

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>

Biología molecular en el diagnóstico de las neumonías

DR. GUSTAVO KALTWASSER GONZALEZ
Laboratorio de Microbiología Clínica, Centro de Diagnóstico

Segmentos definidos de ácidos nucleicos (sondas o *probes*) han sido utilizados satisfactoriamente por biólogos moleculares, taxonomistas y epidemiólogos para detectar secuencias complementarias de ADN o ARN en diferentes tipos de especímenes. Este desarrollo técnico proviene del conocimiento alcanzado en aspectos básicos de la bioquímica y estructura de los ácidos nucleicos. Los trozos de ADN, o sondas génicas, se obtienen mediante la tecnología de ADN recombinante o manipulación del ADN, cuyos recientes avances en el desarrollo de sondas específicas para agentes bacterianos particulares han permitido su utilización en la clínica como procedimientos diagnósticos de alternativa.

El microbiólogo clínico tiene la tarea de detectar e identificar microorganismos responsables de un proceso patológico infeccioso. El método que emplea ácidos nucleicos le ofrece una interesante alternativa para acelerar el diagnóstico o para identificar de un modo preciso un determinado microorganismo. Debe tenerse presente, eso sí, que cada avance técnico debe compararse con el método previamente existente, para evaluar la relación costo-beneficio que la nueva técnica aporta. De este análisis resulta claro que no todos los métodos que se desarrollan resultan en aplicaciones que significan un reemplazo de las corrientemente en uso. Hoy en día se trata de focalizar el empleo de técnicas de ADN recombinante en el diagnóstico de enfermedades infecciosas para aquellas situaciones en que los procedimientos actuales son muy lentos, de difícil aplicación, bajo rendimiento o inexistentes.

Para el caso de las neumonías, el enfoque de utilización de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos se ha orientado a apoyar el diagnóstico de infecciones causadas por virus, de algunas bacterias y micobacterias.

INFECCIONES BACTERIANAS

En este tipo de infecciones, las únicas que hasta el momento han recibido atención con un objetivo diagnóstico, han sido las causadas por las especies *Legionella*, *Mycoplasma* y *Mycobacterium*.

Legionella. Esta especie ha sido reconocida últimamente como causa de infección nosocomial y extrahospitalaria. El diagnóstico de laboratorio se basa en el cultivo, demostración del agente por inmunofluorescencia directa (IFD) o, retrospectivamente, mediante variaciones del título de anticuerpos séricos anti-*Legionella*. Aunque la IFD es rápida y específica (99,9%), su sensibilidad en relación al cultivo es baja, variando entre un 25% y un 80%. Las pruebas serológicas están estandarizadas para *L. pneumophila* serogrupo 1 y tiene una sensibili-

dad de 60% a 80% y una especificidad de 95%-99%. Debido a que la *Legionella* causa aproximadamente un 3% de las neumonías, el valor predictivo de una prueba serológica es bajo. El método más definitivo y sensible es el aislamiento bacteriano, el que requiere de varios días, seguido de pruebas de aglutinación o IFD.

Con estos antecedentes, el uso de sondas de ácidos nucleicos resulta apropiado para la simplificación y rapidez diagnóstica. Grimont *et al.* desarrollaron en 1985 una sonda para identificar específicamente *L. pneumophila*. Sin embargo, requiere de la etapa previa de desarrollo de colonias de cultivo. Otra sonda basada en ADN complementario (cDNA) reconoce ARN ribosomal del género *Legionella*. La hibridación es rápida y los resultados están disponibles en 3 horas. Wilkenson *et al.* comunicaron en 1986 una sensibilidad de 98% y una especificidad cercana a 100%. Hogan *et al.* analizaron 343 muestras clínicas de origen respiratorio que habían sido almacenadas a -70 °C entre 1 y 8 años; en comparación a los datos de cultivos, se encontró una especificidad de 100% y una sensibilidad del 74%.

Mycoplasma. La infección por *Mycoplasma pneumoniae* es una causa importante de "neumonía atípica" que afecta primariamente a adultos jóvenes. El diagnóstico se realiza clínica o serológicamente debido a que los cultivos pueden tomar hasta 21 días para dar un resultado positivo. Shaw *et al.* desarrollaron en 1986 una sonda cADN homóloga a ARN ribosomal de *M. pneumoniae*. El examen de hibridación toma 3 horas. Hogan *et al.*, analizando 388 especímenes, encontraron una sensibilidad de un 100% comparado con el cultivo.

Mycobacterium. En Chile, la tuberculosis es una de las principales causas de muerte por enfermedades infecciosas, manteniendo al *M. tuberculosis* como un patógeno de importancia. La infección por *M. tuberculosis* y otras micobacterias resulta también importante en pacientes inmunocomprometidos. La identificación por cultivo de esta especie es larga y tediosa, demorando en la gran mayoría de los casos 60 días.

Dean *et al.* desarrollaron en 1986 una sonda cDNA homóloga a ARN ribosomal del género *Mycobacterium*, capaz de detectar 28 especies clínicamente relevantes de micobacterias, pero que no hibridizan con otras bacterias o ARN ribosomal de células eucariotes. Shoemaker *et al.* han desarrollado una sonda de ADN a partir de ADN cromosomal para detectar *M. tuberculosis*. Es capaz de detectar 20.000 micobacterias y presenta algún grado de hibridación cruzada con otros miembros del género *Mycobacterium*. El grado de especificidad alcanza al 100% en relación a otros agentes bacterianos.

En nuestro laboratorio hemos utilizado un fragmento de 1,1 Kb (miles de bases), correspondiente a un fragmento del gen que codifica un determinante antigénico de 65 KD (Kilo Dalton) de *M. tuberculosis* para pruebas de hibridación. La capacidad diagnóstica permite identificar alrededor de 1.000 a 5.000 micobacterias presentes en una muestra clínica. Este examen presenta hibridación cruzada con *M. avium*, aunque de baja magnitud; no presenta hibridación con otras especies bacterianas ni ADN de células humanas.

INFECCIONES VIRALES

Adenovirus. Los adenovirus son una causa significativa de infecciones febriles del tracto respiratorio en niños menores de 6 años. Los serotipos 1, 2 y 5 (Grupo C) y 3 y 7 (Grupo B) son los agentes más frecuentes. El diagnóstico basado en el aislamiento viral puede tomar varias semanas. Estos se identifican, además, mediante inmunofluorescencia o pruebas tipo ELISA. Métodos que utilizan los fragmentos Ad2 y Ad3 de ADN de adenovirus pueden completarse en 24 horas y permiten detectar 5×10^6 moléculas de ADN de adenovirus.

Citomegalovirus. La infección por citomegalovirus (CMV) es común en la población general, la que suele cursar de modo asintomático o con un síndrome mononucleósico. Cuadros graves se ven en recién nacidos congénitamente infectados y en pacientes inmunocomprometidos. Hasta un 20% de los trasplantados de médula ósea pueden padecer de una neumonitis a CMV. Esta infección es también causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con trasplante renal y portadores del virus de inmunodeficiencia humana. El cultivo de tejido pulmonar obtenido por biopsia quirúrgica es el método más sensible para el diagnóstico de infección por CMV; sin embargo, puede tomar hasta 6 semanas. La identificación histológica de inclusiones intranucleares o intracitoplasmáticas permite un diagnóstico rápido, pero su sensibilidad es muy baja.

Spector *et al.* desarrollaron en 1984 una prueba de hibridación que toma 48 horas, utilizando fragmentos de ADN de CMV cepa AD 169. Con este procedimiento han obtenido una sensibilidad de 92% y una especificidad de un 88%. Buffone *et al.* han desarrollado una prueba de hibridación que no usa material radiactivo; cuando se comparan sus resultados con los obtenidos con cultivo viral, la sensibilidad alcanza el 92% y tiene un valor predictivo positivo de un 98%.

NUEVAS APROXIMACIONES DIAGNOSTICAS

El conocimiento derivado del funcionamiento de enzimas involucradas en la síntesis del ADN, nos permite en la actualidad contar con una aproximación diferente para identificar secuencias de ADN de agentes infecciosos. Este nuevo procedimiento se llama amplificación génica o reacción de polimerasa en cadena (PCR). La base de este procedimiento es la capacidad que actualmente disponemos de amplificar *in vitro*— un segmento predeterminado de ADN, un número tal de veces (10^5 a 10^6) que es posible identificarlo mediante procedimientos muy sencillos.

Este método permite la amplificación de ADN de cualquier origen, teniendo como requisito para su máxima eficiencia y especificidad el conocer previamente la secuencia de bases nitrogenadas que forman parte total o parcialmente de un gen específico del agente que se desea estudiar. El método es tan sensible que se pueden identificar genes específicos de células individuales.

El procedimiento de amplificación génica o PCR ha sido satisfactoriamente utilizado para dar respuesta a la identificación de un importante número de agentes infecciosos de diferente naturaleza. Para el diagnóstico de infecciones pulmonares, hemos publicado protocolos para cada uno de los agentes descritos más arriba.

Los agentes infecciosos que resultan particularmente atractivos para ser analizados con este método son las infecciones virales y las infecciones por *M. tuberculosis*. Usando esta técnica, nosotros hemos podido amplificar un segmento de 294 pares de bases de ADN de *M. tuberculosis*, partiendo de una cantidad inicial de ADN de 10^{-12} g, lo que equivale a entre 10 y 100 micobacterias.

El uso de la amplificación génica se está difundiendo rápidamente y su potencialidad en diagnóstico puede ser incluso mayor que la hibridación de ácidos nucleicos por su sencillez metodológica. A modo de ejemplo, hoy en día es uno de los procedimientos de elección para establecer si los hijos de madres infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana son portadores del virus en sus linfocitos. *

REFERENCIAS ESCOGIDAS

Kaltwasser, G., Montiel, F., Salinas, A.M. *et al.* Enzymatic amplification of a 294 base pair gene segment of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol 1990: U-3.

Kaltwasser, G., Salinas, A.M., Velasco, M. *et al.* Un nuevo procedimiento para el aislamiento de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Chil Infectol 1990; 7:111-115.

Kaltwasser, G. Biología molecular en el diagnóstico etiológico de las neumonías y otras enfermedades pulmonares. Rev Chil Enf Cir Torac, 1991 (en prensa).

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F. *et al.* Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-1354.

Shoemaker, S.A., Fisher, J.H., Scoggin, C.H. Techniques of DNA hybridization detect small numbers of mycobacteria with no-cross hybridization with nonmycobacterial respiratory organisms. Am Rev Respir Dis 1985; 131:760-763.

Virtanen, M., Palva, A., Laaksonen, M. *et al.* Novel test for rapid viral diagnosis: detection of adenovirus in nasopharyngeal mucus aspirates by means of nucleic acid sandwich hybridization. Lancet 1983; 1:381-383.