCR se ha aplicado ya con éxito al diagnóstico de algunas enfermedades infecciosas (tablas 1, 2 y 3) y su uso puede agruparse en cuatro epígrafes.

Identificación. Muchos microorganismos requieren para su identificación técnicas de larga duración, bien sea por su complejidad o por su lento crecimiento. Además, muchas veces estas técnicas no poseen suficiente capacidad discriminadora, por lo que la identificación final queda cuestionada. La amplificación del ADN, por su alta especificidad y rapidez, puede resolver ambos problemas de forma definitiva.

En la actualidad, ya existen trabajos que han aplicado la PCR para ello, especialmente en la identificación de las especies del género *Mycobacterium*, donde se han producido dos tipos de aproximaciones: en el primero, se amplifica el ADN correspondiente a secuencias elegidas del ARN 16S. El ADN producto de la amplificación será posteriormente secuenciado, también con la PCR y el resultado, analizado mediante ordenador, permite detectar pequeñas diferencias en la secuencia de bases características de cada especie⁶; la segunda aproximación consiste en amplificar ciertos fragmentos comunes de las distintas especies y luego aplicar sondas específicas de cada especie, sintetizadas con la PCR^{7,8}, para después, mediante hibridación, determinar a cuál de ellas pertenece el microorganismo estudiado^{9,10}. Ambos métodos sirven inicialmente para la detección además de para la identificación, lo que puede realizarse en horas, en comparación con lo tardío de la detección e identificación por métodos tradicionales, aun contando con el Bactec radiométrico.

Detección como complemento o sustitución por mejora de otros métodos. Para que se acepte la PCR como método que sustituya a otros anteriores, se requiere que los trabajos comparativos demuestren una clara superioridad sobre ellos en tiempo, eficacia y costo/beneficio. No hacerlo así sería una mala utilización de la técnica y entonces sólo debería considerarse como técnica complementaria o confirmatorio para caso de resultados ambiguos, posibles fallos de técnicas, muestras escasas o sospecha de mal transporte o almacenamiento.

1. Método complementario. Un ejemplo de este caso sería la detección de *Escherichia coli* enterotoxigénica mediante amplificación del gen responsable de la síntesis de enterotoxina^{11,12}. Existen métodos para detectar la producción de toxina en cultivos celulares e incluso, mediante sondas de ADN para hibridación^{13,14}, que han dado buenos resultados. El uso de la PCR sería recomendada cuando se requiera una sensibilidad extrema (por ejemplo, en alimentos).

2. Sustitución de otros métodos. El diagnóstico de la enfermedad de Lyme no es tarea sencilla. El aislamiento de *Borrelia burgdorferi* se consigue en pocas ocasiones y por lo general, se basa en sospecha clínica apoyada en técnicas serológicas¹⁵. Existen casos bien documentados, donde la serología no ha sido positiva o es confusa y la demostración de las espiroquetas en los pacientes es muy difícil¹⁶. Hoy día, existen diversos trabajos en los que se ha logrado poner de manifiesto la presencia de entre 10 a 50 espiroquetas en una muestra mediante amplificación de ADN¹⁶⁻¹⁸, por lo que la PCR debería constituirse en el método de elección para el diagnóstico de esta infección.

A pesar de usar la detección de anticuerpos contra la proteína C-100 del virus de la hepatitis C (VHC) para la exclusión de los donantes, no se ha eliminado el riesgo, ya que algunos

TABLA 1

Aplicaciones de la reacción de la polimerasa en cadena al diagnóstico de las infecciones bacterianas

Complementar o mejorar métodos existentes	Métodos nuevos
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>Mycobacterium spp.</i>	
<i>Leptospiras</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Agente de la angiomatosis bacilar (<i>Rickettsia</i>)
<i>Rickettsia typhi</i>	
<i>Rickettsia prowazekii</i>	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	

TABLA 2

Aplicaciones de la reacción de la polimerasa en cadena al diagnóstico de las infecciones víricas

Complementar o mejorar métodos existentes	Métodos nuevos
Epstein Barr	Papillomavirus
Hepatitis B y C	Hepadnavirus
Herpes simple 1, 2 y 6	HIV-Provirus
Citomegalovirus	HIV tipo 2
Varicella - Zóster	Linfotrópico - T humano I
Picornavirus	Linfotrópico - T humano II
Polyomavirus	HTLV 1
Adenovirus	
Rotavirus	
Virus	
Parvovirus B19	
Virus BK y JC	
Hepatitis C	

TABLA 3

Aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa al diagnóstico de las enfermedades parasitarias

Complementar o mejorar métodos existentes	
Naegleria fowleri	Toxoplasma gondii
Typanosoma cruzi	Plasmodium falciparum
Entamoeba histolytica	Pneumocystis carinii

portadores del VHC no presentan anticuerpos. El uso de la PCR permite detectar el genoma vírico en estos casos¹⁹. La PCR ha demostrado ser muy útil en la detección de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus linfotrofo para los linfocitos T humanos (HTLV); ambos se han detectado directamente en los mononucleares de sangre periférica de personas seropositivas¹⁹⁻²⁴.

Por otra parte, existen algunas lagunas en las pruebas comercializadas para detectar algunos anticuerpos o antígenos²⁵ y el cultivo es notoriamente difícil, con variación en la sensibilidad del mismo entre los distintos laboratorios²⁴.

La PCR se ha usado también para detectar ADN del VIH en recién nacidos de madres seropositivas^{26,27}, donde los anticuerpos maternos hacen difícil el diagnóstico, por persistir hasta 15 meses.

Se ha comprobado también que la PCR detecta el ADN de

HIV al menos seis meses antes de que se produzca la seroconversión al Western blot²⁸ y que al poder amplificar ADNc obtenido con la transcriptasa inversa a partir de secuencias de ARNm del virus, es posible diferenciar la infección latente de la transcripción activa del virus²⁹⁻³¹. Finalmente, debido a la alta sensibilidad de la PCR, parece especialmente definida para monitorizar el efecto del tratamiento antivírico^{29,31}.

Descubrimiento de nuevos patógenos. Relman et al³² han estudiado el posible agente causal de la angiomatosis bacilar, que hasta ahora se presumía de origen infeccioso porque en los tejidos se observaban microorganismos cuya identidad permanecía desconocida por falta de su cultivo. Estos autores, partiendo de muestras de tejidos de pacientes con dicha enfermedad, extrajeron el ADN y usando cebadores preparados frente a las regiones conservadas de la secuencia del ARN-16S, amplificaron los fragmentos de ácido nucleico correspondiente, estudiaron dicha secuencia y prepararon nuevos cebadores más específicos para el organismo en cuestión. Estos nuevos cebadores amplifican una secuencia que, mediante análisis con ordenador, ha demostrado ser similar a la secuencia correspondiente de *Rickettsia quintana* y también al resto de las *Rickettsias*.

Esta misma técnica podría ser aplicable a otras enfermedades supuestamente infecciosas (bacterianas) aunque sin etiología bien definida y además, podría dar lugar a la identificación de microorganismos previamente desconocidos (especialmente virus) que pueden producir patología en relación con otros microorganismos perfectamente identificados²⁵.

Nueva prueba patrón para el diagnóstico. La amplificación del ADN puede convertirse perfectamente en muchos casos en la prueba patrón frente a cuyos resultados comparar la eficacia de todas las demás pruebas existentes o de nuevo desarrollo. Esto es posible, porque la PCR consigue disminuir los límites inferiores de detección de los microorganismos a los que se aplica, gracias a su alta sensibilidad y especificidad.

Perspectivas futuras

Independientemente de lo ya expuesto como realidades de la PCR, se pueden prever con mayores probabilidades de éxito los usos futuros de esta técnica.

Identificación de microorganismos de difícil o lento crecimiento.

1. Las polimerasas termostables pueden aceptar desoxirribonucleósidos trifosfatos modificados como sustratos, por lo que pueden usarse para marcar fragmentos de ADN con radioisótopos o productos no isotópicos como biotina, digoxigenina u otros nucleótidos con alguna molécula marcadora^{7,8,33}.

Ello nos conduce a la posibilidad de sintetizar rápidamente y en grandes cantidades sondas que posteriormente podrán usarse para hibridación aplicada a la identificación y detección de microorganismos, bien directamente en el proceso de amplificación o, posteriormente, mediante marcado al azar o traslación de mella del ADN amplificado¹⁸.

2. **Fingerprinting.** Otra aplicación, muy usada actualmente para identificar microorganismos, consiste en utilizar el fragmento de ADN amplificado como base para la acción de diversas endonucleasas de restricción y, después de analizar los fragmentos creados, detectar diferencias incluso de una sola base en la secuencia amplificada, lo que podrá servir, no sólo para identificar los microorganismos, sino también

para realizar estudios epidemiológicos infinitamente más precisos que los realizados con técnicas convencionales. Esto permite, asimismo, estudios evolutivos del ADN de los microorganismos³⁴⁻³⁶.

Otra aplicación posible es la secuenciación del *amplicón*, pero es una técnica más costosa y larga que probablemente se usará únicamente en investigación^{6,37,38}.

Detección de nuevos microorganismos. Es fácil prever que la amplificación de ADN, en un futuro próximo, podrá detectar un mayor número de microorganismos, a medida que se vayan desarrollando nuevos cebadores para aquellos aún no analizados. Sin embargo, no será útil aplicarla a cualquier microorganismo, sino sólo a aquellos que cumplan algunos de los condicionantes que los hagan candidatos y que ya se han analizado anteriormente: tiempo de cultivo o identificación excesivamente largos, técnicas muy complejas y caras o poco eficaces y difícil cultivo del microorganismo, entre otros.

También hará posible la detección de nuevos microorganismos productores de enfermedades infecciosas, pero no identificados todavía, como el caso citado de la angiomatosis bacilar³².

Cuantificación. Un desarrollo muy esperado de la amplificación del ADN y que está siendo resuelto muy recientemente, es la posibilidad de cuantificar el número de microorganismos presentes en una muestra o su actividad. Realizando diluciones seriadas de las muestras, se puede calcular fácilmente el número de copias iniciales del gen amplificado o del ARNm lo que podría indicarnos si el microorganismo se encuentra en actividad y es, por tanto, infeccioso.

Entre las aplicaciones de la cuantificación en microbiología clínica se deducen claramente tres muy importantes, que son: 1) la cuantificación del ARNm permitirá conocer cuándo una infección crónica vuelve a reactivarse, por ejemplo en la tuberculosis durante el síndrome de inmunodeficiencia adquirida; 2) detección de los niveles de producción de ARNm a partir de los cuales se puede considerar a una persona enferma, aunque clínicamente aún no se detecten síntomas (infección por el virus de la inmunodeficiencia humana), y 3) control de la eficacia del tratamiento; debido a su alta sensibilidad, la PCR sería útil en este campo, especialmente en el control de la terapia antivírica^{25,29,31}.

Predicción de enfermedades. Con el desarrollo de la PCR, al detectar secuencias específicas de los microorganismos, podrán detectarse aquellas secuencias de los mismos y del huésped cuya presencia esté relacionada con el desarrollo crónico o agudo de la enfermedad, o incluso, con el hecho de si se podría desarrollar la enfermedad o no en el futuro en función de la presencia de dichas secuencias específicas. Ello también permitirá estudiar la influencia del propio medio ambiente en este hábitat genético concreto.

Por tanto, el despistaje genético permitirá encontrar genes microbianos predisponentes en personas sanas, genes predisponentes de enfermedad aguda o crónica y deducir la respuesta del organismo concreto frente a una infección.

Todo ello, junto con esta misma aplicación al estudio de desórdenes genéticos o enfermedades hereditarias, dará lugar probablemente al desarrollo en los hospitales de unidades de detección genética. En este sentido, la PCR no se considerará como una herramienta para responder a problemas clínicos concretos, sino más bien como una herramienta imprescindible para la medicina preventiva en todas las especialidades.

Medicina sanitaria. Otra indudable aplicación de futuro de la PCR será la detección de microorganismos patógenos en

agua, alimentos, suelo y vegetales. Las pruebas que se diseñen, deberán ser rápidas y sencillas. La PCR ya ha sido aplicada para amplificar secuencias de organismos presentes en muestras medio ambientales³⁹⁻⁴². Tras la amplificación por PCR, se ha podido poner de manifiesto la presencia de 1 a 5 células de *E. coli* en 100 ml de agua y de una célula por gramo de *P. cepacia*, lo que representa disminuir el límite de detección 1.000 veces y con una prueba que se realiza en 3-4 horas.

Conclusiones

La PCR es, por tanto y a pesar de algunos inconvenientes, una herramienta poderosa y práctica en microbiología clínica, por su rapidez, especificidad, sensibilidad y las otras ventajas ya enumeradas anteriormente. Sus aplicaciones a la identificación de microorganismos conocidos y al descubrimiento de otros nuevos, a la detección directa en muestras clínicas de todos ellos, al control del tratamiento y de la actividad de la infección y, posiblemente, a la predicción de enfermedades, hacen presumir que, si se consigue su simplificación y el uso de marcadores no radiactivos, la PCR ocupará un lugar prominente, en los laboratorios de microbiología clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Estivill X, Nunes V. Amplificación del DNA y aplicaciones en medicina. *Med Clin (Barc)* 1991; 96: 341-349.
2. Ferrell PJ, Tidy J. Retraction: human papillomavirus subtype 16b. *Lancet* 1989; 2: 1.535.
3. Wahlberg J, Lundeberg J, Hultman T, Uhlén M. General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid phase genomic sequencing of the positive samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6.569-6-573.
4. Keller GH, Huang DP, Shih JWK, Manak MM. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1.411-1.416.
5. Keller GH, Huang DP, Manak MM. Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA by polymerase chain reaction amplification and capture hybridization in microtiter wells. *J Gen Microbiol* 1991; 29: 638-641.
6. Rogall T, Flohr T, Böttger EC. Differentiation species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 1.915-1.920.
7. Tarleton J, Schwartz CE. Using the polymerase chain reaction to maintain DNA probe inventories in clinical and diagnostic laboratories. *Clin Genet* 1991; 39: 121-124.
8. Syrjänen S, Anderson B, Juntunen L, Syrjänen K. The use of polymerase chain reaction in generation of biotinylated human papillomavirus DNA probes for *in situ* hybridization. *J Virol Meth* 1991; 31: 147-160.
9. Pao CC, Benedict Yen TS, Jinn-Bang YOU, Juehn-Shin MAA, Fiss EH, Chang CHH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1.877-1.880.
10. Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis* 1990; 162: 193-200.
11. Olive DM. Detection of *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 261-265.
12. Olive DM, Atta AI, Setti SK. Detection of toxigenic *Escherichia coli* using biotin-labelled DNA probe following enzymatic amplification of the heat labile toxin gene. *M Ccil Probes* 1988; 2: 47-57.
13. Bialkowska-Hobrzanska H. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by dot blot hybridization with biotinilato probes. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 338-343.
14. Moseley SL, Huq I, Alim AL, So, M, Samadpour-Motalebi M, Falkow S. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *J Infect Dis* 1980; 142: 892-898.
15. Guerrero A, Quereda C, Escudero R, Cobo J, Morcillo R, Martí-Belda P. Diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme. Un problema pendiente.

- Enferm Infecc Microbiol Clin 1991; 9: 335-338.
16. Rosa PA, Schwan TG. A specific and sensitive assay for the Lyme diseases spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1989; 160: 1.018-1.029.
17. Persing DH, Telford SR III, Spielman A, Barthoid SW. Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 566-572.
18. Malloy DC, Nauman RK, Paxton H. Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1.089-1.093.
19. Soriano V, Panplana M, Nedjar S et al. Marcadores serológicos y genómicos del virus de la hepatitis C en receptores con hepatitis no A no B. *Med Clin (Barc)* 1991; 97: 764-768.
20. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239: 295-297.
21. Kwok S, Ehrlich G, Poiesz B, Kalish R, Sninsky JJ. Enzymatic amplification of HTLV-1 viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. *Blood* 1988; 72: 1.117-1.123.
22. Bhagavati S, Ehrlich G, Kula RW et al. Detection of human T-cell lymphoma/leukemia virus type 1 DNA and antigen in spinal fluid and blood of patients with chronic progressive myelopathy. *N Eng J Med* 1988; 318: 1.141-1.147.
23. Loche M, Mach B. Identification of HIV-infected seronegative individual by a direct diagnostic test based on hybridisation to amplified viral. *Lancet* 1988; 2: 418-421.
24. Soriano V, Tor J, Ribera A, Clotet B. Diagnóstico de la infección por retrovirus humanos mediante técnicas de amplificación/hibridación de ácidos nucleicos. *Med Clin (Barc)* 1990; 95: 262-264.
25. Schochetman G, Ou CY, Jones WK. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1988; 158: 1.154-1.157.
26. Rogers M. Montefiore Medical Center HIV Perinatal Transmission Study Group, New York City Collaborative Study Group for Maternal Transmission of HIV. Prospective study of virologic parameters for infants born to HIV seropositive women (resumen 7257). En: Program and abstracts of the IVth International Conference on AIDS. Estocolmo 1988.
27. Wolinsky S, Mack D, Yogev R et al. Direct detection of HIV infection in pediatric patients and their mothers by polymerase chain reaction (PCR) procedure (resumen 1646). En: Program and abstracts of the IVth International Conference on AIDS. Estocolmo 1988.
28. Wolinsky S, Rinaldo C, Farzedegan H et al. Polymerase chain reaction (PCR) detection of HIV provirus before HIV seroconversion (resumen 1099). IVth International Conference on AIDS. Estocolmo 1988.
29. Hart C, Schochetman G, Spira T et al. Direct detection of HIV RNA expression in seropositive persons. *Lancet* 1988; 2: 596-599.
30. Byrne BC, Li JJ, Sninsky J, Poiesz BJ. Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 4.165.
31. Murakawa GJ, Zaia JA, Spallone PA et al. Direct detection of HIV RNA from AIDS and ARC patient samples. *DNA* 1988; 7: 287-295.
32. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of the bacillary angiomatosis. *IJ Engl J Med* 1990; 323: 1.573-1.580.
33. Lo YMD, Mehal WZ, Fleming KA. Rapid production of vector-free biotinylated probes using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 8.719.
34. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols. A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, Inc.
35. Rodríguez P, Vekris A, deBarbeyrac B, Dutilh B, Bonnet J, Bebear C. Typing of *Chlamydia trachomatis* by restriction endonuclease analysis of the amplified major outer membrane protein gene. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1.132-1.136.
36. Tanich E, Burchard GD. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 250-255.
37. Patel RJ, Fries JWU, Piessens WF, Wirth DF. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 513-518.
38. Eggerding FA, Peters J, Lee RK, Inderlied CB. Detection of *Rubella* virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplified DNA. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 945-952.
39. Bej AK, Steffan RJ, DiCesar J, Haff L, Atlas RS. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction (PCR) and genes probes. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 307-314.
40. Chaudry GR, Toranzos GA, Bhatti AR. Novel method for monitoring genetically Engineered microorganisms in the environment. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 1.301-1.304.
41. Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1.257-1.261.
42. Steffan RJ, Atlas RM. DNA enhance detection of genetically Engineered bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 2.185-2.191.