



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

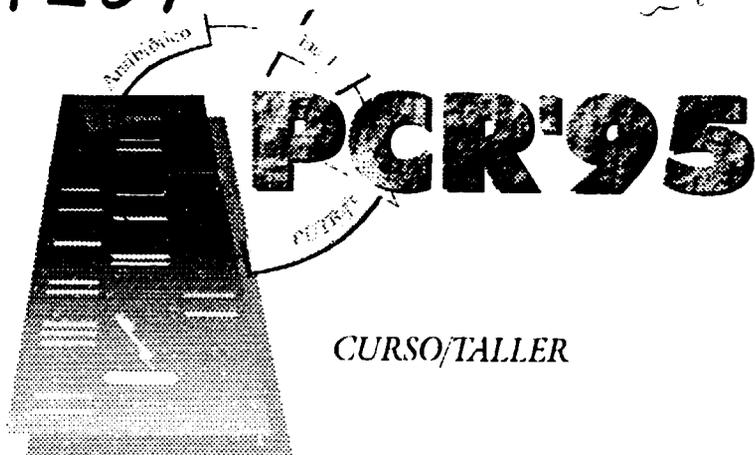
CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

21264

Contact No 35/100



CURSO/TALLER

**"PCR* Y SONDAS NO RADIOACTIVAS PARA EL DIAGNOSTICO DE
ENFERMEDADES TROPICALES E INFECCIOSAS
DE MAYOR PREVALENCIA EN LA
SUBREGION CENTROAMERICANA"**

3-7 julio de 1995

Guatemala, C.A.

PROGRAMA

Centro de Estudios en Salud
Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala

Area de Ciencia y Tecnología
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá

Programa de Biología Molecular Aplicada y
Transferencia de Tecnología Apropriada
Universidad de California en San Francisco



Carátula diseñada por:

Gabriel Eduardo Guzmán Laparra, M.Sc.

SKETCH

Telefono (502 2) 530283

Documento preparado y editado por:

Ricardo Luján, B.A., M.Sc., Ph.D.
Centro de Estudios en Salud
Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

Teléfonos (502 2) 380336 al 40
Telefax (502 2) 380212
correo electrónico: rlujan@uvg.edu.gt

3 de julio de 1995
Guatemala de la Asunción, Guatemala, C.A.

LUGAR

Auditorium Principal
Laboratorios, Area de Ciencia y Tecnología
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)
Calzada Roosevelt Zona 11
01011 Guatemala, Guatemala, C.A.

Teléfonos (502 2) 723762 al 67
Telefax (502 2) 736529

* El proceso PCR está protegido por patentes propiedad de Hoffmann-LaRoche, Inc.
Aclaratoria: El uso de nombres comerciales no representa en ningún momento un endoso por las instituciones organizadoras

INTRODUCCION

A escasos años de iniciar un nuevo siglo, los países desarrollados experimentan cambios que inciden directa e indirectamente en la vida y bienestar de los habitantes de los países menos desarrollados. Tales cambios están profundamente relacionados con los nuevos logros tecnológicos y adelantos científicos; es una revolución tecnológica e intelectual la que caracteriza el final del Siglo Veinte. Países como Guatemala y los demás de la subregión Centroamericana enfrentan el reto de la sobrevivencia y el despegue del subdesarrollo. Por lo tanto, cada vez es mayor la necesidad de formar el recurso humano calificado, capaz de comprender los conceptos innovadores, manipular las nuevas tecnologías e integrar los conocimientos para proveer bienes y servicios tendientes a mejorar las condiciones de vida propias y, por ende, las de la sociedad de la cual es parte fundamental.

El Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, el Area de Ciencia y Tecnología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá y el Programa de Biología Molecular Aplicada y Transferencia de Tecnología Apropriada de la Universidad de California en San Francisco, reconocen la necesidad de divulgar y transmitir los conocimientos que dan lugar al avance de la ciencia y la tecnología y han incorporado a sus actividades de investigación programas de Formación de Recursos Humanos, iniciados desde hace varios años.

El **Curso/Taller *PCR '95** es una continuación en la secuencia de varios cursos teórico-prácticos que se originaron en Guatemala en 1991 con la particularidad de involucrar, preferentemente, a participantes de la subregión Centroamericana y países de Norte y Sur América. El **Curso/Taller *PCR '95** se ha modelado siguiendo los objetivos y experiencias del Programa de Biología Molecular Aplicada y Transferencia de Tecnología Apropriada en donde las tecnologías moleculares, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y las sondas de ADN no radioactivas, pueden ser aplicadas para el diagnóstico y epidemiología de enfermedades tropicales e infecciosas, especialmente aquellas prioritarias que afectan a la salud de la mayoría de los habitantes de Centro América y Panamá. Las tecnologías moleculares, cuando se implementan adecuadamente, son más rápidas, más sensibles, más específicas, seguras y de menor costo que otros métodos actualmente existentes. El **Curso/Taller *PCR '95**, y los sucesivos, proponen introducir y consolidar estas tecnologías en forma práctica y efectiva en los países con recursos limitados y de acuerdo a sus propias necesidades. Por lo tanto, el diseño del **Curso/Taller** es involucrar en forma participativa a científicos nacionales e internacionales, para que reflejen sus intereses específicos en el uso de técnicas moleculares para aplicaciones desde el diagnóstico hasta la investigación científica básica.

El alto nivel académico y técnico de los conferencistas e instructores, el diseño personalizado de las sesiones prácticas y el ambiente científico hará del **Curso/Taller *PCR '95** un evento único en su clase, cuyos beneficios serán aprovechados por aquellas personas involucradas en las actividades de ciencia y tecnología en cualquiera de los sectores productivos y académicos de nuestro país y de Centro América y Panamá.

Ricardo Luján, B.A., M.Sc., Ph.D.

INDICE

	página
Objetivos & Contenido General del Curso/Taller	2
Participantes & Requisitos	3
Admisión & Apoyo	3
Evaluación	3
Coordinadores	4
Profesores Principales	5
Organizadores	6
Patrocinadores	7
Esquema General de Actividades del Curso/Taller	8
Horario del Curso/Taller	10
Resumen de las Conferencias	13
<i>Curriculum Vitae</i> de los Profesores Principales	43
Listado de Participantes	71
Listado de Organizaciones	85
Notas	91

OBJETIVOS & CONTENIDO GENERAL DEL CURSO/TALLER

OBJETIVOS

Las técnicas moleculares son indispensables en un laboratorio moderno, especialmente desde la aparición de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ("Polymerase Chain Reaction", PCR). Estas pueden ser aplicadas al diagnóstico y epidemiología de las enfermedades tropicales e infecciosas. En algunos casos, cuando se implementan apropiadamente, estas técnicas son más rápidas, específicas, sensibles, seguras y económicas que otros métodos existentes. Este curso propone proveer una introducción teórica y práctica a las técnicas de biología molecular, con base en patógenos de enfermedades prevalentes y de importancia en Centro América y Panamá, con los siguientes objetivos:

1. Proveer a los participantes con una visión teórica de técnicas en biología molecular, en particular, de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y del uso de sondas de ADN no radioactivas.
2. Proveer a los participantes con una experiencia práctica elemental en la aplicación de la PCR y uso de sondas de ADN no radioactivas en laboratorios con recursos limitados para:
 - (a) el diagnóstico de enfermedades tropicales e infecciosas;
 - (b) detección de patógenos en alimentos.

CONTENIDO

Teoría.- Nociones elementales de biología molecular. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR): origen, desarrollo y aplicaciones. Uso de sondas de ADN no radioactivas. Información básica sobre los agentes patógenos a detectar (*Leishmania*, tuberculosis, dengue y cólera): Epidemiología, diagnóstico "clásico" y diagnóstico molecular.

Práctica.- Investigación diagnóstica: Detección e identificación de especies de *Leishmania*. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas. Tipificación de virus del Dengue. Detección de *Vibrio cholerae* en muestras de alimentos.

Generales.- PCR y sondas de ADN no radioactivas en condiciones de bajos recursos.

Perfil de investigación.- Los participantes deberán desarrollar un breve perfil de investigación para efectuar un estudio piloto en donde se apliquen las técnicas de biología molecular a aspectos relevantes de salud (investigación clínica o epidemiológica).

PARTICIPANTES & REQUISITOS

El Curso/Taller tendrá cupo para un máximo de 24 participantes (para la parte práctica), provenientes de países de habla hispana de Centro América y El Caribe. Los estudiantes deben ser graduados universitarios, preferiblemente con uno o dos años de trabajo de laboratorio, conocimientos básicos de biología molecular y capaces de leer y entender el idioma inglés. Las conferencias magistrales durante las mañanas estarán abiertas, sin costo alguno, a cualquier persona que desee asistir.

ADMISION & APOYO

Los coordinadores seleccionarán a los participantes del Curso/Taller en base al formulario de inscripción y los documentos de solicitud presentados y que estén avalados por su institución en donde certifiquen el nivel de grado, sus actividades investigativas actuales y experiencia práctica, y las razones que motivan su interés en el curso. La selección tendrá en cuenta también el balance de asistencia entre los diferentes países y la fecha de llegada de las solicitudes. Se debe emplear Fax, correo courier o correo electrónico para hacer llegar la información a la dirección de los Coordinadores del Curso/Taller. Existirá un fondo de ayuda económica para un número muy limitado de participantes, que cubre: (a) USD \$ 200.00 de cuota de inscripción, (b) máximo de USD \$ 300.00 para pasaje, (c) alojamiento y alimentación por los días del curso. Los candidatos deben argumentar la necesidad de apoyo financiero. La fecha límite de recepción de las solicitudes y la cuota de inscripción [USD \$ 200.00] es el 30 de abril de 1995.

EVALUACIONES

Se realizará una evaluación final sobre teoría y práctica y se emitirá un certificado de asistencia y constancia de evaluación.

COORDINADORES

Eva Harris, B.A., Ph.D., Intercampus Program in Molecular Parasitology, University of California at San Francisco, Laurel Heights, Suite 150, 3333 California Street, San Francisco, CA 94118

Ricardo Luján, B.A., M.Sc., Ph.D., Centro de Estudios en Salud, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, 18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III, Apartado Postal 82, 01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

Olga Rebeca Torres Bolaños de Matute, Q.B., M.Sc., Area de Ciencia y Tecnología, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Calzada Roosevelt Zona 11, Apartado Postal 1188, 01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

Gabriel Eduardo Guzmán Laparra, Licenciado, M.Sc., Centro de Estudios en Salud, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, 18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III, Apartado Postal 82, 01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

PROFESORES PRINCIPALES

Flora Eugenia Arana Figueroa, Q.B., Laboratorio de Leishmaniasis, Centro de Investigaciones y Adiestramiento en Entomología Médica (MERTU/G), c/o. Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, Apartado Postal 82, 01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

Alejandro Antonio Belli, M.Sc., Ph.D., Departamento de Parasitología, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Apartado 2900, Managua, Nicaragua, C.A.

Floralma Cano Granados, Q.B., Unidad de Alimentos, Area de Ciencia y Tecnología, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Apartado Postal 1188, 01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

Annabelle Ferrera Boza, M.Sc., Departamento de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Ciudad Universitaria, Tegucigalpa, M.D.C., Honduras, C.A.

Eva Harris, B.A., Ph.D., Intercampus Program in Molecular Parasitology, University of California at San Francisco, Laurel Heights, Suite 150, 3333 California Street, San Francisco, CA 94118.

Ricardo Luján, B.A., M.Sc., Ph.D., Centro de Estudios en Salud, Insuato de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, 18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III, Apartado Postal 82, 01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

Eyda Lissette Mendía Alarcón de Campollo, Q.B., Laboratorio Central y de Referencia Nacional en Tuberculosis, Departamento de Laboratorios Centrales, Dirección General de Servicios de Salud, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 9a. Avenida 14-65 Zona 1, 01001 Guatemala, Guatemala, C.A.

Zaida Lucrecia Menéndez Monjes de Escalante, M.D. Unidad de Laboratorios, Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Dirección General de Servicios de Salud, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 5a. Avenida 11-40 Zona 11, 01011 Guatemala, Guatemala, C.A.

Alvaro Molina Cruz, Licenciado, B.A., Ph.D., Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala, Apartado Postal 82, 01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

Leila Smith, B.Sc., M.Sc., PROMEGA CORPORATION, 1379 Church Street, San Francisco, CA 94114-3294.

Olga Rebeca Torres Bolaños de Matute, Q.B., M.Sc., Area de Ciencia y Tecnología, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Apartado Postal 1188, 01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

ORGANIZADORES

Centro de Estudios en Salud
Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala (UVG)
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, Guatemala, C.A.
Teléfonos: (502 2) 380336 al 40
Telefax: (502 2) 380212

Area de Ciencia y Tecnología
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)
Calzada Roosevelt Zona 11
Apartado Postal 1188
01901 Guatemala, Guatemala, C.A.
Teléfonos: (502 2) 715655; 723762 al 67
Telefax: (502 2) 736529

Programa de Biología Molecular Aplicada y Transferencia de Tecnología Apropriada
Intercampus Program in Molecular Parasitology
University of California at San Francisco (UCSF)
Laurel Heights, Suite 150
3333 California Street
San Francisco, CA 94118
Teléfono: (415) 476 6850
Telefax: (415) 476 0664

PATROCINADORES

Programa Regional de Biotecnología para América Latina y El Caribe, United Nations Industrial Development Organization (UNIDO)

Organización Panamericana de la Salud (OPS), Oficina Sanitaria Panamericana/Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Comité Nacional de Biotecnología (CONBIOTEC)

Red Centroamericana de Cooperación Sobre Enfermedades Tropicales (REDCEN) del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)

Cooperación Científica Internacional (No. 93.6010 GT), Dirección General para la Ciencia, la Investigación y el Desarrollo, Comisión de las Comunidades Europeas (CEE)

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCyT) de Guatemala

Análítica Química (ANAQUI) - Perkin Elmer

Merck Centroamericana, S.A.

PRECISION, S.A.

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Hoefer Pharmacia Biotech, Inc.

**"PCR* & SONDAS NO RADIOACTIVAS PARA EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES TROPICALES E INFECCIOSAS
DE MAYOR PREVALENCIA EN LA SUBREGION CENTROAMERICANA"
(PCR '95)**

3 - 7 DE JULIO DE 1995

ESQUEMA GENERAL DE ACTIVIDADES DEL CURSO/TALLER

Lunes, 3.VII.95	Martes, 4.VII.95	Miércoles, 5.VII.95
Inscripción	<i>"La Reacción en Cadena de la Polimerasa (II): Aplicaciones"</i>	<i>"Epidemiología y Diagnóstico Clásico de Dengue"</i>
Inauguración	<i>"Epidemiología y Diagnóstico Clásico de Tuberculosis"</i>	<i>"Diagnóstico Molecular de Dengue"</i>
Introducción	<i>"Diagnóstico Molecular de Tuberculosis"</i>	Laboratorio: PCR de Tuberculosis Laboratorio: Preparación de cultivos de <i>Vibrio cholerae</i>
<i>"Nociones Elementales de Biología Molecular"</i>	Laboratorio: PCR de <i>Leishmania</i>	[almuerzo]
<i>"Introducción a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (I): Origen y Desarrollo"</i>	[almuerzo]	Laboratorio: PCR de Dengue Laboratorio: membranas de nylon sobre los cultivos de <i>Vibrio cholerae</i>
<i>"Epidemiología y Diagnóstico Clásico de Leishmania"</i>	Laboratorio: PCR de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[Desarrollo de un Perfil de Investigación]
<i>"Diagnóstico y Caracterización Molecular de Leishmania"</i>	[Desarrollo de un Perfil de Investigación]	
[almuerzo]		
Laboratorio: PCR de <i>Leishmania</i>		

**"PCR* & SONDAS NO RADIOACTIVAS PARA EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES TROPICALES E INFECCIOSAS
DE MAYOR PREVALENCIA EN LA SUBREGION CENTROAMERICANA"
(PCR '95)**

3 - 7 DE JULIO DE 1995

ESQUEMA GENERAL DE ACTIVIDADES DEL CURSO/TALLER

Jueves, 6.VII.95	Viernes, 7.VII.95
<i>"Epidemiología y Diagnóstico Clásico de Vibrio cholerae"</i>	Laboratorio: PCR de Dengue
<i>"Diagnóstico Molecular. Patogénesis y Virulencia de Vibrio cholerae"</i>	[almuerzo]
Laboratorio: Sondas de ADN para <i>Vibrio cholerae</i>	Control General de Calidad en el Laboratorio para PCR
[almuerzo]	Evaluación General del Taller
Laboratorio: Sondas de ADN para <i>Vibrio cholerae</i> Laboratorio: PCR de Dengue	Discusión General del Curso
[Desarrollo de un Perfil de Investigación]	Programa de Transferencia de Tecnología Molecular hacia Latino América
	Estrategias de Implementación de Técnicas Moleculares en Centro América y Panamá
	Clausura

***PCR* & SONDAS NO RADIOACTIVAS PARA EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES
TROPICALES E INFECCIOSAS DE MAYOR PREVALENCIA EN LA SUBREGION
CENTROAMERICANA*
(PCR '95)**

3 - 7 DE JULIO DE 1995

HORARIO DEL CURSO/TALLER*

LUNES 3

- 08:00-08:30 Inscripción y registro de asistentes
08:30-09:00 Inauguración [OPS/INCAP]
09:00-09:15 Introducción al Curso/Taller [Ricardo Luján]
09:15-10:00 Nociones elementales de biología molecular [Álvaro Molina]
10:00-10:30 (receso)
10:30-11:15 Introducción a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (I): origen y desarrollo [Eva Harris]
Información básica sobre los patógenos a detectar: *Leishmania*
11:15-11:45 Epidemiología y diagnóstico clásico de *Leishmania* [Flora Eugenia Arana]
11:45-12:30 Diagnóstico y caracterización molecular de *Leishmania* [Alejandro Belli]
12:30-13:30 (almuerzo)
13:30-14:30 Introducción general al laboratorio [Eva Harris]
14:30-15:00 Introducción al laboratorio: PCR de *Leishmania* [Alejandro Belli/Eva Harris]
15:00-16:00 Extracción de las muestras de *Leishmania*
16:00-17:00 Preparación de las reacciones de PCR de *Leishmania*
17:00-18:45 Amplificación manual

MARTES 4

- 08:30-09:15 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (II): aplicaciones [Eva Harris]
Información básica sobre los patógenos a detectar: Tuberculosis
09:15-09:45 Epidemiología y diagnóstico clásico de tuberculosis [Éyda Mendía de Campollo]
09:45-10:30 Diagnóstico molecular de tuberculosis [Annabelle Ferrera]
10:30-11:00 Introducción al laboratorio: Geles de agarosa
11:00-12:30 Geles de agarosa: análisis de los productos de PCR de *Leishmania*
12:30-13:00 Toma de fotografías Polaroid® del gel de *Leishmania*
13:00-13:30 Discusión de los resultados: *Leishmania*
13:30-14:30 (almuerzo)
14:30-15:00 Introducción al laboratorio: PCR de *Mycobacterium tuberculosis* [Annabelle Ferrera/Eva Harris]
15:00-16:30 Extracción de muestras de tuberculosis
16:30-17:30 Preparación de las reacciones de PCR de tuberculosis
17:30-..... "Nested" PCR de tuberculosis (durante la noche)

Desarrollo de perfil de investigación para un estudio piloto en donde se apliquen técnicas de biología molecular a aspectos relevantes de salud (investigación clínica o epidemiológica) [conferencistas participantes]

MIÉRCOLES 5

Información básica sobre los patógenos a detectar: Dengue

- 08:30-09:00 Epidemiología y diagnóstico clásico de Dengue [Lucrecia Menéndez de Escalante]
09:00-09:45 Diagnóstico molecular de Dengue [Eva Harris]
10:15-12:45 Detección de los productos de PCR de tuberculosis: toma de fotografías Polaroid[®] del gel de tuberculosis
10:45-12:45 (Preparación de cultivos de *Vibrio cholerae*)
12:45-13:15 Discusión de los resultados: tuberculosis
13:15-14:15 (almuerzo)
14:15-14:45 Introducción al laboratorio: PCR de Dengue [Eva Harris]
14:45-16:45 Extracción de muestras de Dengue
16:45-17:45 Preparación de las reacciones de PCR de Dengue
17:45----- Transcripción reversa y amplificación de Dengue (durante la noche)
18:00-18:15 Colocación de las membranas de nylon sobre los cultivos de *Vibrio cholerae*
18:15----- Incubación de las membranas de nylon a temperatura ambiente (durante la noche)

Desarrollo de perfil de investigación para un estudio piloto en donde se apliquen técnicas de biología molecular a aspectos relevantes de salud (investigación clínica o epidemiológica) [conferencistas participantes]

JUEVES 6

Información básica sobre los patógenos a detectar: *Vibrio cholerae*

- 08:30-09:00 Epidemiología y diagnóstico clásico de *Vibrio cholerae* [Floridalma Cano]
09:00-09:45 Diagnóstico molecular, patogénesis y virulencia de *Vibrio cholerae* [Olga Torres]
09:45-10:20 Lisis de cultivos de *Vibrio cholerae* [Olga Torres]
10:20-10:50 Fijación de ADN de cólera a membranas de nylon, a 80 °C
10:50-11:00 Colocación de la membrana en bolsa sellable para prehibridación: sellar la bolsa
11:00-12:00 Prehibridación
11:00-12:00 (almuerzo)
12:00-12:15 Hibridación con sonda a toxina de *Vibrio cholerae* marcada con digoxigenina
12:15-12:45 Lavados de la membrana, a 65 °C
12:45-13:45 Bloqueo
13:45-14:15 Aplicación del conjugado
14:15-14:45 Lavados de la membrana, a 65 °C
14:45-15:00 inicio del desarrollo de color (observar reacción final a las 15:30 hs)
15:00-16:30 Gel de agarosa: análisis de los productos del PCR de Dengue
16:30-17:00 Toma de fotografías Polaroid[®] del gel de Dengue
17:00-17:30 Discusión de los resultados: cólera
17:30----- Formularios para evaluación encuesta del Curso Taller

Desarrollo de perfil de investigación para un estudio piloto en donde se apliquen técnicas de biología molecular a aspectos relevantes de salud (investigación clínica o epidemiológica) [conferencistas participantes]

VIERNES 7

- Continuación del laboratorio: Dengue
- 08:30-09:30 Preparación de la segunda amplificación de Dengue
- 09:30-10:00 Preparación del gel de agarosa
- 10:00-11:00 Amplificación de Dengue
- 11:00-11:30 Aplicación de las muestras de Dengue al gel de agarosa
- 11:30-12:00 Corrida del gel de agarosa de Dengue
- 12:00-12:30 Toma de fotografías Polaroid® del gel de Dengue
- 12:30-13:00 Discusión de los resultados: Dengue
- 13:00-14:00 (almuerzo)
- 14:00-14:30 Control general de calidad en el laboratorio para PCR [Eva Harris]
- 14:30-15:00 Evaluación general del Taller [Eva Harris/Ricardo Luján/Olga Torres]
- 15:00-15:30 Discusión general del Curso [Eva Harris/conferencistas]
- 15:30-16:00 Programa de transferencia de tecnología molecular hacia Latino América [Eva Harris]
- 16:00-17:00 Estrategias de implementación de técnicas moleculares en Centro América y Panamá (perfil de investigación para un estudio piloto en donde se apliquen técnicas de biología molecular a aspectos relevantes de salud, investigación clínica o epidemiológica) [conferencistas/participantes]
- 17:00-17:30 Clausura [PNUD/UVG]
- 18:00-20:00 Recepción de clausura []

ACLARATORIA: El horario y actividades para la parte práctica del laboratorio están sujetos a cambios y ajustes de acuerdo al desarrollo alcanzado. Los participantes deberán dedicarse en forma integral al Curso Taller, incluyendo los periodos de almuerzo, en vista a cambios imprevistos en el horario.

RESUMEN DE LAS CONFERENCIAS

NEXT PAGE(S)
left blank

En esta conferencia se revisan conceptos básicos sobre la estructura del ácido deoxi ribonucleico (ADN) y su replicación. Se hace énfasis en los procesos celulares cuya manipulación ha hecho posible la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ("Polymerase Chain Reaction", PCR).

Estructura del ADN.

El ADN, es una molécula formada por dos bandas antiparalelas de nucleótidos que describen una doble hélice. Las dos bandas permanecen unidas por puentes de hidrógeno que se forman entre las bases nitrogenadas complementarias (A con T, C con G) y por interacciones no covalentes entre las bases apiladas una sobre otra (1). Estas mismas atracciones son las que causan que se asocie una sonda u oligonucleótido ("primer") a su secuencia de ADN complementaria. La estabilidad de la asociación de la sonda a una secuencia complementaria dependerá del largo de la sonda, y de la composición de sus bases nitrogenadas. Ya que las uniones C con G forman 3 puentes de hidrógeno mientras que las A con T solo dos, una mayor cantidad de C y G en la sonda permitirá una asociación más estable con la cadena complementaria. Además, la concentración de solutos y la temperatura del medio también afectan la estabilidad de asociación. A mayor temperatura los puentes de hidrógeno son más inestables, hasta llegar a una temperatura que los disocia y las bandas complementarias de ADN son separadas (desnaturalización) (2).

La especificidad de la asociación de la sonda de ADN con una secuencia dependerá en parte del largo de la sonda, a mayor largo es menos probable que una secuencia complementaria exista por azar varias veces en el genoma de un organismo. La especificidad de asociación también dependerá de las condiciones del medio. Utilizando condiciones drásticas de renaturalización puede seleccionarse las asociaciones más estables y por tanto más específicas. Las condiciones óptimas para la asociación específica de una sonda de ADN con su secuencia complementaria dependerá del largo y composición de bases de la sonda, no hay condiciones generales que sean óptimas para todas las sondas (3,4).

Replicación del ADN.

La principal función *in vivo* de la ADN polimerasa es la síntesis de una banda de ADN utilizando como molde una banda complementaria de ADN. Esto ocurre principalmente durante el proceso de replicación del ADN, antes de la división celular. La replicación del ADN es un proceso complejo en el que se han identificado más de 20 actividades enzimáticas.

La ADN polimerasa requiere para su actividad una banda de ADN que le sirve de "molde", una sonda o iniciador (*primer*) ya que no puede comenzar una cadena *de nuevo*, deoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), iones de Mg^{++} .

Existen varias clases de ADN polimerasa. En *Escherichia coli* se han encontrado tres (ADN pol I, II y III). La ADN pol I y III parecen ser las que actúan durante la replicación, y además de la actividad de polimerasa tienen asociadas otras dos actividades: de exonucleasa 5'→3' (elimina los iniciadores de ARN) y de exonucleasa 3'→5' (corrige errores en la banda nueva). El fragmento Klenov de la ADN pol I utilizado inicialmente en PCR, es obtenido por digestión de la ADN pol I con tripsina, este fragmento contiene solo la actividad de ADN polimerasa y la de exonucleasa 3'→5' (5). La ADN polimerasa *Taq* proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* y contiene las actividades de ADN polimerasa y de exonucleasa 5'→3'.

REFERENCIAS

1. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. (1993) Principles of Biochemistry 2nd. ed. Worth Publishers, Inc., New York.
2. Hames, B.D. y Higgins, S.J. (editors). (1985) Nucleic Acid Hybridization. a practical approach. IRL Press, Washington D.C.
3. Erlich, H A. (editor). (1989) PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. M Stockton Press, New York.
4. Innis, M.A. *et al.* (editors). (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York.
5. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

INTRODUCCION A LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (I): ORIGEN Y DESARROLLO

Eva Harris

I. Introducción a la Reacción en Cadena de la Polimerasa ("Polymerase Chain Reaction". PCR)

- A. Concepto fundamental
- B. Ciclos de amplificación
- C. Componentes básicos

II. Selección y diseño de los iniciadores ("primers")

- A. Temperatura teórica de hibridación
- B. Evitar estructura secundaria
- C. Evitar complementaridad entre los iniciadores ("primers")

III. Polimerasa termoestable

- A. Vida media
- B. Fidelidad
- C. Procesividad
- D. *Taq*, *Vent*, *Tth*
- E. "Designer enzymes"

IV. Ingredientes del PCR

A. La Mezcla

1. Nucleótidos, "buffer", cloruro de magnesio
2. Iniciadores ("Primers")
3. Polimerasa
4. "PCR Enhancers"
5. Muestra

B. Optimización

1. Concentración de los ingredientes
2. Perfil termal
3. Número de ciclos
4. Termociclador
5. "Hot start"
6. "Primers" anidados ("nested")
7. "Touchdown PCR"

C. Transcripción Reversa (RT) PCR

V. Preparación de la muestra

- A. Purificación del ADN
- B. Detergentes y proteasas
- C. Cloroformo
- D. Resinas quelantes ("Chelex-100")
- E. Extracción directa

VI. Problemas potenciales

- A. Extensión incompleta
- B. Fidelidad
- C. "Primers-dimers"
- D. Contaminación

VII. Prevención de contaminación

- A. Métodos sencillos y baratos
- B. Métodos sofisticados

VIII. Controles de PCR

- A. Negativos
- B. Control de inhibición
- C. Positivos

IX. Detección de los productos

- A. Gel de agarosa o poliacrilamida
- B. Hibridación sobre filtros
- C. "Captura reversa"
- D. Captura en placas de microtitulación
- E. Cuantificación por fluorescencia
- F. *Taq*-man

EPIDEMIOLOGIA Y DIAGNOSTICO CLASICO DE *LEISHMANIA*

Flora Eugenia Arana Figueroa

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias causadas por protozoarios del género *Leishmania*. Son transmitidas al ser humano mediante la picadura de las hembras de un grupo de mosquitos conocidos con el nombre general de flebótomos y que están incluidas, para el continente americano, en el género *Lutzomyia*. Los parásitos del género *Leishmania* son morfológicamente muy similares, pero bioquímica e inmunológicamente cada especie es diferente. Esto determina en gran parte el tipo de patología que causan al infectar al ser humano, así como su comportamiento epidemiológico. Desde el punto de vista clínico y en forma general en todo el mundo, se consideran tres formas de leishmaniasis: cutánea, mucocutánea y visceral.

Estos parásitos se caracterizan por tener dos formas: una flagelada y otra no flagelada. A la forma flagelada se le denomina promastigote por tener un solo flagelo en el extremo anterior. Esta es la forma infectante para el hospedero vertebrado y por lo tanto es la que se encuentra en el insecto transmisor (vector), o cuando se cultiva en el laboratorio usando medios especiales. A la forma no flagelada se le conoce como amastigote y requiere una condición intracelular para multiplicarse. Esta es la forma infectante para el insecto transmisor y por lo tanto se encuentra en el hospedero vertebrado. Es la responsable del daño tisular que se traduce en enfermedad y tiene una gran importancia ya que es la que nos permite hacer un diagnóstico parasitológico cuando se encuentra en el material examinado (1,2).

En Guatemala se encuentran las formas cutánea, mucosa y visceral. La forma cutánea y mucosa están localizadas en la parte norte de país, especialmente el departamento de El Petén y lugares colindantes. Las infecciones son causadas en un 67 % por *Leishmania braziliensis*, 22 % por *L. mexicana*, 1.35 % por *L. panamensis*, y en un 5.5 % no se pueden identificar porque no coinciden con los patrones anteriormente mencionados. La tasa de incidencia anual para leishmaniasis cutánea es de 0.9 %, siendo el departamento de El Petén el lugar de mayor transmisión y se calcula que anualmente ocurren entre 2,000 a 3,000 casos. La forma mucosa de la enfermedad se ha observado solamente en dos casos. La leishmaniasis visceral fue reportada por primera vez alrededor del año 1956 en el departamento de El Progreso y durante casi 30 años no se reportó ningún otro caso. Actualmente se han diagnosticado 11 casos con leishmaniasis visceral en niños menores de 5 años. Es interesante observar que algunos de los niños fueron originarios de otras localidades en los departamentos de Zacapa, Huehuetenango, Baja Verapaz, así como de El Progreso (2,3).

En Honduras se encuentran las leishmaniasis cutánea, mucocutánea, visceral y cutánea atípica, siendo esta última producida por *L. donovani*. En los últimos 10 años, la leishmaniasis cutánea en Honduras ha estado dentro de las 10 primeras causas de morbilidad. Los parásitos aislados de diferentes cuadros clínicos han sido clasificados como *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. chagasi* (4).

En Nicaragua existen las tres formas clínicas de leishmaniasis: cutánea, mucocutánea y visceral. El año de mayor notificación fue en 1982, con una tasa de 103 casos por cada 100,000 habitantes. Se estima que el 5% de las infecciones cutáneas evolucionan a lesiones mucocutáneas. La caracterización de 26 cepas aisladas de casos cutáneos ha demostrado que en Nicaragua circulan *L. braziliensis* y *L. panamensis* y otro grupo de parásitos que se comportan como híbridos de estas dos especies. Además, se han confirmado 7 casos de leishmaniasis visceral provenientes de comunidades rurales del pacífico del país (5).

En Costa Rica se encuentran la leishmaniasis cutánea y cutánea atípica causadas, la primera, por *L. panamensis* y muy raramente por *L. braziliensis*. La leishmaniasis cutánea atípica, al igual que en Honduras, es producida por *L. chagasi* (5).

En Panamá se encuentra la forma cutánea producida por *L. panamensis* y *L. amazonensis* (5).

El diagnóstico clásico de las leishmaniasis es el parasitológico, es decir, la observación de los amastigotes en frotis coloreados con Giemsa o Wright a partir del material obtenido de la lesión, o bien de cultivar este tejido en medios especiales para la reproducción de los parásitos y la observación de promastigotes, para su posterior clasificación taxonómica (5).

El frote es un método directo, rápido, de bajo costo y de alta sensibilidad diagnóstica. Es el método de elección para el diagnóstico confirmatorio de la leishmaniasis cutánea por la facilidad de la toma de la muestra a nivel de campo, por parte del personal de atención primaria de salud. Este método no es muy utilizado en el caso de la leishmaniasis mucocutánea, porque la sensibilidad diagnóstica disminuye debido a que el número de parásitos en las lesiones es muy bajo.

El cultivo es un método indirecto por medio del cual se puede lograr la reproducción del parásito a partir del material obtenido de la lesión. Es un método de mayor sensibilidad y permite efectuar experimentos posteriores para la clasificación taxonómica de los parásitos. Tiene una estrecha relación en el grado de positividad con el frote.

La detección de anticuerpos séricos específicos para *Leishmania* sp. es de mayor utilidad para los casos de leishmaniasis visceral.

La prueba de intradermoreacción o de Montenegro tiene poco valor diagnóstico en la leishmaniasis cutánea. Su importancia más bien radica en el aspecto epidemiológico, pero en el caso de la leishmaniasis mucocutánea sí es de gran valor ya que todos los casos son positivos. Para la leishmaniasis visceral no tiene valor diagnóstico ya que será negativa en todos los casos activos.

Por aparte, existen otros métodos que implican aplicaciones de la biología molecular, con pruebas más sofisticadas, pero que por razones de costo, equipo, manejo, etc. no están al alcance y disponibilidad de todos los usuarios.

REFERENCIAS

1. Lucha contra la Leishmaniasis. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos, 793. Organización Mundial de la Salud, Ginebra 1990.
2. Thomas R. Navin *et al.* La Leishmaniasis Cutánea en Guatemala. Rhone-Poulenc Rorer, 1991, 81 pp.
3. Guía de Apoyo para el Diagnóstico de la Leishmaniasis en los Servicios de Salud en Guatemala. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana/Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Guatemala, mayo de 1993.
4. Leishmaniasis en Honduras. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Serie de Diagnóstico No. 12 Honduras, C.A. Diciembre de 1993.
5. Enfermedades Parasitarias de Mayor Prevalencia y Transmitidas por Vectores en Centroamérica. H. Cosenza y A. Kroeger (Eds). Parlamento Centroamericano, Tegucigalpa 1992.

DIAGNOSTICO & CARACTERIZACION MOLECULAR DE *LEISHMANIA*

Alejandro Antonio Belli

NECESIDAD DEL DIAGNOSTICO Y LA CARACTERIZACION DE LEISHMANIASIS.

La infección con parásitos del genero *Leishmania* puede resultar en diversas manifestaciones clínicas, dependiendo de la especie del parásito infectante y de la respuesta inmunológica del infectado. Estas manifestaciones varían de lesiones cutáneas, que curan espontáneamente, hasta afecciones viscerales que causan la muerte si no son tratadas adecuadamente. El tratamiento de cualquier forma de leishmaniasis debe basarse en un diagnóstico certero de la infección, ya que las drogas actualmente disponibles (Glucantime o Pentostam) son bastante tóxicas y de alto costo (aproximadamente US\$ 80.00 a US\$ 100.00 por tratamiento). A la vez, es necesario conocer la especie de *Leishmania* responsable de las infecciones humanas en un foco determinado para adecuar el régimen de tratamiento y adaptar las medidas de control. Estas últimas requieren del conocimiento de los principales factores de transmisión incluyendo además del agente, al vector (moscas del genero *Lutzomyia* o *Phlebotomus*) y reservorios.

Las técnicas disponibles actualmente para el diagnóstico de leishmaniasis tienen poca sensibilidad y en el caso de leishmaniasis visceral dependen de técnicas invasivas para la toma de muestras. Las técnicas de caracterización requieren el aislamiento y cultivo masivo del parásito, lo que las hace costosas en tiempo, materiales y equipo. Con el desarrollo de la tecnología molecular han surgido varias opciones para el diagnóstico y caracterización de *Leishmania*, y aunque no hay alguna que reemplace las técnicas estándares, no es remoto que en pocos años el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), sondas o esquizodemas se convierta en la regla de oro para la detección o identificación de estos parásitos.

CARACTERISTICAS MOLECULARES DE *LEISHMANIA*.

A continuación se describen ciertas características del genoma de las leishmanias que es relevante para la utilización de técnicas moleculares de diagnóstico o caracterización.

El kinetoplasto. Al igual que los otros miembros de la orden Kinetoplastida, las leishmanias poseen una estructura de ADN (kADN) en el mitocondrio que se ha denominado kinetoplasto (o cinetoplasto). El kinetoplasto está compuesto por maxicirculos y minicirculos concatenados en una red. Los maxicirculos (20 a 40 kb) están presentes en 30 a 50 copias y acarrean genes que codifican las enzimas mitocondriales. La función de los minicirculos (650 a 850 bp), que están presentes en 10,000 a 20,000 copias, es aun desconocida. Se ha determinado que hay una secuencia de 120 pb que es conservada en los minicirculos de todas las especies de *Leishmania*, mientras que el resto de su secuencia varia entre especies y sub-especies. Estas características (alto número de copias, áreas conservadas y áreas variables) ha permitido que se use ampliamente al kinetoplasto como una molécula blanco para el diagnóstico y caracterización de *Leishmania*.

Secuencias repetidas en 'tandems' ("tandem repeats"). El análisis del ADN nuclear de *Leishmania* y otros kinetoplastidos ha permitido detectar la presencia de secuencias cortas de ADN que se repiten hasta unas 200 veces y que están organizadas en 'tandems' o sea una tras otra. Estas secuencias repetitivas no codifican para ninguna proteína, por lo que no son muy conservadas y pueden evolucionar o cambiar al azar dando variaciones de utilidad taxonómica, por lo que han sido utilizadas como blanco para sondas o PCR.

TECNICAS PARA DIAGNOSTICO O DETECCION DE PARASITOS.

El diagnóstico de certeza de las leishmaniasis continúa siendo la observación microscópica de material teñido en busca de formas amastigotas del parásito. Para lesiones cutáneas se toman raspados del borde de la lesión y para casos viscerales se utiliza material obtenido por punción de médula ósea, hazo o hígado. El frotis tiene una sensibilidad limitada, especialmente en casos crónicos o previamente tratados. Como diagnóstico de apoyo se utiliza la prueba de intradermo reacción o de Montenegro que detecta hipersensibilidad retardada a antígenos de *Leishmania*, pero que no distingue entre infecciones activas o pasadas. Las pruebas serológicas no son muy útiles por observarse reacciones cruzadas con otras diversas infecciones. Con el desarrollo de las técnicas moleculares, se han utilizado sondas de ADN y PCR para el diagnóstico de leishmaniasis.

Sondas de ADN. Mediante la hibridación de fragmentos de ADN (oligonucleótidos) marcados, es posible detectar secuencias de ADN específicas para el género *Leishmania* o para cualquiera de los complejos o especies. Si en la muestra utilizada hay suficientes parásitos con secuencias complementarias a una sonda específica, ésta se hibridará y podrá ser detectada posteriormente. Los oligonucleótidos pueden ser marcados con moléculas radioactivas como Fósforo-32 (^{32}P) o moléculas no-radioactivas como Digoxigenina o Biotina. La principal ventaja de las sondas de ADN es poder procesar un alto número de muestras con muy buena especificidad. Sin embargo, su mayor limitación es que no detectan menos de mil parásitos, lo cual limita su uso en el diagnóstico clínico. Para incrementar su sensibilidad, se han dirigido sondas a blancos altamente repetitivos como el kinetoplasto o las secuencias 'tandem'. Las sondas de ADN han probado ser útiles para la detección de parásitos en vectores.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). A través del PCR es posible amplificar varios millones de veces cualquier fragmento de ADN que sea de interés a partir de una muestra. El PCR utiliza una ADN-polimerasa (como *Taq*-polimerasa) y un par de oligonucleótidos (iniciadores o 'primers') para dirigir la amplificación de la secuencia entre ambos 'primers' mediante una serie de ciclos de cambios de temperatura. Si los 'primers' son diseñados de tal manera que el fragmento a amplificar es específico para el género *Leishmania* o para cualquiera de sus complejos o especies, este ensayo puede ser utilizado para diagnóstico o detección de parásitos. Su principal ventaja es la altísima sensibilidad obtenible, pudiendo llegar a detectar hasta un sólo parásito en una muestra. Actualmente se está investigando la capacidad de detectar parásitos en linfocitos aislados de sangre periférica, lo que simplificaría el diagnóstico de leishmaniasis visceral sin requerir de punciones invasivas que arriesguen las condiciones o vida del paciente. En comparación al frotis para diagnóstico, el PCR tiene la desventaja que requiere de equipo y condiciones de laboratorio más complejas, lo que limita su uso en unidades de salud en áreas endémicas. Sin embargo, puede ser útil como técnica de diagnóstico para estudios realizados por laboratorios de referencia.

TECNICAS PARA CARACTERIZACION DE PARASITOS.

El control de las leishmaniasis, particularmente de las leishmaniasis cutáneas americanas, cuenta con un arsenal realmente limitado de medidas efectivas. El control vectorial mediante rociado del habitat del vector es irrealizable, ya que éste habita en áreas selváticas muy extensas. Por lo tanto, las medidas de control se limitan a aquellas acciones que reducen el contacto de la población con los vectores responsables de transmisión. Esto requiere de un conocimiento detallado de las condiciones de transmisión en cada foco, las cuales pueden variar entre zonas relativamente cercanas. Solamente conociendo la especie del parásito causal, el vector transmisor y los principales factores de riesgo es posible diseñar estas medidas, que muchas veces consisten en acciones educativas en la población para reducir exposición a la picadura de vectores.

El conocimiento detallado de los factores de transmisión en un foco de leishmaniasis depende de la detección y caracterización de las leishmanias circulantes. Para incriminar a los vectores y reservorios involucrados en la transmisión, es necesario aislar e identificar parásitos para relacionarlos con aquellos encontrados en lesiones humanas.

La técnica considerada actualmente como regla de oro para la caracterización de *Leishmania* es la electroforesis de isoenzimas, que requiere del aislamiento del parásito en cultivo, seguido de su expansión a grandes volúmenes. Es necesario posteriormente examinar el perfil de cada aislamiento mediante unos 11 a 15 sistemas enzimáticos para obtener una identificación precisa. Esto implica varias semanas y una buena cantidad de reactivos para caracterizar cada aislamiento. Una segunda opción es el uso de anticuerpos monoclonales que requieren un número menor de parásitos y resulta relativamente menos costosa en tiempo y reactivos. La limitación de estos anticuerpos monoclonales para la identificación de *Leishmania* es que presentan ambigüedades al diferenciar entre sub-especies dentro de un complejo. Esto puede deberse a la conocida heterogeneidad existente entre poblaciones de una misma especie.

Como es de esperarse, las diferencias entre especies encontradas por análisis fenotípicos de éstos parásitos (por isoenzimas o anticuerpos monoclonales) son similarmente detectables a nivel del ADN. En las últimas décadas se han aplicado varias técnicas para este análisis genotípico entre las que sobresalen las sondas de ADN, PCR, esquizodemas, RFLPs y RAPDs.

Sondas de ADN. Como se describió anteriormente, con sondas de ADN se pueden detectar secuencias conocidas de ADN, y es posible identificar si los parásitos presentes en una muestra pertenecen a esa especie con sondas que reconocen secuencias específicas para determinada especie de *Leishmania*. En la literatura se encuentran sondas específicas para casi cada uno de los complejos y especies conocidos de *Leishmania*. La mayoría de sondas disponibles son dirigidas a secuencias repetitivas no-codificantes como la secuencia espaciadora entre los genes del ARN ribosomal o los minicírculos del kinetoplasto. Su limitación principal es su baja sensibilidad que requiere del aislamiento del parásito para obtener buenos resultados.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). De una manera similar, cuando el PCR amplifica secuencias específicas a un complejo o especie puede ser utilizado para la identificación de *Leishmania*. La sensibilidad del PCR ha permitido que se identifiquen parásitos directamente de muestras clínicas, lo que simplifica y agiliza significativamente los estudios que requieren caracterizar parásitos. El PCR también ha sido utilizado para detectar e identificar parásitos directamente de flebotomos. A pesar de sus ventajas, una de las limitaciones del PCR se deriva precisamente de su alta sensibilidad ya que una mínima cantidad de ADN contaminante puede ser amplificada, resultando en un número desproporcionado de falsos positivos. Para reducir este riesgo se requiere de un manejo estricto del ambiente, pipetas, materiales y reactivos, que a su vez incrementa costos y limita su aplicabilidad en laboratorios de baja complejidad.

Las técnicas descritas a continuación se basan en la producción y comparación de patrones de bandas que reflejan diferencias en la secuencia de una parte o la totalidad del genoma de los parásitos estudiados. Este abordaje se conoce como "huellas digitales de ADN" (o "DNA fingerprinting"). En los tres casos, los patrones de bandas se obtienen mediante la separación de fragmentos de ADN (producidos de diferentes maneras) por medio de electroforesis en geles de agarosa (200 a 50,000 pb) o de acrilamida (1 a 1,000 pb).

Esquizodemas. Se conoce como análisis de esquizodemas al estudio de patrones de bandas resultantes después que el kADN es 'cortado' con enzimas de restricción (como *HaeIII*, *RsaI* o *MspI*) que reconocen sitios de cuatro bases. Los fragmentos obtenidos son separados por electroforesis, resultando en patrones de bandas que son comparados con cepas de referencia. La digestión con diferentes enzimas produce

diferentes patrones. Se ha determinado, por ejemplo, que la enzima *HaeIII* es útil para diferenciar parásitos del complejo *L. donovani*, mientras que *MspI* y *RsaI* es útil para estudiar parásitos del complejo *L. braziliensis*. El análisis de esquizodemas permite, además de la identificación a nivel de especies, el análisis de heterogeneidad entre poblaciones de parásitos. Su mayor limitación es que ha dependido del aislamiento de kADN a partir de grandes cantidades de parásitos (10⁹). Sin embargo, con el desarrollo del PCR, se ha logrado amplificar la región variable del kADN a partir de pocos parásitos y posteriormente digerirlo con enzimas de restricción, obteniendo resultados muy comparables a los esquizodemas clásicos (H. Noyes, comunicación personal).

Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs). Para preparar RFLPs es necesario purificar ADN genómico y digerirlo con una o dos enzimas de restricción que reconocen sitios de seis bases. Los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y son luego transferidos a una membrana (de nylon preferiblemente) mediante transferencia capilar (Southern "blot"). Una vez fijados en la membrana se hibridizan con una sonda y al revelar la presencia de ésta se observan los patrones de bandas. Es una técnica que requiere de una gran cantidad de parásitos y de varios días de trabajo. Ha sido utilizada para definir la relación taxonómica entre los complejos y especies de *Leishmania*.

Amplificación Arbitraria de Polimorfismos del ADN (RAPDs). En 1990 se desarrolló una técnica similar al PCR que utiliza sólo un "primer" de unos 10 pares de bases. Este "primer" se escoge empíricamente sin necesidad de conocer dónde va a hibridizarse en el genoma, por lo que se les llama "primers" arbitrarios. Un buen "primer" amplificará varios fragmentos que al separarse mediante electroforesis producirá patrones que diferencien entre los complejos o especies que nos interese estudiar. Al igual que el PCR tiene una gran sensibilidad y requiere un número reducido de parásitos. El mayor problema es su limitada reproducibilidad. Es necesario optimizar las condiciones en cada laboratorio y usar el mismo termociclador. No es posible aplicarlo en muestras clínicas ya que el ADN del paciente también sería amplificado.

REFERENCIAS

1. Beverley, S.M., Ismach, R.B. and McMahon Pratt, D. (1987) Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, **84**:484-488.
2. Barker, D.C. (1989) Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*, **99**:S125-S146.
3. Rodgers, M.R., Popper, S.J. and Wirth, D.F. (1990) Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, **71**: 267-275.
4. Howard, H.K., Kelly, J.M., Lane, R.P. and Miles, M.A. (1991) A sensitive repetitive DNA probe that is specific to the *Leishmania donovani* complex and its use as an epidemiological and diagnostic reagent. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **44**:63-72.
5. López, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echeverría, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C. and Arévalo, J. (1993) Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**(3):348-356.
6. Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D. and Ayala, F. (1993) Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer NA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, **90**:1335-1339.
7. Degraeve, W., Fernández, O., Campbell, D., Bozza, M., and López, U. (1994) Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**(3):463-469.

LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (II): APLICACIONES

Eva Harris

I. Diagnóstico y epidemiología molecular

A. Enfermedades infecciosas

1. Detección

a. Muestras clínicas

(1) *Leishmania* -- gel de agarosa

(2) *M. tuberculosis* -- captura en placas de microtitulación

b. Control ambiental

(1) *Vibrio cholerae*

c. Vectores

(1) Dengue en *Aedes*

(2) *Leishmania* en *Lutzomyia*

2. Caracterización

a. Caracterización de las especies de *Leishmania*

b. Tipificación del virus Dengue

(1) RT-PCR con productos de diferentes tamaños

(2) PCR/sondas no radioactivas

3. Análisis genético

4. Resumen de la utilidad clínica de PCR aplicada al diagnóstico de enfermedades infecciosas

B. Enfermedades genéticas

1. Diagnóstico prenatal ej. anemia falciforme

2. Caracterización de los alelos, identificación de los portadores y homocigotas
ej. fibrosis cística

3. Tipificación de HLA

a. Asociación con enfermedades; factores de riesgo (HLA, TCR)

b. Determinación de paternidad

c. Análisis forense (HLA, ADN mitocondrial)

C. Cáncer

1. Anormalidades cromosómicas

2. Mutaciones somáticas en oncogenes o genes de supresión de tumores

3. Detección de virus tumorigénicos

II. Evolución Molecular

A. Amplificación de cantidades pequeñas de ADN antiguo o degradado

B. Amplificación de ADN mitocondrial; construcción de "árboles evolutivos"

C. Identificación de mutaciones y polimorfismos (SSCP, DGGE)

III. Métodos de detección

- A. Gel de agarosa
- B. Captura con sondas no radioactivas
- C. Detección fluorométrica
- D. Inmuno-PCR
- E. *Taq-man*

IV. *In situ* PCR

- A. Células
- B. Tejidos
- C. Láminas
- D. En solución

V. Secuenciación

VI. "Long fragment" PCR: productos de 42 kb

VII. Modificación de secuencias

- A. Mutagénesis arbitraria o sitio-especifica
- B. Introducción de sitios de restricción
- C. Construcción de genes quiméricos
- D. Introducción de promotores: Expresión-PCR

VIII. Expresión de genes

- A. Análisis de expresión (ej. expresión de citoquinas, repertorio del TCR)
- B. Construcción de bibliotecas (ej. de inmunoglobulinas)
- C. Cuantificación

IX. Clonaje

- A. Identificación de nuevos miembros de una familia de genes en un organismo
- B. Identificación de nuevos genes homologos en diferentes organismos
- C. Generación de sondas para tamizaje ("screening") de una biblioteca

X. Análisis de secuencias desconocidas

- A. "Chromosome walking"
- B. PCR inverso: circulación del molde
- C. Uso de iniciadores ("primers") complementarios a ADN repetitivo
- D. "Fingerprints" usando secuencias repetitivas (IRS)
- E. "Primers" cortos arbitrarios (RAPD)
- F. Uso en el proyecto del Genoma Humano

XI. Técnicas alternativas de amplificación

- A. LCR: Ligation Chain Reaction
- B. P&L.C.R: Polymerase and Ligase Chain Reaction
- C. 3SR: Self-sustained Sequence Replication
- D. SDA: Strand Displacement-Amplification
- E. bDNA: Branched DNA Signal Amplification Assay

REFERENCIAS

1. Erlich, H., Gelfand, D. and Sninsky, J. (1991) Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, **252**:1643-1651.
2. Landegren, U. (1993) Molecular mechanics of nucleic acid sequence amplification. *Trends in Genetics*, **9**(6):199-204.
3. McPherson, M.J., Quirke, P. and Taylor, G.R. (Eds.) PCR: A Practical Approach. IRL Press, New York, 1991.
4. Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.W. (Eds.) Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
5. White, T., Madej, R. and Persing, D. (1992) The polymerase chain reaction: clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry*, **29**:161-196.

NEXT PAGE(S)
left BLANK

EPIDEMIOLOGIA Y DIAGNOSTICO CLASICO DE TUBERCULOSIS

Eyda Lissette Mendía Alarcón de Campollo

Históricamente, la tuberculosis ha sido un problema serio de salud en la sub-región centroamericana, en base a los niveles de incidencia estimada y registrada; la tendencia del daño observado; y al grado de desarrollo, organización, eficacia y control de los programas. En 1989 la Organización Panamericana de la Salud calificó esta situación como de extrema severidad para Centroamérica. En la actualidad, sin embargo, gracias al trabajo desarrollado en equipo y a las actividades de control se puede beneficiar, en corto plazo, la eficacia de los programas y mejorar el diagnóstico situacional en la sub-región.

Patología de la tuberculosis:

- | | |
|----------------------------|---|
| 1- Tuberculosis de Koester | 5- Siembras broncogénas |
| 2- Necrosis Caseosa | 6- Eliminación al exterior |
| 3- Licuefacción del caseum | 7- Progresiones y cicatrizaciones sucesivas |
| 4- Formación de cavernas | |

Características del Bacilo Tuberculoso:

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1- Parásito estricto | 5- Virulencia variable |
| 2- No tiene toxicidad primaria | 6- Tiene muchos antígenos |
| 3- Aerobio estricto | 7- Daño depende de la respuesta del hospedero |
| 4- De multiplicación lenta | |

Epidemiología Actualizada. Los factores epidemiológicos de la conservación o resurgimiento de la tuberculosis en la actualidad dependen de:

- 1- La explosión demográfica
- 2- La falta de atención a la enfermedad por los gobiernos
- 3- Lo relacionado con el programa de control de tuberculosis
- 4- La multiresistencia a los medicamentos
- 5- La aparición y propagación de la enfermedad del S.I.D.A.

Métodos utilizados actualmente en el diagnóstico:

	1. Baciloscopia	2. Cultivo
Ventaja:	Sencilla, económica, rápida, fácil aprendizaje, capacitación y comparación de resultados. Reduce costos operacionales.	Confirma viabilidad del <i>M. tuberculosis</i> . Procesa todo tipo de muestra. Elimina la flora normal. Se emplea en pruebas de resistencia antimicrobiana.
Requisitos:	Utiliza equipo simple. Reactivos accesibles a países en vías de desarrollo.	Utiliza equipo complejo. Reactivos accesibles a países en vías de desarrollo.
	Adaptable a personal de salud bien adiestrado	Procedimientos minuciosos y específicos.

	1. Baciloscopia	2. Cultivo
Condiciones:	Aplicable por personal y equipo de paises en vias de desarrollo. Abarca el mayor número de síntomas respiratorios.	Aplicable por personal de salud especialmente capacitado. Paciente baciloscópicamente negativo.
Significado:	De amplia cobertura y continuidad. Mantiene vigilancia epidemiológica.	Compara niveles de situaciones epidemiológicas. Ideal para mantenimiento de vigilancia epidemiológica.
Validez de la metodología:	Rendimiento de 80% de (+) Fácil estandarización. Grado de especificidad y sensibilidad confiables. Para diagnóstico etiológico. Establece concordancia a través de control de calidad.	Rendimiento de 95% de (+) Resultados comparables. Sensibilidad y especificidad del 100%. Para diagnóstico de T.B. pulmonar no bacilífero y T.B. extrapulmonar. Posee amplia experiencia y aplicación a nivel mundial.
Desventaja:	Menos sensible que el cultivo. Necesita 2 o 3 muestras para diagnóstico definitivo, en caso de resultados (+) Menor positividad en casos de pacientes VIH (+)	Lento. Minucioso. Mayor costo operacional. No más de 12 muestras procesadas por vez. Menor positividad en casos de pacientes VIH (+)

NECESIDADES FUTURAS La medicina moderna ha tomado conciencia que, para erradicar la tuberculosis, hace falta un salto tecnológico en métodos diagnósticos, por lo que se debe introducir pruebas simples y rápidas, con reproducibilidad y valor predictivo alto, además de un buen control de resultados positivos y negativos para su detección precoz y una adecuada vigilancia epidemiológica, pero adaptable y accesible a los países en vias de desarrollo.

REFERENCIAS

1. Fargas C. V. 1989. TUBERCULOSIS. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. Pags. 11-27; 55-63, 74-80, 183-189.
2. Casal Roman, M. 1990. MICROBIOLOGIA CLINICA DE LAS ENFERMEDADES POR MICOBACTERIAS. Córdoba, España. Pags. 1-4.
3. Chairman, H.D. *et al.* 1984. MICOBACTERIOLOGIA. Andalucía, España. Pags. 1-11.
4. Blancarte, L. *et al.* 1986. BACTERIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS. Nota Técnicas Nos. 26, 27, 28 y 29. Buenos Aires, Argentina.
5. BOLETIN DE LA OFICINA SANITARIA PANAMERICANA. 115(4): 356-369, Oct. 1993. 116(3): 250-263, Mar. 1994. 116(4): 341, Abr. 1994. 116(5): 452-464, May. 1994. 116(6): 546-565, Jun. 1994. 117(3): 258, Sep. 1994.

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE TUBERCULOSIS

Annabelle Ferrera Boza

La identificación temprana de personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* y la confirmación rápida por laboratorio de esta enfermedad son los dos ingredientes claves para tomar medidas efectivas de salud pública, tanto para combatir el resurgimiento de la tuberculosis como también evitar brotes de tuberculosis transmitidos nosocomialmente.

La meta de las investigaciones en el diagnóstico rápido se basa en el desarrollo de procedimientos confiables que puedan detectar e identificar micobacteria directamente de muestras clínicas y, de esta manera, evitar las muchas semanas necesarias para su cultivo. Hoy en día, para acelerar la respuesta a la pregunta "tuberculosis o no tuberculosis", el laboratorio debe confiar en dos diferentes metodologías moleculares: 1) técnicas de hibridación de ácidos nucleicos utilizando sondas y 2) técnicas de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro*.

HIBRIDIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. - La tecnología de sondas ha tenido un gran impacto en la identificación de patógenos respiratorios, particularmente micobacteria. Las sondas se consideran indispensables para la confirmación del cultivo no sólo de *M. tuberculosis*, sino que también de *M. avium*, *M. intracellulare*, y *M. goodii*. Estas sondas de ácidos nucleicos son segmentos de ADN o ARN que han sido marcados con enzimas, sustratos antigénicos, partículas quimioluminiscentes o radioisótopos y que pueden unirse con una alta especificidad a secuencias complementarias de ácidos nucleicos. La sonda de ADN más utilizada para la identificación del complejo *M. tuberculosis* es la comercialmente distribuida por AccuProbe® (Gen Probe, San Diego, CA). En esta prueba, la sonda de ADN de cadena simple está marcada por quimioluminiscencia con ester de acridinium y es complementaria al ARNr de la especie blanco, de manera que la asociación de las dos cadenas forma un híbrido estable. La mayor ventaja de las sondas consiste en su utilización conjunta con el sistema de cultivo BACTEC® para la identificación rápida de micobacterias y también la detección de infecciones micobacteriales mixtas.

AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. - Una alternativa a un sistema de detección muy sensible consiste en amplificar *in vitro* una molécula blanco a niveles detectables. Varias metodologías han sido descritas para *M. tuberculosis* y entre las más conocidas tenemos: a) Amplificación de la Cadena Desplazada (SDA); b) Amplificación Mediada por Transcripción (TMA); y c) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Reacción en Cadena de la Polimerasa - La reacción en cadena de la polimerasa utiliza oligonucleótidos como iniciadores para dirigir la amplificación de secuencias blanco de ácidos nucleicos de micobacterias por medio de ciclos repetidos de desnaturalización, anillamiento y extensión de iniciadores. La especificidad de este proceso de amplificación radica en la escogencia de los iniciadores. Un gran número de secuencias específicas como blanco provenientes de diferentes genes del hazillo han sido sugeridas, entre ellas tenemos, la proteína de choque térmico de 65 kDa, antígeno MBP70, la proteína MBP64, la proteína de 38 kDa (gen Pab), un fragmento de 158 pb perteneciente a una secuencia de inserción obtenida de la clona recombinante lambda PH7311 y un fragmento de 396 pb de la proteína mip40. Sin embargo, el elemento genético IS6110 ha sido la secuencia más exhaustivamente evaluada como blanco específico para el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*). La naturaleza específica y repetitiva de esta secuencia de inserción la hace un blanco ideal para amplificación por PCR, por lo cual se han sintetizado diversos iniciadores para amplificar fragmentos de 123 pb, 263 pb, 325 pb, 317pb en IS6110.

Un grupo de investigadores desarrollaron un sistema de amplificación múltiple en un solo tubo que puede identificar el género *Mycobacterium* y subsecuentemente distinguir entre *M. avium* y *M. intracellulare* del complejo *M. tuberculosis*. Para ello utilizaron iniciadores específicos para el género *Mycobacterium* basados en el gen 16S ARNr, combinado con iniciadores especie-específicos dirigidos al gen MBP70 del complejo *M. tuberculosis*. Un producto de amplificación de 1030 pb es indicativo del género *Mycobacterium* y fragmentos más pequeños de 850, 372 y 180 pb son las señales positivas para *M. intracellulare*, complejo *M. tuberculosis* y *M. avium*, respectivamente.

La reacción en cadena de la polimerasa ha sido utilizada para detectar *M. tuberculosis* en una variedad de muestras que incluye: esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido pericárdico, líquido pleural, biopsias de nódulos linfáticos y aspirados gástricos, entre otros. Sin embargo, a pesar de su gran sensibilidad, el PCR ha sido criticado por ser muy complejo, caro y poco confiable para ser utilizado fuera de los laboratorios de investigación.

Entre los problemas encontrados en las técnicas basadas en PCR para la detección de micobacterias en muestras clínicas se puede mencionar la extracción cuantitativa de ácidos nucleicos, la presencia de inhibidores en las muestras analizadas, la ocurrencia de reacciones falsas positivas debidas a amplicones contaminantes y la presencia de pocas micobacterias en algunas muestras clínicas. En un estudio comparativo ciego entre 7 laboratorios sobre la confiabilidad y reproducibilidad del PCR para detectar *M. tuberculosis*, se llegó a la conclusión de que se necesita la implementación de un sistema efectivo para monitorear sensibilidad y especificidad previo al uso confiable de la prueba para diagnóstico de tuberculosis.

Actualmente, el PCR como prueba diagnóstica de micobacteria está siendo desarrollada en varias modificaciones tecnológicas, pero hasta la fecha ninguna ha sido completamente estandarizada como prueba clínica de laboratorio. Todos estos resultados ilustran las perspectivas fascinantes pero también las precauciones necesarias que deben tomarse cuando se utiliza el poder de las técnicas de amplificación de genes para definir el agente etiológico de enfermedades infecciosas.

REFERENCIAS

1. Shinnick, T.M. & Jonas, V. 1994. Molecular approaches to the diagnosis of tuberculosis, p. 517-530. In: R. Bloom (Ed.), *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Tenover, F.C. & Unger, E.R. 1993. Nucleic acid probes for detection and identification of infectious agents, p. 3-25. In: D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White (Eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Thierry, D., Brisson-Noel, A., Vincent Lévy-Frébault, V., Nguyen, S., Guesdon, J.L., Gicquel, B. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **28**:2668-73.
4. Nolte, F.S., Mitchock, B., McGowan, J.E., Edwards, A., Okwumabua, G., Thurmond, C., Shawn Mitchell, P., Plikaytis, B. and Shinnick, T. 1993. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **31**:1777-82.
5. Clarridge, J.E., Shawar, R.M., Shinnick, T.M., and Plikaytis, B. 1993. Large scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 2049-56.

EPIDEMIOLOGIA Y DIAGNOSTICO CLASICO DE DENGUE

Zaida Lucrecia Menéndez Monjes de Escalante

Las infecciones del Dengue son originadas por cuatro serotipos de virus del Dengue, los que son antigénicamente diferentes (virus Dengue 1, virus Dengue 2, virus Dengue 3 y virus Dengue 4); éstos pertenecen a la familia flaviviridae, género flavivirus del grupo "B" de los arbovirus. El virus del Dengue causa la enfermedad más importante de los arbovirus para el ser humano, tanto en términos de morbilidad como de mortalidad. La enfermedad es transmitida por mosquitos *Aedes*, especialmente *aegypti* y en segundo lugar, el *A. albopictus*.

Desde 1956, en países del Sur-Este Asiático, Pacífico Occidental, Cuba, Islas del Caribe y Venezuela, la infección por el virus del Dengue ha causado más de tres millones de admisiones hospitalarias y más de cuarenta y cinco mil muertes. La primera epidemia de Dengue hemorrágico en este hemisferio se presentó en Cuba en 1981. Después de la epidemia cubana, cada año se han notificado millares de casos de Dengue en casi todos los países de la cuenca del Caribe, con algunos pacientes que tuvieron hemorragias. En estas epidemias se han encontrado los serotipos 1, 2 y 4 del virus Dengue. En el ser humano, cada uno de los cuatro tipos de virus del Dengue ha estado asociado al Dengue clásico y al Dengue hemorrágico.

La infección por Dengue causa una enfermedad cuyo espectro incluye desde formas que son clínicamente inaparentes hasta cuadros graves de hemorragia y "shock". Después que el mosquito introduce el virus en la piel existe un período de incubación variable (de dos a siete días) pero lo más frecuente es que dure de cuatro a cinco días.

El cuadro clínico se caracteriza por el súbito apareamiento de fiebre, cefalea, dolores osteomioarticulares, dolor retro-orbitario, fotofobia, malestar general, y que algunas veces se acompaña de "rash" y otros síntomas constitudinarios. Las características clínicas de esta enfermedad dependen, en gran medida, de la edad del paciente: los lactantes y pre escolares pueden presentar una enfermedad indiferenciada, los escolares y niños mayores pueden presentar un Dengue clásico con manifestaciones ligeras, mientras que en los adultos el cuadro clínico es más acentuado. Todo este proceso puede durar entre tres y siete días. El Dengue clásico es usualmente benigno y autolimitado aunque su convalecencia puede asociarse a un gran debilitamiento físico y prolongarse durante varias semanas.

Actualmente existen dos métodos fundamentales para establecer un diagnóstico sistemático de Dengue en el laboratorio:

- a) Aislamiento del virus.
- b) Demostración de un título creciente de anticuerpos a Dengue en el suero.

El aislamiento del virus es el procedimiento más definitivo, pero las técnicas actualmente disponibles requieren un nivel relativamente elevado de capacidades y equipo de carácter técnico.

Las pruebas serológicas son más sencillas y rápidas; sin embargo las reacciones serológicas cruzadas entre anticuerpos a Dengue y otros flavivirus causan a veces diagnósticos positivos falsos. Asimismo, la identificación exacta del serotipo del Dengue infectante es imposible de determinar usando sueros apareados con métodos serológicos ordinarios (inhibición de la hemaglutinación o fijación del complemento).

Para el diagnóstico de Dengue en el laboratorio es esencial que la recogida, el almacenamiento y el envío de muestras se haga en la forma debida y adecuada.

La situación epidemiológica del Dengue en Centro América es cada vez más alarmante. Año con año se han presentado brotes epidémicos en diversas regiones de Centro América. En 1994 la situación fué crítica especialmente para Nicaragua, ya que se presentaron brotes severos en la Ciudad de León y en la propia capital, Managua; se registró un total de 20.969 casos que hacen una tasa nacional de 4.8/1.000; además se notificaron 1.247 casos con manifestaciones hemorrágicas y una tasa de letalidad de 0.48%. También se conoció que en muestras de suero provenientes de la Ciudad de Managua se aisló Dengue serotipo 3, en colaboración con el Instituto Pedro Kouri de La Habana, Cuba. Este último hallazgo es trascendental debido a que, en la subregión Centroamericana, únicamente habían circulado los serotipos Dengue 1, Dengue 2 y Dengue 4.

Desde 1993, Costa Rica y Panamá, quienes habían sido los dos últimos países tropicales en América Latina libres de Dengue, notificaron casos de transmisión autóctona de Dengue en las últimas décadas, habiendo reportado 4.103 casos sospechosos de Dengue en Costa Rica, mientras que en Panamá se reportaron 14 casos.

En el año de 1994, El Salvador notificó 2.218 casos. En ese mismo año, en Guatemala se determinó una amplia circulación de serotipos, localizándose la presencia de dos o más serotipos en los Departamentos de Guatemala, Escuintla, Izabal y San Marcos. El resto de los departamentos ha tenido brotes epidémicos aislados, habiendo ocurrido un caso confirmado de Dengue hemorrágico en el Departamento de Zacapa.

REFERENCIAS

1. Dengue Hemorrágico: Diagnóstico, Tratamiento y Lucha. Organización Mundial de la Salud, 1987, 62 pags.
2. S. Nimmanitya. Dengue fever Dengue Haemorrhagic fever, case management. Japan, August 1994.
3. Duane J. Gubler. Vigilancia activa del Dengue y de la fiebre hemorrágica del Dengue. Center for Infectious Diseases, San Juan Laboratories, 8 pags.
4. D.J. Gubler and D. W. Trent. Emergence of Epidemic Dengue Dengue Hemorrhagic fever, as a public Health Problem in The Americas. Infectious Agents and Disease, 383-393 pags.
5. Gubler D. J. Dengue haemorrhagic fever in the Americas: Prospects for the year 2.000. Ministry of Health, México City, July 11-16, 1992, 19-27 pags.

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE DENGUE

Eva Harris

I. Introducción

- A. Aspectos clínicos y epidemiológicos: importancia de la tipificación
 1. "Antibody-dependent enhancement" (ADE)
 2. Alta tasa de ataque durante epidemias
 3. Alto porcentaje de mosquitos infectados durante epidemias
- B. Biología molecular del virus Dengue
 1. Los Flavivirus
 2. Transmisión por los mosquitos *Aedes aegypti* y *A. albopictus*
 3. Los cuatro serotipos del virus Dengue
 4. Organización del genoma (virus de ARN de hebra simple)
 5. Regiones conservadas
 6. Regiones variables entre los cuatro serotipos

II. Métodos de diagnóstico

- A. Aislamiento del virus por inoculación de cultivo de células
- B. Identificación por inmunofluorescencia indirecta (IFI)
- C. Serología (sueros emparejados: agudo y convalescente)
 1. Inhibición de hemaglutinación
 2. Fijación de complemento
 3. Anticuerpos neutralizantes
- D. Inoculación intratorácica de mosquitos, IFI
- E. RT-PCR

III. Muestras para PCR

- A. Sueros
- B. Mosquitos
- C. Sobrenadante de células infectadas
- D. Células infectadas

IV. Preparación del ARN

- A. Directo: lisis con detergente "Rapid RT-PCR"
- B. Partículas de sílica y guanidium isothiocianato
- C. Extracción y precipitación
- D. Mosquitos
 1. Filtración
 2. Clarificación
 3. Captura del ARN con sondas marcadas con biotina

V. Amplificación

- A. RT-PCR
- B. PCR directo (Morita *et al.*)
- C. PCR anidado ("nested") (Lanciotti *et al.*)
- D. Primers universales + secuenciación

VI. Detección

- A. Electroforesis en gel de agarosa: productos de diferentes tamaños
- B. Sondas no radioactivas para tipificación
- C. Sondas radioactivas

VII. Secuenciación

- A. La técnica
 - 1. Directo
 - 2. Clonaje
- B. Análisis genético
 - 1. Seguir el movimiento del virus
 - 2. Elucidar la fuente de las epidemias

REFERENCIAS

1. Lanciotti, R., Calisher, C., Gubler, D., Chang, G. and Vorndam, A. (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**:545-551.
2. Lewis, J. G., Chang, G.-J., Lanciotti, R. S. and Trent, D. W. (1992) Direct sequencing of large flavivirus PCR products for analysis of genome variation and molecular epidemiological investigations. *Journal of virological Methods*, **38**:11-24.
3. Lewis, J. G., Chang, G.-J., Lanciotti, R. S., Kinney, R. M., Mayer, L. M. and Trent, D. W. (1993) Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*, **197**:216-224.
4. Monath, T. P. (1994) Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**:2395-2400.
5. Morita, K., Tanaka, M. and Igarashi, A. (1993) Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**(10):2107-2110.
6. Vodkin, M. H., Streit, T., Mitchell, C. J., McLaughlin, G. L. and Novak, R. J. (1994) PCR-based detection of arboviral RNA from mosquitos homogenized in detergent. *Biotechniques*, **17**(1):114-116.

Floralma Cano Granados

El cólera es una enfermedad causada por *Vibrio cholerae*, usualmente del serogrupo O1 toxigénico. La vía de transmisión es fecal-oral, siendo las fuentes principales el agua y alimentos contaminados con heces de personas infectadas. La mayoría (75%) de infecciones de cólera son asintomáticas, 18% son casos leves y un 5 % son casos moderados. En su forma severa (2% de los casos) esta enfermedad se caracteriza por diarrea profusa, vómitos, deshidratación, pulso débil y calambres musculares. Si el enfermo no es rehidratado oportunamente puede morir como consecuencia de acidosis y "shock" hipovolémico.

El *V. cholerae* es un bacilo Gram negativo y oxidasa positivo. A diferencia de la mayoría de especies de vibrios no requiere de cloruro de sodio (sal) para crecer; sin embargo, la presencia de sal favorece su crecimiento. El *V. cholerae* incluye más de 130 serogrupos O (antígeno somático). De estos, el serogrupo O1 ha sido el asociado con el cólera epidémico por tener la capacidad de producir toxina colérica (CT). En 1992 apareció en la India y Bangladesh casos de cólera epidémico causados por el serogrupo O139 o también llamada cepa Bengala productora de CT. Por lo que a diferencia del resto de serogrupos (O2 a O138), únicamente los serogrupos O1 y O139 productoras de CT están asociadas con el cólera epidémico.

V. cholerae O1 se divide en los biotipos Clásico y Eltor y en los serotipos Ogawa, Inaba e Hickojima, que es raramente aislado. El biotipo Eltor es el causante de la epidemia y el serotipo Inaba al inicio de la epidemia; luego apareció el serotipo Ogawa.

La epidemia Latinoamericana de cólera se inició a principios de 1991 y llegó a Centroamérica por Guatemala en julio del mismo año. Esta epidemia es parte de la séptima pandemia que se inició en 1961. Los países de América Latina -con excepción de Uruguay y las islas del Caribe- hasta finales de 1994, han notificado un total de 1.061.188 casos de cólera con una tasa de letalidad de 0.94 % (9.989 muertes). La tasa de letalidad en 1994 fue de 1.09%. En 1995 continúan apareciendo brotes de cólera en Centroamérica, principalmente en Guatemala, El Salvador y Honduras.

El aislamiento de *V. cholerae* de muestras clínicas como ambientales tienen pasos en común. Su tolerancia a la alcalinidad y rápido crecimiento son las bases de los medios de cultivo. Cuando las muestras no van a ser procesadas en un tiempo corto, las muestras clínicas se transportan en el medio de Cary-Blair (la viabilidad de *V. cholerae* es de 4 semanas) y las muestras ambientales en refrigeración. El procesamiento de muestras, en general, incluye los siguientes pasos.

Enriquecimiento en Agua Peptonada Alcalina (APA). *Vibrio* spp. crece rápidamente en APA (pH 8.4-9.2) y a las 6-8 horas de incubación están presentes en mayor número que otros organismos. En muestras de heces líquidas de pacientes sospechosos de cólera, este enriquecimiento no es necesario porque presentan un elevado número de vibrios (10^7 - 10^8 vibrios mL). APA es comúnmente usado para recuperar bajos niveles de vibrios, particularmente de heces formadas y en muestras ambientales (hisopo de Moore, agua y alimentos) las que pueden necesitar hasta dos pasos de enriquecimiento y de varias diluciones, iniciando con 1:10. En agua y alimentos marinos, donde se encuentran otros vibrios presentes, se recomienda realizar diluciones ya duplicado de las muestras en APA e incubar además de 37 °C, que es la temperatura usual, a 42 °C. Esta temperatura favorece a *V. cholerae* y reduce el crecimiento de otros vibrios.

Aislamiento en agar selectivo Tiosulfato Sales Biliares Sacarosa (TCBS) u otros agares. El agar TCBS es el medio usual para el aislamiento de *V. cholerae* y otros vibrios. *V. cholerae* origina en este medio colonias grandes, lisas y amarillas (fermentación de la sacarosa). Las colonias sospechosas de *V. cholerae* que crecen en TCBS son subcultivadas a un agar no selectivo tales como agar sangre (AS), agar gelatina (AG), agar Mueller-Hinton (MH), y otros. A partir del crecimiento en agar no selectivo se realizan las pruebas de identificación bioquímica y serológica. En el caso de heces líquidas se pueden sembrar, simultáneamente con el agar TCBS, en un agar no selectivo para acelerar el diagnóstico.

Identificación bioquímica y serológica. Las pruebas mínimas y básicas para el diagnóstico de *V. cholerae* O1 se consideran las siguientes pruebas: oxidasa, prueba del cordón, crecimiento en caldo sin sal (0%), imagen en agar TSI y aglutinación con el antisuero polivalente de *V. cholerae* O1. Si se desea llegar a biotipo y serotipo se debe contar con los reactivos respectivos o enviar las cepas a un laboratorio de referencia. En el caso de cepas de *V. cholerae* no-O1 que se asocian a algún brote, debe investigarse el serogrupo O139.

Determinación de toxina. En las cepas aisladas, principalmente de muestras ambientales, se determina la producción de CT puesto que en el ambiente es más factible aislar *V. cholerae* no toxigénico. Existen diversos métodos: aglutinación con latex, ELISA, sondas de ADN o técnicas de PCR. Si no se cuenta con facilidades se envían las cepas a un laboratorio de referencia.

Es importante mantener los sistemas de información y vigilancia del cólera para prevenir y responder apropiadamente al resurgimiento de brotes. Para ello, en lo que se refiere a los laboratorios, es necesaria la detección oportuna de los casos de cólera, programas de control de calidad para la comprobación de los procedimientos de laboratorio, control de la inocuidad de los alimentos y calidad bacteriológica del agua. Asimismo, difundir la información sobre la importancia de *V. cholerae* O139 y mantenerse vigilantes al respecto.

REFERENCIAS

1. Center for Disease Control and Prevention and National Center for Infectious Diseases (CDC/NCID). 1994. Laboratory Methods for Diagnosis of *Vibrio cholerae*. CDC Atlanta, Georgia, USA.
2. Kaper, JB; JG Morris, Jr., MM Levine. 1995. Cholera. Clin. Microbiol. Rev., 8: 48-86.
3. Organización Panamericana de la Salud. 1995. El Cólera en las Américas. Informe No. 12.
4. Popovic T., O Orsvic, PA Blake and K. Wachsmuth. 1992. Cholera in the Americas: Foodborne aspects. J. Food Protect.
5. Shimada, T. and R. Sakasaki. 1993. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. Lancet, 346:1347

Olga Rebeca Torres Bolaños de Matute

En comparación con los métodos clásicos, los métodos moleculares que se han desarrollado y evaluado para diagnosticar *Vibrio cholerae* enterotoxigénico, son muy rápidos y sencillos. Los métodos clásicos requieren de al menos cinco días para diagnosticar *Vibrio cholerae* productor de toxina colérica, mientras que por el método de amplificación genética se pueden detectar vibrios enterotoxigénicos en cuestión de doce horas. Aunque los métodos moleculares son inhibidos por algunos alimentos marinos, son útiles para determinar qué vegetales de exportación están libres de contaminación por *V. cholerae* enterotoxigénico, así como para dar criterios en el caso de brotes de cólera en regiones libre de esta enfermedad, de manera casi inmediata.

Existen una serie de iniciadores y varios autores han descrito métodos que difieren ligeramente unos de otros, pero que en resumen se basan en la amplificación de secuencias únicas y muy conservadas de los genes que codifican la toxina colérica. Hay métodos que usan colonias aisladas de cultivos de pacientes, otros utilizan las diluciones al 1 ó 10% en peso de la muestra en agua peptonada alcalina (APA), y otros que se basan en amplificar una porción del lavado de vegetales con APA. Los métodos más sensibles utilizan una alícuota del APA después de 6-8 horas de incubación, con lo cual se incrementa la sensibilidad del método substancialmente (10^4 veces).

A pesar del alto costo de los reactivos moleculares, los métodos clásicos de análisis de alimentos requieren una serie de medios diferenciales y enriquecedores, además de requerir varios días para obtener un diagnóstico. Entonces el costo se traduce en cuantiosas pérdidas de alimentos perecederos o en energía de almacenaje en frío. Al comparar con dichas pérdidas, el costo de los análisis moleculares es realmente reducido.

Por esta razón se han desarrollado y se continúan probando métodos moleculares basados en la amplificación genética para el control de calidad de alimentos de exportación y para el control de calidad de aguas. Muchos de estos métodos se han desarrollado dentro del laboratorio del FDA de los Estados Unidos, entidad regidora de la importación de alimentos a ese país.

Los argumentos de que un resultado en base a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) detecte residuos genéticos pero que el alimento no sea un riesgo para el consumidor aún es esgrimido por algunos en contra de los métodos moleculares. Sin embargo, la velocidad con que se puede liberar un embarque al no encontrarse esos genes, justifica su uso como un método de tamizaje para reducir costos de almacenaje en frío de alimentos perecederos. Cuando un PCR para cólera es positivo, deberá confirmarse la presencia del *V. cholerae* enterotoxigénico por los métodos clásicos. Aquí radica la importancia de que los métodos seleccionados para este tamizaje sean altamente específicos y sensibles, de manera que la probabilidad de encontrar un resultado falsamente positivo o negativo, sea muy baja.

En la última década, los métodos moleculares han permitido un avance vertiginoso en el conocimiento de la patogénesis de esta infección, han permitido la tipificación fina por métodos genéticos y de epidemiología molecular, así como al desarrollo de vacunas de nueva generación para prevenir el cólera.

Tipificación de *Vibrio cholerae* por medios moleculares.

La tipificación clásica se basa en serología, determinación de biotipos (según pruebas bioquímicas), electroforesis de enzimas multilocus y fagotipos. Los dos primeros métodos están sujetos a la expresión de genes que resultan en reacciones visibles ya sea por aglutinación o bioquímicamente. La determinación de fagotipos requiere de una colección especializada de fagos de *V. cholerae*, que solamente se encuentra disponible en laboratorios altamente especializados. Los métodos moleculares, cuyas ventajas incluyen el uso de equipo y reactivos universales para cualquier microorganismo, que no requieren de expresión pues miden las características a nivel del genoma y por lo tanto no implican condiciones de reacción sumamente especializadas, han permitido la tipificación de *V. cholerae* por medio de ribotipia, de la determinación de variaciones en la secuencia de los genes *ctx*, o bien del polimorfismo en los patrones de restricción (RFLP) de los genes *ctx*.

La ribotipia mide el polimorfismo en los patrones de restricción de los genes que codifican rARN. Estos son genes sumamente conservados entre las diversas especies bacterianas, por lo cual su comparación permitió encontrar que las cepas de la epidemia Latinoamericana siguen un comportamiento clonal. Este sistema es el más útil cuando se busca encontrar el máximo de divergencia entre las clonas de *V. cholerae*. Popovic y colaboradores analizaron la colección de cepas de *V. cholerae* O1 del CDC por ribotipia con la enzima Bgl I. Ellos encontraron que la epidemia de Latinoamérica fue causada por una clona del ribotipo V (1, 2). En México, en 1994 se determinó que un brote fue causado por una clona del tipo Va (Dra. Silvia Giono, comunicación personal).

Cameron y colaboradores caracterizaron 180 cepas de *V. cholerae* O1 de la colección del CDC por electroforesis de campo ortogonal y compararon los resultados con los de electroforesis de isoenzimas y ribotipia. Estos autores reportan que este es el método más sencillo y más discriminante para tipificar *V. cholerae* O1. La comparación por ribotipos clasificó dentro de un mismo ribotipo a las cepas de la epidemia latinoamericana y a otras de otros continentes, mientras que la electroforesis de campo ortogonal pudo diferenciar la clona de Latino América de cepas con el mismo ribotipo pero aisladas de otros continentes. Asimismo, pudo diferenciar cepas toxigénicas de cepas no toxigénicas aisladas de la costa del Golfo de Estados Unidos.

Patogénesis de *Vibrio cholerae*.

V. cholerae produce una serie de productos extracelulares que tienen efectos deletéreos sobre las células eucariotas. La diarrea masiva, deshidratante que produce *V. cholerae* es inducida por la enterotoxina colérica, también llamada colerágeno o CT. Su rol importantísimo en la enfermedad fue demostrado con estudios en voluntarios. Esta es una toxina compuesta de dos subunidades, A y B, cada una de las cuales tienen una función específica. La subunidad B sirve para unir la holotoxina a la célula eucariota receptora y la subunidad A posee la función enzimática específica que actúa intracelularmente. La CT tiene cinco subunidades B idénticas y una sola subunidad A. El receptor para CT es el gangliósido Gc. El blanco intracelular de la CT es la adenilato ciclasa, uno de los sistemas reguladores más importantes de la célula eucariota, resultando en el aumento intracelular de los niveles de AMP cíclico (cAMP). Esto lleva a secreción aumentada de iones cloruro por las células de las criptas intestinales y a la reducción de la absorción de cloruro de sodio por las vellosidades intestinales (9,10). El movimiento neto de electrolitos al lumen intestinal resulta en un gradiente osmótico que provoca que fluya agua en el lumen. El volumen masivo de agua resulta en diarrea. Existe evidencia que implica que además de este mecanismo, las prostaglandinas y el sistema nervioso intestinal están involucradas en la respuesta a la CT, con reportes que estiman que hasta el 60% del efecto de la CT sobre los fluidos intestinales pueden atribuirse a mecanismos

nerviosos (4.5). Sin embargo, cepas de *V. cholerae* a las que se han removido los genes codificadores de la CT aún son capaces de inducir diarrea moderada en muchos individuos (5).

Fasano y colaboradores reportaron que *V. cholerae* produce una toxina que incrementa la permeabilidad de la mucosa intestinal afectando la estructura de la unión estrecha intracelular o *zonula occludens*. Esta actividad, descubierta al medir el transporte transepitelial de electrolitos a través del tejido intestinal, fue denominada Zot. El gen que codifica la toxina zot fue clonado y se encontró que está ubicado inmediatamente arriba del locus *ctx*. Las secuencias de zot se encuentran tanto en *V. cholerae* O1 como en no-O1; casi siempre las cepas que contienen las secuencias *ctx* contienen también las secuencias zot. Comparando la secuencia prevista de amino ácidos, la proteína codificada por Zot no presenta homología con ninguna otra toxina bacteriana, incluyendo la de *Clostridium difficile*, la cual también altera las uniones estrechas intracelulares (5).

Trucksis y colaboradores identificaron una segunda toxina denominada Ace. El producto genético de una secuencia ubicada arriba de zot puede incrementar la corriente de corto circuito en cámaras de Ussing (que son una técnica clásica para medir el transporte transepitelial a través del tejido intestinal). Al igual que CT y opuesta a Zot, esta toxina incrementa la diferencia de potencial en lugar de la conductividad. Las cepas que contienen el gen *ace* clonado producen acumulación significativa de fluido en porciones intestinales ligadas de conejo. La estructura aminoacídica predicha para esta toxina la asocia con una familia de ATPasas involucradas en el transporte de iones de calcio, y muestra similitud en cuanto a secuencia de una proteína virulenta de *Salmonella dublin*, esencial para la virulencia de esta bacteria en el ratón. Hay evidencia parcial que la Ace actúa por medio de multímeros que se insertan en la membrana eucariótica, con las superficies hidrofóbicas hacia la doble capa de lípidos y con la fracción hidrofílica hacia el interior de un poro transmembranoso, formando un canal iónico (5). Además, existe una hemolisina citolisina cuyo gen se ha clonado. En los aislados recientes de El Tor, no se ha observado esta característica, siendo pobremente hemolíticos. La toxina purificada es capaz de inducir acumulación de líquido en porciones intestinales ligadas de conejo (5).

Estas tres toxinas son las mejor caracterizadas. Los genes que codifican la hemolisina se encuentran en casi todas las cepas patógenas y no patógenas de *V. cholerae* O1 y no-O1, sin relación a la presencia de los genes *ctx*. Los genes que codifican Zot y Ace en cambio, se encuentran siempre en cepas que tienen los genes *ctx*, pero raras veces se encuentran en cepas que no los tengan, por lo que la correlación epidemiológica entre Zot y Ace con enfermedad, es grande (5). Se han descrito otras toxinas, como una tipo Shiga, otra toxina que comparte el 50% de homología con la toxina estable de *Escherichia coli*, otra denominada nueva toxina colérica, un inhibidor del canal de sodio, una hemolisina termoestable directa, las cuales no se han clonado y por lo tanto, no se ha comprobado su existencia (5).

Recientemente se han descubierto los factores de colonización que usa *V. cholerae*. Durante mucho tiempo se usó la aglutinación de eritrocitos como un sustituto para los factores de colonización, de los cuales *V. cholerae* produce por lo menos cuatro. Sin embargo, Herrington y colaboradores describieron los pilos regulados por toxina de cólera (TCP), los cuales son críticos para adherencia intestinal, y cuya importancia para enfermedad en humanos ha sido comprobada. No se conoce el receptor intestinal. Los TCP han sido estudiados exclusivamente en *V. cholerae* O1, pero se ha demostrado que se expresan en *V. cholerae* O139. Hay evidencia de que los LPS están involucrados en la adherencia de *V. cholerae* O1 a la mucosa intestinal (4).

La mayoría de estudios de *V. cholerae* han indicado que la movilidad es una propiedad de virulencia importante, ya que permiten a la bacteria entrar a la gel mucosa rápidamente y a los espacios intervillosos en unos pocos minutos. Asimismo, se ha demostrado que algunos mutantes no móviles son menos virulentos que los móviles, por diversos experimentos. Sin embargo, hay información controversial obtenida de experimentos en intestino ligado de conejos, pero estos experimentos han usado mutantes no bien caracterizados. Richardson demostró que la movilidad es claramente un factor que contribuye a la patogenicidad de *V. cholerae* y su colonización, mientras que la estructura flagelar en sí es menos importante en estos aspectos (4).

La virulencia de *V. cholerae* está regulada por muchos sistemas. El regulon ToxR controla la expresión de varios factores críticos para la virulencia de *V. cholerae*. Asimismo, la regulación en respuesta a la concentración de hierro, es importante. Esta variedad de mecanismos de regulación le permiten a *V. cholerae* optimizar su sobrevivencia en diferentes habitats, como el humano y el ambiente acuático. Asimismo, hay regulación que únicamente funciona in vivo (4).

Al combinar todos los aspectos de virulencia y regulación, el biotipo Clásico es más virulento que El Tor, causando 9% más de casos de cólera grave. Aún hay mucho por conocer respecto de la virulencia de *V. cholerae*, pero indudablemente, la biología molecular ha abierto las puertas a esta fascinante información.

REFERENCIAS

1. Wachsmuth IK, GM Evins, PI Fields, O Olsvik, T Popovic, CA Bopp, JG Wels, C Carrillo and PA Blake. 1993. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. *J. Infect. Dis.*, **167**:621-626.
2. Popovic T, C Bopp, O Olsvik and K Wachsmuth. 1993. Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for vibrio cholerae O1. *J. Clin. Microbiol.*, **31**:2474-2482.
3. Cameron DN, FM Khambaty, IK Wachsmuth, RV Tauxe and TJ Barret. 1994. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by Pulsed-field Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **32**:1685-1690.
4. Kaper JB, JG Morris Jr, and MM Levine. 1995. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, **8**:48-86.
5. Kaper JB, A Fasano and M Trucksis. 1994. Toxins of *Vibrio cholerae*. In IK Wachsmuth, P Blake and O Olsvik (eds), *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, DC.

CURRICULUM VITAE DE LOS PROFESORES PRINCIPALES

**NEXT PAGE(S)
left BLACK**

FLORA EUGENIA ARANA FIGUEROA

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO: Coatepeque, 13 de mayo de 1962

NACIONALIDAD: Guatemalteca

ESTADO CIVIL: Soltera

PROFESION: Químico Biólogo

GRADO ACADÉMICO: Licenciatura

DIRECCION: Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

TELEFONOS: (502 2) 380336 al 40 : 690791 al 95, ext. 332 333

TELEFAX: (502 2) 380354 380212

CARGO: Investigador Asociado
Centro de Investigaciones y Adiestramiento en Entomología Médica (MERTU' G)
Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala

OCUPACION: A cargo del Laboratorio de Leishmaniasis

ENTRENAMIENTOS.

Jul 1993 Seminario Taller Sobre Técnicas Moleculares en el Diagnóstico de Leishmaniasis
Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias
Facultad de Medicina, Universidad de Panama

May-Jul 1991 Producción Masiva de Anticuerpos Monoclonales en Bioreactor de Fibra Hueca
Centro de Ingeniería Química y Biotecnología
La Habana, Cuba

CURRICULUM VITAE

ALEJANDRO ANTONIO BELLI

FECHA DE
NACIMIENTO:

3 de octubre de 1961

CARGO ACTUAL:

Director de Parasitología
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
Ministerio de Salud de Nicaragua

DIRECCION:

Dirección de Parasitología
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
Apartado Postal 2900
Managua, Nicaragua, C.A.

TELEFAX:

(505 2) 897723

CORREO ELECTRONICO:

cnr@nicarao.apc.org

ESTUDIOS DE POST-GRADO:

1992 - 1993

Maestría en Ciencias (M.Sc.) con Distinción
Biología Molecular Aplicada a Enfermedades Infecciosas
London School of Hygiene and Tropical Medicine
Londres, Inglaterra

ESTUDIOS DE PRE-GRADO:

1981 - 1985

Licenciatura en Biología
Loyola University
New Orleans, Louisiana, USA

ESTUDIOS DE PRIMARIA & SECUNDARIA:

1967 - 1978

Bachillerato en Ciencias y Letras
Colegio Centro América
Managua, Nicaragua, C.A.

PUBLICACIONES CIENTIFICAS:

- 1 Darce, M., Morán, J., Palacios, X., Belli, A., Gómez-Urcuyo, F., Zamra, D., Valle, S., Gantier, J.C., Momen, H. and Grimaldi, G. (1991) Etiology of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**:58-59.
- 2 Belli, A.A., Miles, M.A. and Kelly, J.M. (1994) A putative *Leishmania panamensis* - *Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology*, **109**:435-442.
- 3 Noyes, H.A., Belli, A.A. and Mangon, R. Appraisal of various RAPD-PCR primers for *Leishmania* identification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. (In Press)
- 4 Biochemical Education

FLORIDALMA CANO GRANADOS

DIRECCION POSTAL: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)
Apartado Postal 1188
01901 Guatemala, Guatemala, Centro América

TELEFONOS: (502 2) 723762 al 67

TELEFAX: (502 2) 736529

CORREO ELECTRONICO: fcano@incap2.gt.org

EDUCACION Y ENTRENAMIENTOS:

Ene 1977 Licenciatura en Microbiología, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), Guatemala
1978 Entrenamiento en Bacteriología, Hospital de Servicios de Salud Pública, San Francisco, California
Oct-Dic 1980 Microbiología en Leche, Universidad Austral, Valdivia, Chile (FAO)
1983 Bioestadística, USAC
1986 Diferentes Talleres en Bacteriología
1983 - 1987 Diferentes cursos de Docencia Universitaria

HONORES:

1983, 1985, 1993 Primer lugar "Premio Rubén Mayorga" por el mejor trabajo de investigación de Microbiología realizado en Guatemala (Asociación Guatemalteca de Microbiología)
1987 Prosecretaria de la Asociación Guatemalteca de Microbiología (AGM)
1986 Invitada como conferencista en cursos de capacitación, congresos de Microbiología en Centro América
1984 - 85 Prosecretaria de Junta Directiva del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala
1991 y 1994 Asesora de la mejor tesis del año. Escuela Química Biológica, Facultad de Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala
1994 - 95 Miembro del Comité Nacional de Normas de Productos Lácteos, COGUANOR

EXPERIENCIA PROFESIONAL:

1975 - 77 Instructor de laboratorio (Profesor Asistente) Departamento de Microbiología, Universidad de San Carlos de Guatemala
1978 - 85 Profesor Asistente de la Universidad de San Carlos de Guatemala y asesora de diez tesis
1986 Bacteriología. Programa de Nutrición e Infección, INCAP
1990 - 92 Supervisora del Laboratorio de Referencia de Diagnóstico de Colera en Centro América, INCAP
1986 - 94 Tutora de nueve estudiantes de Química Biológica en elaboración de tesis, INCAP
Asistencia a reuniones profesionales a nivel nacional e internacional

INVESTIGACION:

- 1986 - 87 Epidemiología de diarrea en un área urbano-marginal de la ciudad de Guatemala (OMS)
- 1987 - 90 Epidemiología de diarrea persistente (USAID)
- 1991 - 92 Vigilancia Epidemiológica del Cólera (USAID)
- 1992 - 93 Higiene de Alimentos en el Destete (OMS)
- 1994 - 95 Prevalencia de vibrios patógenos en camarones y su mejoramiento sanitario por aplicación de irradiación (IAEA)

PUBLICACIONES:

1. Cano, F., Cruz, J.R., Bartlett, A. Contaminación fecal en alimentos y agua consumidos en una comunidad rural de Guatemala. Informe anual INCAP. 1990
2. Cruz, J.R., Cano, F., Rodríguez, L., Ríos, C., Guerra, P., Leonardo, Z. *Shigella dysenteriae* in Guatemala. MMWR, 40(25):421-428, 1991.
3. Cruz, J.R., Cano, F. y colaboradores. Infection and diarrhea due to *Cryptosporidium* among Guatemalan infants. J. Clin. Microbiol., 26:88-91, 1988.
4. Cano, F., Chávez, J.R.M., Cruz, J.R. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* associated with respiratory disease in Guatemala. APUA Newsletter, 7(3):1,2,8, 1989.
5. Cano, F., Estrada, M.E. y Cruz, J.R. Sobrevivencia de *Vibrio cholerae* 01 en masa y tortillas de maíz. Avances, 3:9-10, INCAP.
6. Torres, M.F., Cano, F. y colaboradores. Etiología y Diagnóstico de laboratorio de cólera. OPS, publicación Técnica No. 1, Guatemala 1991.
7. Cruz, J.R., Cano, F., Cáceres, P., Chew, F. and Pareja G. Infection and diarrhea due to *Cryptosporidium* among Guatemalan infants. J. Clin. Microbiol., 26:88-91, 1988.
8. Cruz, J.R., Cano, F. and Cáceres, P. Association of human milk sIgA antibodies with maternal exposure to microbial antigens. Immunology of the neonate and human milk. Advances in Experimental Medicine and Biology, 310:193-199, 1991.
9. Cruz, J.R., Cano, F., Bartlett, A., Méndez, H. Infection, diarrhea and dysentery due to *Shigella* species and *Campylobacter jejuni* among Guatemala rural children. Ped. Infec. Dis. J. (aceptada para publicación).

ANNABELLE FERRERA BOZA

- TITULOS:** Maestra en Ciencias Biología Molecular
Licenciada en Biología
Tecnóloga Médica
- CARGO:** Investigador Científico y Catedrático
Dirige Laboratorio Biología Molecular
- AFILIACION INSTITUCIONAL:** Departamento de Microbiología
Universidad Nacional Autónoma de Honduras
- DIRECCION:** Departamento de Microbiología - UNAH
Ciudad Universitaria
Tegucigalpa, M.D.C., Honduras, C.A.

Apartado Postal 30078
Tegucigalpa, M.D.C., Honduras, C.A.
- TELEFONOS:** (504) 325836 / 339567
- TELEFAX:** (504) 325836 / 343849
- IDIOMAS:** Inglés, Francés, Alemán
- GRADOS ACADEMICOS:** Maestra en Ciencias (MSc.) Biología Molecular, Vrije Universiteit Brussel, Bruselas, Bélgica; Licenciada en Biología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Honduras; Tecnóloga Médica, Cherry Hill School of Medical Technology, New Jersey, E.U.
- CURSOS:**
- 1994 Biología Molecular en Gastroenterología, México, D.F.; PCR de *M. tuberculosis*, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán," México, D.F.; PCR de Papillomavirus, Dpto. de Microbiología, Sección Biología Molecular, Universidad de Nijmegen, Holanda; Organización y Coordinación de Curso de Biología Molecular, Dpto. de Microbiología, UNAH.
 - 1993 Tecnología del DNA Recombinante, Univ. Central de Venezuela, Caracas; Huelas de DNA (RFLP) de *M. tuberculosis*, Univ. Central de Venezuela, Caracas; PCR de VIH, Hepatitis C y Citomegalovirus en Louisiana State University-International Center for Medical Research and Training, San José, Costa Rica.
 - 1992 Banco de Sangre Centro América y República Dominicana, San José, Costa Rica; Técnicas de Hibridización y PCR, Dept. de Microbiología, Sección Biología Molecular, Univ. de Nijmegen, Holanda.

- 1991 Genética Molecular. INDRE, México, D.F.: Histocompatibilidad. INDRE, México, D.F.
- 1990 Inmunología. San José, Costa Rica.
- 1989 Cursos de la Maestría de Medical and Pharmaceutical Research, Vrije Universiteit Brussel, Bruselas, Bélgica: Técnicas en Virología, Institut Pasteur du Brabant, Bruselas, Bélgica.
- OTROS CURSOS: Matemática y Ciencias, Rutgers State University, New Jersey, E.U.; Computación: MS-DOS, Word Perfect, Windows, Lotus, EpiInfo, SPSS-PC +.

CONFERENCIAS Y SEMINARIOS:

- 1994 13th International Papillomavirus Conference (Poster), Amsterdam, Holanda; Reunión Anual de la Asociación Americana de Química Clínica, New Orleans, La.; Expositora en Avances y Actualización en Ciencias Fisiológicas, Tegucigalpa; Prioridades de Investigación en SIDA, Tegucigalpa.
- 1993 Expositora, III Congreso Nacional de Microbiología e Inmunohematología, Tegucigalpa; Simposio en Enfermedades Virales, San José, Costa Rica; Uso e Interpretación de Pruebas en el Laboratorio Clínico, Tegucigalpa; Congreso de Biotecnología Habana '92, La Habana, Cuba; Expositora en Programa de Educación Continua, Colegio de Microbiólogos, Tegucigalpa.
- 1991 Errores Congénitos del Metabolismo, Tegucigalpa; Expositora, IX Semana Científica, Tegucigalpa; Inmunología Clínica, Tegucigalpa; III Congreso de Neuropsicología, Tegucigalpa.
- 1990 Expositora IX Congreso Centroamericano de Microbiología, San Pedro Sula; Progreso en Agentes Diagnósticos, Antivirales y Vacunas en SIDA y Hepatitis, San José, Costa Rica; II Curso Internacional en Alergia e Inmunología, Histocompatibilidad y Transplante, Tegucigalpa; IV Curso Nacional de Enfermedades Infecciosas, Tegucigalpa; III Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, México, D.F.
- 1989 Congreso Internacional de Inmunología, Berlín, Alemania; Taller en Electroforesis, Univ. Católica de Lovaina, Bélgica.
- 1988 Seminario de Inmunotolerancia, Vrije Universiteit Brussel, Bruselas, Bélgica.

DISTINCIONES:

Mejor alumno en Tecnología Médica; Medalla de Oro mejor estudiante carrera de Biología; Beca de la Agence General de Cooperation et Developpement (AGCD) del Gobierno de Bélgica.

PUBLICACIONES:

Nacionales e internacionales

CURRICULUM VITAE

EVA HARRIS

DATE OF BIRTH: 08/06/1965

ADDRESS: Programa de Biología Molecular Aplicada y Transferencia
de Tecnología Apropriada
Program in Molecular Parasitology
University of California, San Francisco
3333 California Street, Suite 150
San Francisco, CA 94118

TELEPHONE: (415) 476 6850

TELEFAX: (415) 476 0664

E MAIL: eharris@cgl.ucsf.edu

EDUCATION:

- * Stuyvesant High School, New York, N.Y. Diploma 1983
- * Harvard University, Cambridge, MA B.A., *magna cum laude* 1987 Biochemical Sciences
- * University of California, Berkeley Ph.D. 1993 Molecular & Cell Biology

RESEARCH EXPERIENCE:

- 1993-Present Post-Doctoral Fellow
Dr. Nina Agabian
Intercampus Program in Molecular Parasitology
University of California at San Francisco
San Francisco, CA
- 1988-1993 Graduate student
Dr. Jeremy Thorner
Division of Biochemistry and Molecular Biology
Department of Molecular and Cell Biology
University of California at Berkeley
Berkeley, CA
- Summer 1986 Research Assistant
Dr. Gottfried Schatz
BioCenter, University of Basel
Basel, Switzerland

- Spring 1986 Research Assistant
 Dr. Lan Bo Chen
 Dana Farber Cancer Institute
 Harvard Medical School
 Boston, Massachusetts
- Summer 1985 Research Assitant
 Dr. Jacques Kruh
 Institut de Pathologie et Biologie Moléculaire et Cellulaire
 Paris, France
- Summer 1984 Research Assistant
 Dr. Ron Calabrese
 Marine Biological Labs
 Woods Hole, Massachusetts

TEACHING EXPERIENCE:

- Spring 1995 Coordinator and Instructor
 Applied Molecular Biology Workshop: Phase II, May 8-19, 1995
 Hospital Vozandes and Instituto Juan César García
 Quito, Ecuador
- Fall 1994 Coordinator and Instructor
 International Postgraduate Course: The Polymerase Chain Reaction in Basic
 Research, Biomedical Diagnosis, and Environmental Surveillance, December 5-15,
 1994
 Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba
- Spring 1994 Coordinator and Instructor
 First Ecuadorian Applied Molecular Biology Workshop, April 25-29, 1994
 Hospital Vozandes and Universidad Central del Ecuador
 Quito, Ecuador
- Fall 1992 Coordinator and Instructor of Laboratory Workshop
 Rockefeller Foundation Conference on Linking Molecular Epidemiology, Field
 Investigations and Health Services Research, October 5-9, 1992
 Stanford University, Stanford, CA
- Fall 1992 Instructor, Biochemistry and Molecular Biology Pro-seminar, "Applications of
 Molecular Biology to Medicine and Public Health in Developing Countries"
 University of California Berkeley, Berkeley, CA
- Summer 1992 Course Coordinator and Instructor
 Second Applied Biotechnology Workshop in Nicaragua, Molecular Diagnostic
 using PCR and Non-radioactive DNA Probes
 Ministerio de Salud
 Managua, Nicaragua

- Summer 1991 Course Coordinator and Instructor
 First Applied Biotechnology Workshop in Nicaragua: Introduction to
 Molecular Biology and Molecular Diagnostics: PCR Detection of *Leishmania*
 Ministerio de Salud
 Managua, Nicaragua
- Spring 1991 Teaching Assistant for General Biochemistry (for majors)
 University of California Berkeley, Berkeley, CA
- Fall 1989 Teaching Assistant for Upper Level Biochemistry Lab Course
 University of California Berkeley, Berkeley, CA
- Summer 1989 Lab/technical assistance; workshop in reading scientific English;
 science course
 Departamento de Parasitología, División de Leishmaniasis
 Ministerio de Salud
 Managua, Nicaragua
- Spring 1988 Lab/technical assistance; course in conventional technical English & science
 Ministerio de Salud
 Managua, Nicaragua

LANGUAGE PROFICIENCY:

Fluent in English, French, Spanish (writing, reading and speaking)

PUBLICATIONS:

Original articles

1. Harris, E., López, M., Arevalo, J., Bellatin, J., Belli, A., Moran, J. and Orrego, C. (1993) Short courses on DNA detection and amplification in Central and South America: the democratization of molecular biology. *Biochemical Education*, **21**(1):16-22.
2. Harris, E., Watterson, D.M. and Thorner, J. (1994) Characterization of site-specific mutations in a consensus calmodulin expressed in yeast reveals a critical function for the central helix. *Journal of Cell Science*, **107**:3235-3249.
3. Harris, E., Yaswen, P. and Thorner, J. (1995) Gain-of-function mutations in a human calmodulin-like protein identify residues critical for calmodulin action in yeast. *Molecular and General Genetics*, **247**(2):137-147.
4. Harris, E., Brown, C. and Thorner, J. (1995) Genetic and cytological evidence for an essential role of colmodulin in spindle organization and microtubule orientation. Submitted for publication.
5. Harris, E., Dungan, J., Kolberg, J., Urdea, M., White, T. and Agabian, N. (1995) Branched DNA based nonradioactive detection of *T. brucei* spp. in blood. Manuscript in preparation.

Meeting reports

Harris, E., Belli, A. and Agabian, N. (1994) Introduction and implementation of molecular technology for the diagnosis and epidemiology of tropical infectious diseases in Latin America. Abstract, Biotechnologia Habana '94 Conference, Havana, Cuba, November 28-December 3, 1994.

Harris, E., Kolberg, J., Urdea, M. and Agabian, N. (1994) A nonradioactive branched DNA-based technique for detection of *Trypanosoma brucei* spp. in blood. Abstract, Biotechnologia Habana '94 Conference, Havana, Cuba, November 28-December 3, 1994.

Harris, E., Belli, A. and Agabian, N. (1994) Introduction and implementation of molecular technology for the diagnosis and epidemiology of tropical infectious diseases in Latin America. Abstract from Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, MA, September 18-22, 1994.

Harris, E., Watterson, D. M. and Thorner, J. (1991) Structure function analysis of site-specific mutants of a colmodulin homolog expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Abstract from Cold Spring Harbor Meeting on Yeast Cell Biology, August 13-18, 1991.

Harris, E., Watterson, D. M. and Thorner, J. (1991) Structure function analysis of site-specific mutants of a colmodulin homolog expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Abstract from Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, San Francisco, May 23-27, 1991.

HONORS:

- *American Society for Biochemistry and Molecular Biology: Award for Ecuador Workshop, 1994
- *U.C. Berkeley University Graduate Fellowship, 1991-1993
- *Outstanding Graduate Student Instructor Award, U.C. Berkeley, 1990
- *National Science Foundation Graduate Fellowship, 1988-1991
- *B.A. *magna cum laude* in Biochemical Sciences, Harvard University, 1987
- *John Harvard Scholarship for Academic Distinction
- *Harvard College Scholarship for Academic Distinction
- *Radcliffe College National Scholarship
- *Phi Beta Kappa, Harvard University, 1987

RICARDO LUJAN LUNSFORD

LUGAR Y FECHA
DE NACIMIENTO:

Guatemala, 6 de febrero de 1951

ESTADO CIVIL:

Casado, cuatro hijos

DIRECCION:

Centro de Estudios en Salud
 Instituto de Investigaciones
 Universidad del Valle de Guatemala
 18 Avenida 11-95, Zona 15, Vista Hermosa 3
 Apartado Postal 82
 01901 Guatemala, Guatemala, Centro América

TELEFONOS:

(502 2) 380336 al 380340 692563 ext. 227

TELEFAX:

(502 2) 380212; Cable: UVALLE

CORREO ELECTRONICO:

rlujan@uvg.edu.gt

EDUCACION:

Título	Campo de Estudio	Institución	Fechas
--	Biología	Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala	Feb. 1969 - Dic 1971
B.A.	Biología	Colby College Waterville, Maine	Sep. 1972 - Jun. 1974
M.Sc.	Microbiología Médica	University of Florida Gainesville, Florida	Jul. 1974 - Ene. 1977
Ph.D.	Parasitología	University of Georgia Athens, Georgia	Ene. 1981 - Ene. 1985

AREAS DE INTERES PROFESIONAL:

Epidemiología, inmunología y control de enfermedades parasitarias, especialmente por parásitos extra-intestinales (oncoscercosis, leishmaniasis y malaria); Biotecnología aplicada a salud; Desarrollo y gestión institucional; Cooperación multinacional.

NATURALEZA DEL TRABAJO ACTUAL:

Profesor y Director del Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, que incluye planificación, supervisión y ejecución de proyectos de investigación y cooperación con organizaciones nacionales e internacionales en estudios sobre salud y biotecnología, enseñanza a nivel de pregrado, talleres en tópicos específicos y supervisión de tesis a nivel de pregrado y posgrado.

EMPLEO Y EXPERIENCIA PROFESIONAL.

Profesor y Director, Centro de Estudios en Salud, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala	Mar. 1988 - a la fecha
Coordinador Técnico, "Plan Nacional para la Eliminación de la Oncocercosis en Guatemala"	Jun. 1993 - Sep. 1994
Gerente de Proyecto, "Distribución Masiva de Ivermectina para el Control de la Oncocercosis en el Departamento de Suchitepéquez, Guatemala"	Ene. 1992 - Sep. 1994
Profesor Asociado Adjunto, Department of Tropical Medicine of the School of Public Health and Tropical Medicine, Tulane University Medical Center, Tulane University, New Orleans, Louisiana	Sep. 1991 - Jun. 1993
Immunólogo Parasitólogo, Programa de Inmunología, Intección y Nutrición, División de Nutrición y Salud, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala	Jul. 1986 - Mar. 1988
Profesor y Director, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala	Feb. 1985 - Jun. 1986
Asistente de Investigación, Department of Parasitology, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, Athens, Georgia	Mar. 1981 - Dic. 1984
Investigador Asociado, Medical Entomology Research and Training Unit Guatemala, Centers for Disease Control, U. S. Public Health Service	Ene. 1980 - Dic. 1980
Profesor, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Humanidades Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala	Feb. 1977 - Dic. 1980

CONSULTORIAS, NOMBRAMIENTOS ACADÉMICOS Y PROFESIONALES:

Consultor a varias organizaciones incluyendo el Programa de Eliminación para la Oncocercosis en las Américas (OEPA); Diplomado Latinoamericano en Parasitología Médica, UNAM-OPS OMS; La Comisión Nacional para el Control de la Oncocercosis (CONACCO), Guatemala; OPS OMS en oncocercosis, leishmaniasis y malaria; Conferencia Interamericana Sobre Oncocercosis (IACO); Comisión para el Estudio de la Leishmaniasis, Servicio de Sanidad Militar, Ministerio de la Defensa, Guatemala; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), Guatemala; Comité Nacional de Biotecnología (CONBIOTEC), Guatemala; Programa Regional Latino Americano de Biotecnología (PNUD/UNESCO/ONU/DE); Red Centroamericana de Enfermedades Tropicales (REDCENT) del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología (CYTED); Tercer Programa M.Sc. en Ciencias Biomédicas, Karolinska Institutet Centro América; Centro de Estudios sobre Sensoriopatas, Senectud e Impedimentos y Alteraciones Metabólicas (CESSIAM); Comité Pro Ciegos y Sordos de Guatemala, Guatemala; International Eye Foundation (IEF), Bethesda, Maryland; Instituto de Relaciones Europeo-Latino Americanas (IRELA), Madrid, España; Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA) Organización de los Estados Americanos (OEA), Guatemala.

Sigma-Xi Grant-in-Aid of Research (1977); Program in Science and Technology Cooperation (PSTC); USAID (1987-1989); Scientific Working Group on Leishmaniasis; TDR/WHO (1988-1991); Programa Regional de Biotecnología PNUD/UNESCO/ONUDI (1989-1991, 1994); Pan American Health Organization (1989-1991); US-Israel Cooperative Developmental Research Program (CDR); USAID (1989-1993); Scientific Working Group on Leishmaniasis; TDR/WHO (1989-1993); National Biotechnology Committee (1991-1994); USAID International Eye Foundation (1991-1994); River Blindness Foundation International Eye Foundation (1992); Onchocerciasis Elimination Program for the Americas (OEPA) (1993-1994); Imperial College; Edna McConell Clark Foundation (1993-1995); Third M.Sc. Program in Biomedical Sciences, Karolinska Institutet Central America (1994-1995); European Economic Community (1993-1996).

EJEMPLOS DE PROYECTOS DE INVESTIGACION:

El Impacto del Tratamiento Comunitario con Ivermectina en la Transmisión de *Onchocerca volvulus* en Guatemala. Establecido por Técnicas Modernas y Convencionales; Estudios Sero Epidemiológicos para Identificar Antígenos y una Vacuna a Oncocercosis; Análisis de Proteínas Inmunogénicas de Microfilarías, Vermes Adultos y Productos Excretados/Secretados de *Onchocerca volvulus*. Distribución Masiva de Ivermectina para el Control de la Oncocercosis en el Departamento de Suchitepequez, Guatemala; Oncocercosis en Guatemala: Evaluación del Foco en Huehuetenango para la Distribución Masiva de Ivermectina y Eliminación de la Enfermedad en la Frontera Guatemala-México; Plan Nacional para la Eliminación de la Oncocercosis en Guatemala; Respuesta Inmune Celular a Leishmaniasis Cutánea Americana en Varones Guatemaltecos Adultos, Antes y Después de Terapia; Leishmaniasis Cutánea Americana: Un Modelo para el Desarrollo de una Vacuna a la Enfermedad en Humanos; Ensayos de Vacunación con Antígenos Moleculares a Leishmaniasis Cutánea del Nuevo Mundo en Primates No-Humanos; Respuesta Inmune Celular y Humoral a *Leishmania braziliensis panamensis* en el Mono Tecolote (*Aotus trivirgatus*); Influencia de la Malaria Materna en el Peso al Nacer; Producción Masiva de Anticuerpos Monoclonales: Un Esfuerzo Compartido en Latinoamérica; I Seminario-Taller Nacional sobre Técnicas Electroforéticas Aplicadas a la Salud, Agricultura e Industria; I Seminario-Taller Nacional sobre Técnicas Cromatográficas Aplicadas a Biomoléculas; I Seminario-Taller Centro Americano sobre Biología Molecular y Técnicas de ADN Recombinante; Curso Taller PCR* & Sondas no Radioactivas para el Diagnóstico de Enfermedades Tropicales e Infecciosas de Mayor Prevalencia en la Subregión Centroamericana.

ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS Y PROFESIONALES INVITACION A SEMINARIOS Y CONFERENCIAS:

Aproximadamente 159 en varios países como Alemania, Brasil, Burkina Faso, Cuba, Ecuador, El Salvador, Estados Unidos de Norte América, Guatemala, Holanda, Honduras, Inglaterra, Kenya, México, Panamá, República Dominicana y Venezuela.

ASOCIACIONES PROFESIONALES:

The American Society for Microbiology (1974); Sigma Xi; The Scientific Research Society of North America (1977-1985); Sociedad Guatemalteca de Microbiología (1977); American Society of Parasitologists (1982); American Society of Tropical Medicine and Hygiene (1984); Asociación Guatemalteca de Parasitología y Medicina Tropical (1985); Asociación Centro Americana de Parasitología y Medicina Tropical (1989); Asociación Guatemalteca de Primatología (1992).

MENCIONES HONORIFICAS Y BECAS:

Universidad del Valle de Guatemala (1969-1971); Latin American Scholarship Program of American Universities (LASPAU) (1972-1977); Colby College (1972-1974); Charles A. Dana Scholarship (1973); Sigma Xi, The Scientific Research Society of North America (1977-1985); General Scholarship Program for Special Education (BEGES), Organization of American States (1981-1982); Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), World Health Organization, (1983-1985); condecoración "Medalla Monja Blanca de Primera Clase" (1987); condecoración "Medalla de Mérito Intelectual" (1989).

IDIOMAS: Español e Inglés.

PUBLICACIONES - ARTICULOS, CAPITULOS EN LIBROS - RESUMENES

Veintisiete publicaciones científicas y técnicas; aproximadamente 95 resúmenes en congresos nacionales e internacionales.

EYDA LISSETTE MENDIA ALARCON DE CAMPOLLO

TITULO: Químico Biólogo en grado de Licenciada

ESTUDIOS DE ESPECIALIZACION:

Instituto de Salud Pública de Chile, Ministerio de Salud Pública de Chile
Bacteriología de Micobacterias y Programa de Tuberculosis (1989)

OTROS ESTUDIOS:

USAC, Guatemala, sobre: Docencia Universitaria, (1984, 1988)

INICE (Instituto Nacional de Investigación y Capacitación Educativa) sobre
Enfermedades parasitarias prioritarias en América Latina, Honduras (1994), con aval de
Universidad de Tulane U.S.A. y Honduras

CARGOS DESEMPEÑADOS:

En el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social:

Jefe laboratorio Clínico del Dispensario Antituberculoso Central (1984-1991)

Jefe laboratorio Clínico del Dispensario Antituberculoso Infantil (1984-1991)

Jefe del Laboratorio Central y de Referencia Nacional en Tuberculosis, DGSS (1991-a
la fecha)

Integrante de la Comisión Nacional de Tuberculosis, (1988-1989)

Representante Nacional ante la Comisión Latinoamericana de Bacteriología de la
Tuberculosis (COLABAT), con sede en Buenos Aires, Argentina

REPRESENTACIONES NACIONALES

- 1989 VII Seminario Nacional de Bacteriología de la Tuberculosis, Santiago de Chile
- 1990 I Seminario de Evaluación del Programa de Control de la Tuberculosis a nivel
Centroamericano, Guatemala
- 1991 II Taller Centroamericano sobre la Organización de la Red y su participación en el Programa
de Control de la Tuberculosis, San Salvador, El Salvador
- 1993 III Seminario de Evaluación del Programa de Control de la Tuberculosis, Guatemala
- 1994 I Curso de Enfermedades Parasitarias Prioritarias en América Latina, Tegucigalpa, Honduras
- 1994 V Seminario Centroamericano y del Caribe, sobre la Evaluación de Programas de Control
de la Tuberculosis, San Salvador, El Salvador

ZAIDA LUCRECIA MENENDEZ MONJES DE ESCALANTE

NACIONALIDAD: Guatemala

EDAD: 39 años

DIRECCION: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
5ta. Avenida 11-40, Zona 11
01011 Guatemala, Guatemala, C.A.

TELEFONO: (502 2) 721348

ESTUDIOS:

Pre Universitario Maestra de Educación Primaria Urbana

Universitario Médico y Cirujano
Universidad de San Carlos de Guatemala

Post Grado Anatomo Patólogo

Sub-especialidad Virología

PUESTOS ACTUALES:

Jefe, Unidad de Laboratorio de Enfermedades Transmitidas por Vectores,
Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Ministerio de Salud
Pública

Sub-jefe, Departamento de Patología, Centro Médico Militar

ALVARO MOLINA CRUZ

LUGAR Y FECHA
DE NACIMIENTO:

Guatemala, 19 de febrero de 1965

DIRECCION
DE TRABAJO:

Departamento de Bioquímica
Instituto de Investigaciones
Oficina I,-212
Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, Guatemala, C.A.

TELEFONOS:

(502 2) 380336 al 380340, Ext. 232

TELEFAX:

(502 2) 380212

CORREO ELECTRONICO:

amolnac@uvg.edu.gt (INTERNET)

EDUCACION y TITULOS:

- 1992 Doctorado (Ph.D.) en Química Biomolecular, Universidad de Wisconsin en Madison, Wisconsin, E.U.A.
- 1987 Licenciatura en Bioquímica -*Cum Laude*-, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- 1987 *Baccalaureatus* en Bioquímica, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

EXPERIENCIA PROFESIONAL:

Profesor del Departamento de Bioquímica e Investigador Asociado al Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala. Agosto 1993 a la fecha.

Auxiliar de Enseñanza (química biomolecular), Universidad de Wisconsin-Madison. Julio 1992 a Enero 1993.

Asistente de Investigación (química biomolecular), Universidad de Wisconsin-Madison. Mentor: Dr. Mabel Hokin-Neaverson. Agosto 1987 a Enero 1993.

Asistente de Investigación (bioquímica), Universidad del Valle de Guatemala. Mentor: Dr. Elvira de Mejía. Agosto 1986 a Agosto 1987.

Auxiliar de Enseñanza (química, matemáticas, bioquímica) Universidad del Valle de Guatemala. Enero 1984 a Mayo 1987.

DISTINCIONES ACADÉMICAS:

- 1988 PACE Award (Premium for Academic Excellence), Iowa State University, E.U.A.
- 1987 Markey Fellowship, Universidad de Wisconsin-Madison.
- 1984-1986 Estudiante Distinguido, Universidad del Valle de Guatemala.

ORGANIZACIONES PROFESIONALES:

- Representante de la Universidad del Valle de Guatemala en la Comisión de Biotecnología del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) de Guatemala.
- Miembro del Comité Nacional de Biotecnología (CONBIOTEC).

PUBLICACIONES:

Tesis

1. Regulation of the Na-K-Cl Cotransporter in Avian Salt Gland. 1992. University of Wisconsin-Madison, U.S.A.
2. Carotenoides del Aceite y Subproductos de Palma Africana como Fuente de Pigmentación para Yema de Huevo. 1987. Universidad del Valle de Guatemala.

Artículos

1. Molina Cruz, A. (1995) La Chaya (*Cnidioscolus acuminifolius*, *Cnidioscolus chayamansa*). Boletín de Recursos Fitogenéticos. Facultad de Agronomía, USAC. No. 1:7-8.
2. Molina Cruz, A. (1994) Aplicaciones de la Ingeniería Genética en la Medicina. I Simposium sobre ADN Recombinante y sus Aplicaciones. USAC.
3. Molina-Cruz, A. and Hokim-Neaverson, M. Identification of the phosphorylated 150 kDa protein in avian salt gland membranes as a specific bumetanide binding protein, presumed to be the (Na-K-Cl) cotransporter. (Manuscrito en revisión para publicarse).
4. Molina-Cruz, A., Hokim-Neaverson, M. and Sadeghian, K. (Na-K-Cl) Cotransporter activity in membrane vesicles from duck salt gland is activated by treatment of slices with acetylcholine or an analog of cyclic-AMP and the activation requires protein phosphorylation. (Manuscrito en revisión para publicarse).
5. Hokim-Neaverson, M., Sadeghian, K. and Molina-Cruz, A. Bumetanide binding in the duck salt gland, and the effects of acetylcholine and cAMP analog. (Manuscrito).

CONFIDENTIAL

LEILA SMITH

ADDRESS: 1379 Church Street
San Francisco, California 94114-3294

PHONE: (415) 550 1588

EXPERIENCE:

- 1990 - present **PROMEGA CORPORATION**
San Francisco, California
Field Applications Specialist
Sales and account management for all Western states for two years and for Northern California, Nevada, Utah since April 1, 1993.
Sales, technical-scientific training and support to 30 account representatives and five sales managers, includes negotiating agreements and contracts, establishing sales strategies, presenting scientific seminars to our scientific customers and organizing scientific hands-on workshops. Assessment and communication of new technologies and product suggestions to in-house Research & Development department. Primary communication link between customer and all in-house departments.
- 1993 - 1995 **PERKIN ELMER CORPORATION**
San Francisco, California
Molecular Biology Reagents Consultant
Accounts management included seminars on Molecular Biology products, presentation of new and existing technologies and products, negotiation of agreements and contracts. Also included establishing donations to Human Genome Education Program and to Dr. Eva Harris for technology transfer programs in Latin America.
- August 1988 -
September 1989 **CLONTECH LABORATORIES, Inc.**
Palo Alto, California
Sales Marketing Representative
Crested and managed the Technical Support Department
Account management in the Bay Area. Organized and conducted focus groups to assess emerging technologies. Established scientific collaborations to support new product development. Wrote a detailed troubleshooting guide for major products.
- 1986 - 1988 **GENOFIT, S.A.**
Geneva, Switzerland
Scientific Advisor
Created a customer service and sales support department. Wrote and produced technical marketing literature for use by clients, distributors, and sales representatives. Conducted research and development on an automated DNA sequencer. Standardized and documented quality control procedures.

1982 - 1985
Part-time

API INTERNATIONAL, S.A.
Geneva, Switzerland

Management and Sales Assistant

Organized and distributed scientific and marketing information to clients and distributors.
Represented company at trade shows. Wrote and translated technical documents.
Supervised four-person office staff.

1979 - 1985

Other work experience includes: Teaching, Translation

EDUCATION:

1965 - 1967

UNIVERSITE DE GENEVE

Geneva, Switzerland

Diplome de la Faculte des Sciences, Department de Biologie Moieculaire.

Equivalent of a Master of Science in Molecular Biology.

Thesis title: *Studies on the function of hsp27 in Drosophila melanogaster.*

1962 - 1966

UNIVERSITE DE GENEVE

Geneva, Switzerland

License de la Faculte des Sciences - Biologie

Equivalent of a Bachelor of Science: four years of intensive course work in Biology and related subjects.

PERSONAL:

Bilingual English/French, fluent in Spanish, knowledge of German

Good computer skills.

Drama, Skiing, Windsurfing

U.S. citizen

OLGA REBECA TORRES BOLAÑOS DE MATUTE

FECHA DE
NACIMIENTO: Guatemala, 21 de octubre de 1956

NACIONALIDAD: Guatemalteca

ESTADO CIVIL: Casada

DIRECCION: 2a. Calle 20-92 Zona 11, Colonia Mirador I
01011 Guatemala, Guatemala, C.A.

EDUCACION Y ENTRENAMIENTOS:

Grado	Area	Lugar	Fecha
Ninguno	Virología de polio	CDC, Atlanta	Abr 1995
Ninguno	PCR y Ribotipos	CDC, Atlanta	Ene 1993
Ninguno	Control de Calidad Curso Latinoamericano COLIBIOCLI y OPS	Antigua Guatemala	Nov 1992
Ninguno	Word Perfect 5.1	INCAP-Guatemala	Nov 1992
Ninguno	Central American Course on Cholera Diagnostic	CDC-INCAP-NCID Guatemala	Oct 1992
Ninguno	OPS-INCAP Curso Intensivo sobre Redacción de Artículos Científicos	Guatemala	Feb 1991
Ninguno	IUS-WHO-SAREC Curso de Inmunología Centro Americano	San José, Costa Rica	Nov 1990
Ninguno	Entrenamiento en Producción de Antiseros Polivalentes	CDC-INCAP	Nov 1989

Maestría en Ciencias	Microbiología/ Genética microbiana	Universidad de Cornell Ithaca, N.Y. E.U.	Ago 1985- Ene 1988
Ninguno	Bacteriología de Infecciones respi- ratorias Agudas	Universidad de Johns Hopkins, Baltimore E.U.	Jun 1985
Licenciatura	Química Biológica	Universidad de San Carlos de Guatemala	Ene 1975- Jun 1981

EXPERIENCIA DE TRABAJO:

Título	Lugar	Fecha
Microbióloga investigadora	Programa de Nutrición e Infección, INCAP, Guatemala	Ene 1988 -
Ayudante de investi- gación	Universidad de Cornell Depto. de Microbiología Veterinaria	Ago - Dic 1987
Ayudante de cátedra curso de Microbio- logía general 291	Laboratorio Microbiología General 291, U. de Cornell	Ene - Jul 1987
Microbióloga	Laboratorio de Bacteriología Division of Nutrition and Health, INCAP	Ene - Jul 1985
Profesora de Microbio- logía General (Biólogos y Químicos) y de Micro de Sistemas I y II	Depto. de Microbiología Escuela de Química Biológica Universidad de San Carlos de Guatemala	Jun 1981 - Dic 1984
Supervisora	Laboratorio Clínico Médico Edificio Médico El Obelisco	Jun 1981 - Dic 1984
Ayudante de Cátedra I	Depto. de Microbiología Escuela de Química Biológica Universidad de San Carlos de Guatemala	Jun 1980 - Jun 1981

ASOCIACIONES:

Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala	1981
Asociación Guatemalteca de Microbiología	1979
American Society for Microbiology	1988
Alliance for the Prudent Use of Antibiotics	1988
The N. Y. Academy of Sciences	1992
Asociación de Químicos Biólogos	1992

HONORES, BECAS Y CONTRATOS DE INVESTIGACION:

Grant (\$10,000.00)	INCAP, Proyecto de fortalecimiento Institucional (Fondos de AID) para la Producción de una sonda de oligonucleotidos para el dx. de <i>E. coli</i> enterotoxigénica	Jun 1992- Dic 1992
Grant de investigación (\$12,500.00)	Fundación Nestlé Análisis Inmunoquímico de antígenos de superficie de <i>C. jejuni</i> con leche humana	Oct 1990- May 1992
Tesorera	Comité Organizador del IV Congreso Nacional de Microbiología, Guatemala, Guatemala	Ene 1990 - Dic 1991
Beca	IUIS-WHO-SAREC	Nov 12-22 1990
Organizadora	Curso sobre producción de Antisueros Polivalentes	Nov 1989
Organizadora	Reuniones Científicas INCAP División de Nutrición y Salud	1991-1993
Presidente	Alianza para el Uso de antibióticos-Guatemala (APUA-Guatemala)	1988 -
Asistente de Investigación	Cornell University Ithaca, NY, U.S.A.	Sept - Dic 1987
Beca Fulbright	Cornell University Ithaca, NY, U.S.A.	Ago 1985 - Ago 1987
Secretaria	Asociación Guatemalteca de Microbiología	1983 - 1984
Tesorera	Asociación Guatemalteca de Microbiología	1982 - 1983
Secretaria	Claustro Escuela de Q.B. Universidad de San Carlos de Guatemala	1982 - 1983
Mejor Estudiante	Liceo Secretarial Bilingue	1971 - 1974

CONFERENCIAS CIENTIFICAS:

1. II Congreso Nacional de Microbiología y I Congreso Nacional de Química Clínica. "Epidemiología molecular de enfermedad diarreica". San Salvador. Octubre de 1992.
2. II Simposio Nacional sobre Biotecnología. "Antígenos de *C. jejuni* reconocidos por leche materna, potencialmente útiles como vacunas a mujeres en edad fértil". Julio de 1992.
3. I Seminario Internacional de Enfermedades Tropicales. Guatemala. Abril 7-10, 1992.
4. IV Congreso Nacional de Microbiología. Guatemala. Noviembre 25-29, 1991.
5. I Congreso CA y Nacional de Química Clínica. Guatemala. Mayo 20-24, 1991.
6. I Seminario sobre Técnicas Electroforéticas. "Sondas de ADN" Guatemala. Septiembre 13-19, 1991.
7. I Simposium "Nutrición, Embarazo y Lactancia". Guatemala. Abril 19, 1991.
8. III Conferencia Internacional de ASM sobre genética de estreptococos. Minneapolis, Minnesota. Junio 6-9, 1990.
9. III Semana Científica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 1989.
10. II Simposio Nacional de Inmunología. Guatemala. "Aplicación de las Sondas de ADN en el Diagnóstico de Infecciones". Guatemala. Julio de 1988.
11. 11th Annual MID - Atlantic Extrachromosomal Elements Meeting. "Mobilization of Chromosomal Genes by Tn925 in *Streptococcus faecalis*". Virginia Beach, VA, U.S.A. Octubre 16-19, 1987.
12. II Conferencia Internacional de ASM sobre genética de Estreptococos. Miami, Florida. Junio de 1986.
13. Congreso Internacional de Micología. Xalapa, Veracruz. 1982.

Participante en 23 Conferencias Científicas de 1981 - 1985 en Guatemala y México.

IDIOMAS:

ESPAÑOL	Nativo
INGLÉS	Excelente conversación, lectura, escritura y comprensión
FRANCES	Nociones

PUBLICACIONES:

1. Torres, O. & J. R. Cruz. Protection Against *Campylobacter* - diarrhea: Role of Milk IgA antibodies against bacterial surface antigens. Acta Paediatrica 1993; 81: In press.
2. Torres, O., J. R. Cruz, F. Cano & A. Bartlett. Trimethoprim-sulfamethoxazole Resistance in *Shigella* causing diarrhea in children in Guatemala: Transfer *in vivo* from *Escherichia coli*. APUA Newsletter (1992) 10(4): 1-6.
3. Dunny, G., J. Chung, J. Gallo, S. Kao, K. Trotter, R. Korman, B. Olmsted, R. Ruhfel, O. Torres and S. Zahler. Cell-cell interactions and conjugal transfer events mediated by the Pheromone-Inducible Plasmid transfer system and the conjugal transposon encoded by *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10. In: Genetics and Molecular biology of *Streptococci, Lactococci* and *Enterococci*. Ed. Dunny, G., P. Cleary and L. McKay. ASM, 1991.
4. Torres, G., Korman, R., S. Zahler and G. Dunny. The conjugal transposon Tn925: enhancement of conjugal transfer by tetracycline in *E. faecalis* and mobilization of chromosomal genes in *B. subtilis* and *E. faecalis*. Mol Gen Genet (1991) 225:395-400.

5. Torres, O., J. Cruz, F. Cano and A. Bartlett. Resistencia antimicrobiana transferible *in vivo* entre *E. coli* y *Shigella* sp. Memorias IV Congreso Nacional de Microbiología. Nov 1991. Guatemala, Guatemala. p 74.
6. M. de Fernández, G. Miller y O. Torres. Perfil Genético de la multi-resistencia de bacilos Gram negativo de importancia nosocomial en el Hospital Roosevelt de Guatemala. Memorias IV Congreso Nacional de Microbiología. Nov 1991. Guatemala, Guatemala. p 75.
7. O. Torres, T. Véliz, J. Cruz, F. Cano y L. Rodríguez. Perfil de plásmidos de *Shigella dysenteriae* tipo I de epidemia de Rabinal, Baja Verapaz. Memorias IV Congreso Nacional de Microbiología. Nov 1991. Guatemala, Guatemala. p 78.
8. Torres, O., J. Cruz, F. Cano and A. Bartlett. *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with ARI. A-26. Abstracts of III International ASM Conference on Streptococcal Genetics. June 6-9, 1990.
9. Dunny, G., J. Gallo, S. Kao, K. Trotter, O. Torres, S. Olmsted, S. Zahler and R. Korman. Gene regulation and cell-cell interactions in pheromone inducible conjugation. 2. Abstracts of conferences of III international ASM Conference on Streptococcal Genetics. June 6-9, 1990.
10. Torres O. and G. Dunny. 1988. Mobilization of chromosomal genes by Tn925 in *Streptococcus faecalis*. Plasmid 19: (abstracts from 11th annual mid-Atlantic Extrachromosomal Elements Meeting)
11. Torres O. Gene transfer in *Streptococcus faecalis* mediated by Tn925. M.Sc. Thesis. Cornell University. Jan 1988
12. Torres, O. 1989. Epidemiología Molecular: su aplicación en infecciones nosocomiales. Memorias III Semana Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. B-12
13. Torres de Matute, O. 1989. Biología Molecular: El por qué de su auge y su aplicación a la Microbiología. Memorias III Semana Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. A-13
14. Oliveros O. and O. Torres. 1983. Evaluación microbiológica de desinfectantes utilizados en la industria guatemalteca. Memorias del II Congreso Centroamericano de Microbiología
15. Franco L. and O. Torres, 1983. Evaluación de la efectividad de los desinfectantes hospitalarios contra cepas de importancia nosocomial. Memorias del II Congreso Centroamericano de Microbiología.

NEXT PAGE(S)
left

LISTADO DE PARTICIPANTES

**NEXT PAGE(S)
left BLANK**

Dr. Manuel María Adames Ojeda, M.D., M.Sc.
Profesor Asistente de Inmunología
Sección de Inmunología
Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Panamá
Ciudad Universitaria Octavio Méndez Pereira
Estafeta Universitaria
Panamá, REPÚBLICA DE PANAMA
Teléfono: (507) 636 133
Facsimile: (507) 238 512

Licda. Teresita de Jesús Aguilar de Miranda
Laboratorio Unificado de Control de Alimentos
y Medicamentos (LUCAM)
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
Calzada Roosevelt Zona 11
Apartado Postal 1188
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 717 336
Facsimile: (502 2) 717 336

Dr. Gilberto Ascencio Alemán, M.Sc.
Profesor Universitario I
Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de El Salvador
San Salvador, EL SALVADOR, C.A.
Teléfono: (503) 225 8017
Facsimile: (503) 225 8822

Licda. Flora Eugenia Arana Figueroa, Q.B.
Investigador Asociado
Laboratorio de Leishmaniasis
Centro de Investigaciones y Adiestramiento en Entomología Médica (MIETUC)
c/o Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 380 336 al 380 340 690 791 al 690 795
Facsimile: (502 2) 380 334 380 212

Lieda, Oriana Irma Batista Ceballos, M.Sc.
Departamento de Biología Genética
Escuela de Biología
Universidad Autónoma de Chiriquí
Estafeta Universitaria
CRUCHI, David
Chiriquí, REPUBLICA DE PANAMA, C.A.
Teléfono: (507) 744 212
Facsimile: (507) 745 329 742 679

Dr. Alejandro Antonio Belli, M.Sc., Ph.D.
Director de Parasitología
Departamento de Parasitología
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
Apartado 2900
Managua, NICARAGUA, C.A.
Teléfono: (505 2) 94 604 897 723
Facsimile: (505 2) 897 723
correo electrónico: andr@nicarao.apc.org

Lieda, Floridalma Cano Granados, Q.B.
Unidad de Alimentos
Área de Ciencia y Tecnología
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)
Calzada Roosevelt Zona 11
Apartado Postal 1188
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 723 762 al 723 763
Facsimile: (502 2) 736 529

Lieda, Ana Berta Cañas de Cea, M.Sc.
Sección de Inmunología y Serología
Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de El Salvador
San Salvador, EL SALVADOR, C.A.
Teléfono: (503) 225 7903
Facsimile: (503) 225 8822

Ing. Héctor A. Centeno Bolaños
Rector
Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 380 336 al 380 340
Facsimile: (502 2) 380 212

Dr. Hernán Delgado, M.D.
Director
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)
Calzada Roosevelt Zona 11
Apartado Postal 1188
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 723 762 al 723 763
Facsimile: (502 2) 736 529

Licda. Annabelle Ferrera Boza, M.Sc.
Departamento de Microbiología
Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)
Ciudad Universitaria
Boulevard Suyapa
Tegucigalpa, M.D.C., HONDURAS, C.A.
Teléfono: (504) 325 836 339 567
Facsimile: (504) 325 836 343 849

Dr. Manuel Egueroa, M.D.
Profesor de Virología
Departamento de Microbiología
Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)
Edificio CB, 4to. Piso
Ciudad Universitaria
Tegucigalpa, M.D.C., HONDURAS, C.A.
Teléfono: (504) 325 836
Facsimile: (504) 343 849 381 623

Dr. Jacobo Finkelman, M.D.
Representante de País
Organización Panamericana de la Salud (OPS)
Organización Mundial de la Salud (OMS)
Oficina Sanitaria Panamericana
7a. Avenida 12-33, Zona 9
Edificio Etisa, 3er. Nivel
01009 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 322 032
Facsimile: (502 2) 322 008 343 804

Lieda, Carmen María Galo Sandino de Fernández
Profesor Auxiliar III & Asistente de Investigación
Sección de Microbiología
Departamento de Microbiología
Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)
Ciudad Universitaria
Boulevard Suyapa
Tegucigalpa, M.D.C., HONDURAS, C.A.
Teléfono: (504) 325 836
Facsimile: (504) 343 849 / 381 623

Dr. Bruno Guandalini
Representante Residente
Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD)
6a. Avenida 20-25, Zona 10
Edificio Plaza Marítima, 6o. Nivel
Apartado Postal 23 "A"
01909 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 370 611 al 370 616
Facsimile: (502 2) 370 304

Dra. Eva Harris, B.A., Ph.D.
Intercampus Program in Molecular Parasitology
University of California at San Francisco
Laurel Heights, Suite 150
3333 California Street
San Francisco, CA 94118
ESTADOS UNIDOS DE NOROCC AMERICA
Teléfono (415) 476 6850
Facsimile (415) 476 0664
correo electrónico eharris@cgl.ucsf.edu

Licda. Ana Eugenia Jiménez Rocha
Profesor Instructor
Laboratorio Entomología
Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET)
Escuela de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional
"Campus Omar Dengo"
Apartado Postal 304-3000
Heredia, COSTA RICA, C.A.
Teléfono: (506) 237 3004 / 238 0761
Facsimile: (506) 238 1298

Licda. Diana Sara Leal Klevezas, M.Sc.
Investigador Asociado "A"
Centro de Investigación Biomédica del Noreste
Instituto Mexicano del Seguro Social
San Luis Potosí y Dos de Abril
Colonia Independencia, Monterrey
Nuevo León, MEXICO
Teléfono: (52 8) 344 4116
Facsimile: (52 8) 344 4116
Correo electrónico: dsleal@academ01.mty.itesm.mx

Licda. Ivette Lorenzana de Rivera, M.Sc.
Docente e Investigador
Sección de Virología
Departamento de Microbiología
Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)
Ciudad Universitaria
Boulevard Suyapa
Tegucigalpa, M.D.C., HONDURAS, C.A.
Teléfono: (504) 365 836
Facsimile: (504) 343 849 / 381 623

Licda. Celina de Lozano
Laboratorio de Dengue
Unidad de Laboratorio
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Calle Arce No. 827
San Salvador, EL SALVADOR, C.A.
Teléfono: (503) 221 5751 / 280 1154
Facsimile: (503) 273 0355

Dr. Ricardo Luján, B.A., M.Sc., Ph.D.
Profesor & Director
Centro de Estudios en Salud
Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 380 336 al 380 340
Facsimile: (502 2) 380 212
Correo electrónico: rrujan@uvg.edu.gt

Lic. José Ramón Mantilla Anaya, M.Sc.
Investigador
Laboratorio de Biología Molecular
Instituto de Biotecnología
Posgrado Interfacultades de Microbiología
Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria
Apartado Aéreo 14490
Santafé de Bogotá, D.C., COLOMBIA
Teléfono: (57 1) 222 5401 - 368 1454
Facsimile: (57 1) 222 5401 - 368 1615

Licdo. Guillermo Martínez Argueta
Laboratorio de Cólera
Unidad de Laboratorio
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Calle Arce No. 827
San Salvador, EL SALVADOR, C.A.
Teléfono: (503) 221 5751 - 280 1154
Facsimile: (503) 273 0355

Licda. Eydá Lissette Mendía Alarcón de Campollo, Q.B.
Laboratorio Central y de Referencia Nacional en Tuberculosis
Departamento de Laboratorios Centrales
Dirección General de Servicios de Salud
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
9a. Avenida 14-65 Zona 1
01001 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 518 903 - 306 286 - 909 294 - 21 801 al 21 803
Facsimile: (502 2) 518 903

Licda. Renata Mendizabal Sole de Cabrera
Investigador Asociado
Centro de Estudios en Salud
Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 380 336 al 380 340
Facsimile: (502 2) 380 212

Dra. Zaida Lucrecia Menéndez Monjes de Escalante, M.D.
Jefe de Unidad de Laboratorios
Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vectores
Dirección General de Servicios de Salud
Ministerio de Salud Pública y A.S.
5a. Avenida 11-40, Zona 11
01011 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 723 923 al 723 925 721 348
Facsimile: (502 2) 721 348

Licda. Rita Isabel Meza Martínez, M.Sc.
Jefe
Laboratorio Central de Referencia "SIDA"
Tercer Piso, Centro de Salud Alonzo Suazo
Ministerio de Salud Pública
Barrio Morazán
Tegucigalpa, M.D.C., HONDURAS, C.A.
Teléfono: (504) 314 040
Facsimile: (504) 315 877

Dr. Alvaro Molina Cruz, Ph.D.
Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias y Humanidades
Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 380 336 al 380 340
Facsimile: (502 2) 380 212
correo electrónico: amolnac@uvg.edu.gt

Licda. Sandra Rosana Mourra Saybé
MICROLAB
Laboratorio de Análisis Clínicos
Edificio Santa Bárbara, frente a las Policlínicas
Jera, Avenida Comayagua
Tegucigalpa, M.D.C., HONDURAS, C.A.
Teléfono: (504) 380 864
Facsimile: (504) 339 164 / 380 864

Dra. Leonor Isabel Murillo de Linares, M.Sc.
Jefe
Area Clínica
Sección de Análisis Clínicos
Unidad de Laboratorio
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Calle Arce No. 827
San Salvador, EL SALVADOR, C.A.
Teléfono: (503) 221 5751 / 280 1154
Facsimile: (503) 273 0355

Licda. Lucy Gerardina Ordóñez Mejía
Jefe
Laboratorio Central de Malaria
Unidad de Malaria
División de Laboratorios
Tercer Piso, Centro de Salud Alonzo Suazo
Ministerio de Salud Pública
Barrio Morazán
Tegucigalpa, M.D.C., HONDURAS, C.A.
Teléfono: (504) 314 040
Facsimile: (504) 315 877

Licda. Digna Mercedes Pérez Espino
Encargada del Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Departamento de Virología
Centro Conmemorativo Gorgas de Investigación
e Información en Salud
Ministerio de Salud
Apartado 6991
Panamá 5, REPUBLICA DE PANAMA
Teléfono: (507) 274 111 / 256 550
Facsimile: (507) 254 366

Sr. Javier Pérez
Perkin Elmer de México, S.A.
Macedonio Alcalá No. 54
Colonia Guadalupe
01020 México D.F., MEXICO
Teléfono: (52 5) 660 6218 / 664 3671
Facsimile: (52 5) 660 0323 / 660 7734

Dr. Jorge Ernesto Quezada Díaz, Ph.D.
Docente e Investigador
Escuela de Biología
Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
Universidad Nacional de El Salvador
San Salvador, EL SALVADOR, C.A.
Teléfono: (503) 226 2072
Facsimile: (503) 225 4208

Dr. Angel Rodríguez Prieto, Ph.D.
Laboratorio Clínico y Banco de Sangre
Sanatorio Nuestra Señora del Pilar
3a. Calle 10-71 Zona 15, Colonia Tecun Uman
01015 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 356 980
Facsimile: (502 2) 693 249

Lic. Norman Rojas, M.Sc.
Profesor Adjunto Bacteriología
Departamento de Microbiología e Inmunología
Facultad de Microbiología
Universidad de Costa Rica
Código Postal 2060
San José, COSTA RICA, C.A.
Teléfono: (506) 207 4275
Facsimile: (506) 225 2374
Correo electrónico: normanr@cariari.ucr.ac.cr

Licda. María del Carmen Sánchez Guillén, M.Sc.
Departamento de Patología Experimental
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional
Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508
Colonia San Pedro Zacatenco
Código Postal 07300
México, D.F. MEXICO
Teléfono: (52 5) 754 0200 / 752 0677
Facsimile: (52 5) 754 5116 / 747 7107

Lic. Marco Vinicio Sánchez Vega
Asistente de Laboratorio
Departamento de Virología Animal
Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET)
Escuela de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional
"Campus Omar Dengo"
Apartado 304-3000
Heredia, COSTA RICA, C.A.
Teléfono: (506) 237 3004 / 238 0761
Facsimile: (506) 238 1298

Licda. Aleyda Téllez Sierra, M.Sc.
Profesor Asistente
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua - León
León, NICARAGUA, C.A.
Teléfono: (505) 311 2831
Facsimile: (505) 311 4970

Dra. Leila Smith, B.Sc., M.Sc.
Field Applications Specialist
PRGMEGA CORPORATION
1379 Church Street
San Francisco, California 94114-3294
ESTADOS UNIDOS DE NORTE AMERICA
Teléfono: (415) 550 1588
Facsimile: (415)

Licda. Sandra Ninet Terraza Padas, Q.B.
Química Bióloga del Laboratorio
Clínica de Hepatitis y SIDA
Hospital Roosevelt
Calzada Roosevelt Zona 11
01011 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 721 386 / 711 441
Facsimile: (502 2)

Licda. Olga Rebeca Torres Bolaños de Matute, Q.B., M.Sc.
Área de Ciencia y Tecnología
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)
Calzada Roosevelt Zona 11
Apartado Postal 1188
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 723 762 a: 723 767
Facsimile: (502 2) 736 529
correo electrónico: otorres@incap2.org.gt

Licda. Alba Marina Valdés de García, Q.B.
Escuela de Química Biológica
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Universidad de San Carlos de Guatemala
Ciudad Universitaria Zona 12
01012 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 769 868 : 760 790 al 760 794
Facsimile: (502 2) 769 844

Licda. Sonia Isabel Valle Moreno
Responsable del Departamento de Técnicas Especiales
Dirección de Entomología
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
Ministerio de Salud
Complejo Nacional de Salud
Apartado 2900
Managua, NICARAGUA, C.A.
Teléfono: (505) 2 897 723
facsimile: (505) 2 897 723

Dra. Judith Van Andel, D.V.M.
Coordinadora Proyecto Holandés
Proyecto Salud y Producción del Hato
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad de San Carlos de Guatemala
Ciudad Universitaria Zona 12
01012 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 762 687 760 813
Facsimile: (502 2) 769 712 769 781

NEXT PAGE(S)
123 456

LISTADO DE ORGANIZACIONES

NEXT PAGE(S)
loft 2000

Análítica Química - ANAQUI
Muñoz-Avila y Co. Ltda.
Centro Comercial Molino
Kilómetro 15 Carretera Roosevelt
Zona 2 Mixco, Local 22
Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 955 360
Facsimile: (502 2) 954 464

BIO-RAD Laboratories, Inc.
Eastern Regional Office
Life Sciences Group
P.O. Box 1229
85 A Marcus Drive
Melville, New York 11747
ESTADOS UNIDOS DE NORTE AMERICA
Teléfono: (516) 756 2575
Facsimile: (516) 756 2594

Comité Nacional de Biotecnología (CONBIOTEC)
c/o. Dr. Ricardo Luján, Ph.D.
Centro de Estudios en Salud
Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala
18 Avenida 11-95 Zona 15, Vista Hermosa III
Apartado Postal 82
01901 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 380 336 al 380 340
Facsimile: (502 2) 380 212
Correo electrónico: rlujan@uvg.e-lu.gt

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) de Guatemala
Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología
8a. Avenida 10-43, Zona 1, 4to. Nivel
01001 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 241 25
Facsimile: (502 2) 241 25

Dirección General para la Ciencia, la Investigación y el Desarrollo
Comisión de las Comunidades Europeas (CEE)
Cooperación Científica Internacional
DG XII-B.4
Rue de la Loi 200
B-1049, Bruselas, BELGICA
Teléfono: (32 2) 296 6077
Facsimile: (32 2) 296 3268

Hoefer Pharmacia Biotech, Inc.
International Customer Service
654 Minnesota Street
P.O. Box 77387
San Francisco, California 94107-9985
ESTADOS UNIDOS DE NORTE AMERICA
Teléfono: (415) 282 2307
Facsimile: (415) 821 1081

Merck Centroamericana, S.A.
División Químicos
Kilómetro 13.5 Carretera Roosevelt, Zona 11
Apartado 1651
01011 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 922 111
Facsimile: (502 2) 941 543

Organización Panamericana de la Salud (OPS)
Oficina Sanitaria Panamericana/Oficina Regional de
la Organización Mundial de la Salud (OMS)
525 Twenty third Street, N.W.
Washington, D.C. 20037-2897
ESTADOS UNIDOS DE NORTE AMERICA
Teléfono: (202) 861 3200
Facsimile: (202) 223 5971

PRECISION, S.A.
Oficina Técnica y Representaciones
5a. Avenida 29 03, Zona 11
Centro Comercial Granat & Townson
01011 Guatemala, GUATEMALA, C.A.
Teléfono: (502 2) 760 719
Facsimile: (502 2) 760 649

Programa Regional de Biotecnología para América Latina y El Caribe
United Nations Industrial Development Organization (UNIDO)
c/o. Dr. Rodolfo Quintero Ramírez, Ph.D.
Coordinador Técnico ONUDI
Presidente Masaryck 29, 7o. Piso
Colonia Polanco
México 11570, D.F. MEXICO
Teléfono: (52 5) 250 1555
Facsimile: (52 5) 254 7235
correo electrónico: quintero@pbr322.ceingeb.unam.mx

Red Centroamericana de Cooperación Sobre Enfermedades Tropicales (REDCEN)
Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)
c/o. Dr. Octavio E. Sousa P.
Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP)
Facultad de Medicina
Universidad de Panamá
Ciudad Universitaria Octavio Méndez Pereira
Estafeta Universitaria
Panamá, REPUBLICA DE PANAMA
Teléfono: (507) 636 133
Facsimile: (507) 645 845
correo electrónico: osousa@ns.unpma.pa

United Nations Industrial Development Organization (UNIDO)
Vienna International Centre
P.O. Box 300
A-1400 Vienna, AUSTRIA
Teléfono: (43 222) 211 131
Facsimile: (43 222) 230 8272

Impresión:

Educaciones Superiores
Litografía e Imprenta
Centro Comercial Girard & Townson
601 Avenida 28-71, Zona 11
01011 Guatemala - Guatemala, C.A.
Teléfono: (502) 23763544
Facsimile: (502) 23760837

