

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>



Vol. 26 No. 3, 1997 [ver índice]

DIAGNOSTICO DE INFECCIONES CON TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Dra. Marisa Torres H.
Profesor Auxiliar (Asociado)
UDA Laboratorios Clínicos
Pontificia Universidad Católica de Chile

Las ventajas de las técnicas moleculares ha sido ampliamente publicitadas en los últimos 7 años, lo que sin duda ha aumentado la presión en los laboratorios clínicos para comenzar a usarlas en una amplia variedad de enfermedades infecciosas, genéticas, oncológicas y neurológicas.

Actualmente existe una variedad de paquetes comerciales, especialmente en el área de las enfermedades infecciosas, que contienen todo lo necesario para realizar un examen, lo que obviamente ha estimulado a los laboratorios a incluir técnicas de biología molecular en el diagnóstico clínico. Sin embargo, y como veremos más adelante, estos métodos moleculares no están exentos de problemas tanto en su ejecución como en su interpretación, por lo que debieran estar reservados para aquellos laboratorios con personal familiarizado con estas técnicas y que tengan la infraestructura necesaria para su realización.

Técnicas o métodos usados en biología molecular

En general, las técnicas más usadas son las de detección directa por hibridación, usando un segmento de ADN marcado, y las técnicas de amplificación. Estas últimas han tenido una verdadera explosión en su metodología, como lo demuestra el que en la actualidad existan por lo menos seis técnicas diferentes, aunque todas tienen como finalidad la amplificación de un segmento de ADN o ARN que ha sido seleccionado como un marcador para una determinada patología.

En este artículo me referiré al uso de estas técnicas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas basada en la experiencia personal. Sin embargo, es importante notar que los fundamentos de las técnicas descritas a continuación son similares en la mayoría de los exámenes usados para diagnóstico clínico.

Hibridación por sondas

Las sondas (probes) son segmentos de ADN o ARN que han sido marcados con enzimas, sustratos antigénicos, quimioluminiscencia o radioisótopos, los que se pueden unir con una alta especificidad a una secuencia complementaria de ácido nucleico. Estas sondas pueden ser dirigidas a un segmento de ADN o ARN seleccionado, que puede tener de veinte a miles de bases de largo. Las sondas de menos de 50 pares de bases son denominadas oligonucleótidos y pueden ser sintetizadas y purificadas con relativa facilidad por instrumentos comerciales actualmente disponibles. Las sondas de oligonucleótidos tienen la

ventaja de hibridar más rápidamente a las moléculas blanco (target) y pueden, bajo ciertas condiciones, detectar el cambio de un nucleótido dentro de una secuencia de ácido nucleico.

Existen varias condiciones que afectan el proceso de unión o hibridación entre la sonda y el segmento blanco, como temperatura, concentración de sal y pH de la reacción. Por ejemplo bajas concentraciones de sal y altas temperaturas permiten que sólo el segmento blanco se una a la sonda, mientras que, por el contrario, si la temperatura de la reacción es baja, segmentos no complementarios pueden unirse a la sonda. Por lo tanto, las condiciones deben ser cuidadosamente controladas para evitar falsos positivos.

La detección de la hibridación puede hacerse de varias maneras, dependiendo del método usado para marcar la sonda. Por ejemplo, si se usa una enzima, la hibridación se puede visualizar por un cambio de color y si se usa quimioluminiscencia, por emisión de luz un luminómetro.

Indicaciones para el uso de sondas o probes en el laboratorio. Las pruebas de hibridación a menudo disminuyen el tiempo necesario para identificar organismos fastidiosos. Además, permiten que los laboratorios puedan aumentar el número de patógenos que pueden ser identificados. En el estudio de costos, debe considerarse que aunque los exámenes que usan sondas son más caros que los métodos tradicionales, el hecho de tener un resultado en un mínimo de tiempo puede significar un ahorro para el paciente y el hospital.

Las sondas pueden ser usadas para detectar microorganismo directamente de una muestra clínica (expectoración, orina, etcétera) o para confirmar la identificación de un cultivo que por otros métodos tarda varios días (*Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*, etcétera). Además, las sondas pueden ser usadas para hibridación in situ para evaluar la respuesta del huésped a un agente infecciosos en particular y también para determinar la extensión de la infección mediante el estudio de muestras de tejidos de varios órganos. La Tabla 1 enumera algunos de los exámenes con sondas disponibles comercialmente. Muchos de ellos han sido desarrollados por varios fabricantes y sólo se diferencian en la secuencia a la cual está dirigida la sonda.

TABLA 1	
EJEMPLOS DE ORGANISMOS QUE PUEDEN SER DETECTADOS POR MEDIO DE SONDAS DE ACIDOS NUCLEICOS DISPONIBLES COMERCIALMENTE.	
Tipo de prueba	Organismo
Detección directa de la muestra	Bacterias <ul style="list-style-type: none">• Streptococci grupo A• Legionella pneumophila• Chlamydia trachomatis• Neisseria gonorrhoeae• Tricomonas vaginalis

	Virus <ul style="list-style-type: none"> • Papiloma humano
Confirmación de cultivo	Bacteria <ul style="list-style-type: none"> • Enterococci • Streptococci grupo B • Haemophilus influenzae • Listeria monocytogenes • Neisseria gonorrhoeae • Mycobacterium tuberculosis • Mycobacterium avium • Otras especies de mycobacteria
	Hongos <ul style="list-style-type: none"> • Cryptococcus neoformans • Histoplasma capsulatum • Blastomyces dermatidis • Coccidioides immitis
	Virus <ul style="list-style-type: none"> • Papiloma humano

Técnicas de amplificación

Las técnicas de hibridación pueden tener una baja sensibilidad debido a que en algunos casos existe una sola copia de la secuencia en blanco. Por esta razón las técnicas de amplificación, que pueden producir millones de copias de un determinado segmento de ADN o ARN, han tenido un impacto extraordinario en muchas áreas del diagnóstico clínico.

Como fué mencionado anteriormente, existen varias técnicas de amplificación las cuales varían ligeramente en su método de amplificación. Unas de las técnicas de amplificación más usadas en la actualidad, tanto elaboradas en el propio laboratorio como comercialmente, es la reacción de la polimerasa en cadena o PCR. Otra técnica que ha sido evaluada para el diagnóstico es la reacción de la ligasa en cadena o LCR, en la cual pequeños segmentos amplificados son posteriormente ligados. Ambas técnicas se encuentran disponibles comercialmente y pueden ser adquiridas en varios formatos de automatización. Otras técnicas de amplificación, la mayoría sin nombre traducido al español, son strand displacement amplification (SDA), isothermal RNA self sustaining sequence replication. reaction, nucleic acid sequence-based amplification (TMA) y la amplificación por QB replicasa. A

continuación sólo se analizarán los fundamentos de las técnicas de PCR en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, que el análisis de las otras escapa al objetivo de esta revisión.

Definición y componentes de la PCR

Esta técnica es una amplificación enzimática *in vitro* que resulta en una acumulación de la secuencia blanco (target). La PCR consiste de un número de ciclos cambios de temperatura que producen:

- separación de las hebras de ADN;
- unión del oligonucleótido (partidor o primer) al segmento ADN;
- extensión que permite a la ADN polimerasa sintetizar el resto de la hebra complementaria.

Estos ciclos se repiten habitualmente 30 ó 40 veces para obtener un producto que puede ser fácilmente detectado por medio de un gel de agarosa o por hibridación en microplacas.

Con esta técnica, prácticamente cualquier segmento de ADN de una determinada bacteria, hongo o virus puede ser amplificado y detectado. Sin embargo, los laboratorios deben analizar varios factores, entre los cuales destaca la aplicación clínica que podría tener la detección de un determinado organismo, así como los costos, sensibilidad y especificidad del examen en comparación con las técnicas tradicionales. En general, las técnicas de diagnóstico molecular están indicadas cuando un organismo no puede ser cultivado *in vitro*, o cuando requiere de un medio complejo y largos períodos de incubación.

Un organismo que cumple los requisitos descritos es el *Mycobacterium tuberculosis* y es por ello que existen numerosas técnicas de amplificación disponibles comercialmente, algunas de ellas aprobadas por la oficina de Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en EE.UU. La sensibilidad de estos exámenes en expectoración varía de 85 a 95% y la especificidad entre 95 y 97%.

Otros organismos que pueden ser detectados directamente de una muestra clínica mediante técnicas de amplificación comerciales son *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida*, *Tricomonas*, virus VIH, virus herpes, virus hepatitis C, enterovirus y virus papiloma. Actualmente se encuentran en evaluación exámenes de amplificación para una variedad de otros organismos. La Tabla 2, enumera los exámenes de PCR que actualmente se ofrecen para diagnóstico de enfermedades infecciosas en el laboratorio clínico de la Universidad Católica.

TABLA 2	
ORGANISMOS QUE PUEDEN SER DETECTADOS POR AMPLIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS EN EL LABORATORIO DEL HOSPITAL DE LA UNIVERSIDAD CATOLICA	
Organismos	Tipos de muestras

Mycobacterium tuberculosis	Expectoración, lavado broncoalveolar, LCR, tejido, orina, líquido articular y peritoneal
Bordetella pertussis	Aspirado nasofaríngeo
Chlamydia trachomatis	Orina, secreción uretral, secreción y vaginal
Virus herpes simplex 1 y 2	LCR, sangre, lesión cutánea
Virus hepatitis C	Sangre
Virus HTLV 1	Sangre
Pneumocystis carinii	Lavado broncoalveolar, aspirado nasofaríngeo

Interpretación

Debido a la alta sensibilidad de estos exámenes, la interpretación es en algunos casos difícil, ya que el organismo puede no estar viable pero su ADN puede todavía ser amplificado. Además, la presencia de un organismo en una determinada muestra no siempre significa infección. Es por ello que para el caso de infecciones virales (VIH y CMV) se recomienda realizar la determinación de la carga viral, la cual determina la cantidad de secuencias blanco presentes en el plasma de un individuo.

Falsos positivos debido a contaminación. Uno de los problemas más graves que enfrenta las técnicas de amplificación para su aplicación en diagnóstico, es la falsa positividad debido a la contaminación con ácidos nucleicos, la que puede provenir de tres fuentes: de otras muestras clínicas que contienen un número elevado de secuencias blanco (contaminación entre muestras), de la contaminación de reactivos, por amplificaciones anteriores y la más grave de todas, de la acumulación de productos de PCR (amplicones) en el laboratorio por amplificaciones sucesivas de la misma frecuencia.

Por estas razones, los laboratorios que usan técnicas de amplificación deben tener normas estrictas de control de calidad. El Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico de USA tiene un documento de regulación provisorio que es bastante específico. En nuestro país no existen regulaciones formales, pero los laboratorios debieran tratar de cumplir el mínimo de requerimientos, como es tener un espacio separado para el procesamiento de la muestra y otro para la amplificación y tener además el personal adecuado para realizar estas técnicas.

Conclusiones

A pesar del innegable poder de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico clínico, es erróneo pensar que van a reemplazar a los exámenes convencionales para detección de agentes patógenos. Sin embargo, la capacidad de estas técnicas para proporcionar un diagnóstico definitivo en corto tiempo tendrá sin duda, un efecto en el manejo del paciente y nos ayudarán a entender mejor la patogénesis de la infección.

Aunque existe la posibilidad de usarlas en todos los microorganismos, las técnicas de diagnóstico molecular tendrán un mayor impacto en algunos patógenos. Es así que exámenes rápidos para la identificación de Micobacterias y la detección de resistencia a las drogas de primera línea, dará la base para que se tomen más oportunamente las decisiones clínicas adecuadas. También, la identificación rápida de virus Herpes simplex en el LCR de un paciente con encefalitis dará la oportunidad de comenzar oportunamente la terapia adecuada, eliminando otros procedimientos más invasivos.

A medida que se automaticen, con un costo menor y con regulaciones más precisas, los laboratorios clínicos podrán incorporar estos exámenes en el funcionamiento de rutina y los clínicos podrán familiarizarse aún más con la interpretación y con las ventajas que proporcionan las técnicas de biología molecular en el diagnóstico clínico.

Referencias escogidas

1. Cartwright C.P. Techniques and diagnostic applications of in vivo nucleic acid amplification. Clin Microbiol News 1994;16:33-40
2. Eisenstein B I. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. New Engl J Med 1990;322:178-183.
3. Leven M. and H. Goosens. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory track infections in the clinical laboratory. Clin Microbiol Rev 1997; 10:242-256.
4. Sandhu G.S, B.C. Kline, L. Stockman, and G.D.Roberts. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. J.Clin Microbiol 1995; 33:2913-2918/
5. Landegren U.,R. Kaiser, C.T.Caskey, L. Hood DNA diagnostic-molecular techniques and automatization. Science 1998;242:229-237.
6. Persing D.H. Polymerase chain reaction:Trenches to benches. J. Clin Microbiol 1991; 29:1281-1285.