

Escenario de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa como prueba diagnóstica en tuberculosis

Dra. Karen Y. Sánchez L.

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
Posgrado de biología de la reproducción humana

La tuberculosis es posiblemente la enfermedad infecciosa de mayor prevalencia en el mundo. Cuando Roberto Koch aisló y cultivó por primera vez el *Mycobacterium tuberculosis*, se pudo identificar a la bacteria como el agente etiológico de la enfermedad. En 1890 anunció el descubrimiento de la “tuberculina” que preconizó podría utilizarse para el diagnóstico, pero al mismo tiempo desarrolló varios métodos de tinción para la identificación del bacilo. Estas técnicas fueron mejoradas posteriormente por Paul Ehrlich, lo cual proporcionó las bases para el desarrollo de la tinción de Ziehl-Nielsen, la cual todavía se emplea como un importante método de diagnóstico de la tuberculosis (TBC).

Dada la naturaleza de la infección, particularmente la forma pulmonar, un diagnóstico rápido y certero es un elemento importante para curar y controlar la enfermedad. Los principales métodos tradicionales de diagnóstico de la enfermedad son la sintomatología clínica, acompañada de una variedad de pruebas diagnósticas, incluyendo radiografía de tórax y el diagnóstico bacteriológico, donde la recolección de la muestra representa un paso clave fundamental en el resultado de las pruebas bacteriológicas (1). Como el diagnóstico bacteriológico se considera el más confiable procederemos a describirlo con más detalle en que consiste y a evaluar cuál es la situación de algunas técnicas de biología molecular, específicamente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que recientemente se está tratando de implementar en el diagnóstico de la TBC.

Técnicas convencionales para el diagnóstico de la TBC

Baciloscopia. Es un método de detección rápida.

En el laboratorio se realiza un extendido del material y mediante diversas técnicas de tinción, se puede evidenciar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente, en las muestras de cualquier tejido o líquido. Varios métodos de tinción están disponibles actualmente, pero los tres más utilizados son Ziehl-Nielsen, fluorocromo de auramina-rodamina y Kinyoun, los cuales requieren 15 minutos para su lectura. Además de su valor diagnóstico, este procedimiento tiene importancia epidemiológica, ya que detecta a los pacientes bacilíferos, fuente de transmisión de la enfermedad. Este método tiene menor sensibilidad que el cultivo, pues para obtener un resultado positivo requiere que la muestra presente, como mínimo cinco a diez mil bacilos/mL y su especificidad es baja, porque no permite diferenciar otras micobacterias (2).

Técnicas basadas en cultivos convencionales. Tradicionalmente las micobacterias se hacen crecer en medios sólidos, que contienen un cóctel de antibióticos que permiten sólo la replicación de *M. tuberculosis*. Los cultivos siguen siendo el método más sensible del que se dispone, pues requiere la presencia de sólo 10 bacilos/mL para obtener un resultado positivo. En las formas de TBC extrapulmonar es quizás la única forma de diagnóstico bacteriológico disponible (2). El cultivo tradicional emplea medios comerciales ya conocidos como los de Löwestein-Jensen y Middlebrook que son los más utilizados y seguros, aunque se requieren entre 4 y 8 semanas para aislar el germen y otras 3 a 4 semanas para realizar las pruebas de sensibilidad, pero es el método de elección, por lo dicho anteriormente. Esta técnica es más cara que la primera descrita.

Sistemas rápidos de cultivos líquidos. En estos sistemas, el tiempo de crecimiento del *Mycobacterium*, se puede acortar con el uso de sistemas de cultivos líquidos automatizados o semi-automatizados, dentro de los cuales el cultivo radiométrico BACTEC 460TB disminuye el tiempo de los cultivos tradicionales de 4 a 8 semanas a tan solo 14-17 días. Este sistema es ampliamente aceptado como referencia estándar. Pero para países en desarrollo, estos métodos de cultivo son sumamente costosos y requieren de laboratorios equipados con alta tecnología (1).

Pruebas serológicas

Numerosas técnicas serológicas se han desarrollado en los últimos años, usando una variedad de antígenos para detectar anticuerpos en sangre, realizando pruebas de fijación de complemento, pruebas de hemaglutinación, radioinmunoensayos, entre otros. Estas técnicas han sido extensamente evaluadas en países desarrollados, debido a que prometen ser menos costosas, sencillas y más rápidas. Sin embargo, ninguna de estas pruebas se aplica de manera única y su utilidad es muy relativa en pacientes con esputo negativo. La sensibilidad promedio reportada para estas pruebas es de un 16 % a un 57 % y su especificidad de 62 % a 100 %. Es de notar que el 30 % de los pacientes con esputo positivo no poseen anticuerpos detectables en sangre. Por tanto, no han sido implementadas como herramientas de diagnóstico de la TBC (1).

Nuevas pruebas de diagnóstico para TBC activa

La prueba *gold estándar* para el diagnóstico de la TBC es la combinación de la identificación del bacilo por microscopía con la identificación del subtipo y su resistencia a antibióticos mediante cultivo. Pero el lento crecimiento del *Mycobacterium tuberculosis* ha llevado a la búsqueda de pruebas rápidas de diagnóstico y de nuevos métodos que lo detectan directamente en nuestras clínicas, sin la necesidad de hacer cultivos. Las más conocidas son las pruebas de amplificación para ácidos nucleicos.

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son sistemas moleculares capaces de detectar pequeñas cantidades de material genético del microorganismo, tales como secuencias blanco de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Si el organismo blanco no está presente en la muestra no hay amplificación.

Existe toda una variedad de métodos de

amplificación que pueden ser utilizados, incluyendo la amplificación del ácido nucleico blanco, tal como la PCR, la amplificación de una sonda de ácido nucleico, la reacción en cadena de la ligasa, entre otras. La técnica de la PCR es la más común de estos métodos, por lo cual la describiremos más adelante (1).

ADN proveniente de cultivos

Existen reportados en la bibliografía numerosos métodos de la PCR para la detección y la consiguiente amplificación de ácidos nucleicos provenientes del *M. tuberculosis*, pero que tienen poca aplicación en la clínica, debido a que en todos estos casos se requiere el cultivo de las micobacterias con el objetivo de aumentar su número y facilitar el procedimiento de extracción de material genético purificado. Por tanto, en países en vías de desarrollo incorporar estas técnicas de la PCR en sus laboratorios no excluiría el uso de cultivos, incrementando la necesidad de tener personal altamente capacitado, poseer toda la infraestructura de bioseguridad que es requerida para aislar el ADN del *M. tuberculosis*, con todo el costo económico que ello genera.

Sin embargo, la importancia de estos protocolos se evidencia a nivel de laboratorios de investigación, en los cuales se intenta buscar secuencias de amplificación más idóneas (secuencias que originen productos de alta sensibilidad y especificidad), para aplicar en protocolos estándar en el diagnóstico rutinario de la TBC. La rigurosidad de estas investigaciones amerita que las muestras de donde proviene el material genético a amplificar, sea con seguridad de la especie deseada, en este caso de *Mycobacterium tuberculosis*. La mejor manera de garantizarlo es partiendo del material aislado de cultivos, pues prácticamente en cierto modo viene libre de contaminación con otros microorganismos.

Por consiguiente, para que la PCR sea una técnica de diagnóstico eficaz y de rutina en el diagnóstico de la TBC, debe poder aplicarse directamente en nuestras clínicas, de manera que se elimine el cultivo y que los resultados obtenidos tengan un alto valor predictivo.

ADN proveniente de nuestras clínicas directamente

Métodos de la PCR cuidadosamente optimizados, pueden tener entre un 90 % y 100 % de sensibilidad en pacientes con esputos positivos y entre un 60 % y 70 % en pacientes con esputo negativo y cultivos positivos (3).

De hecho, comercialmente existen ciertos

kits disponibles, incluyendo el Amplicor (*Roche Molecular Systems*; Branchburg NJ), donde la secuencia blanco de amplificación es parte del gen 16S ARNr, seguido por detección colorimétrica del producto amplificado (4). Otro de estos sistemas es el MTD (*Gen Probe*, San Diego California), método que de igual manera utiliza secuencias blanco ubicadas dentro del ARNr (5) o la prueba de *Stand Displacement Amplification Test* (Becton Dickinson). La mayoría de estas pruebas están basadas en la inserción IS6110, que se encuentra en múltiples copias en casi todos los aislamientos. Este hecho, en teoría, ayudaría a incrementar la sensibilidad del método, ya que al existir múltiples copias de la secuencia blanco de la PCR, se partiría de un ADN molde que se encuentra en mayor cantidad en el organismo. Sin embargo, utilizar estas técnicas como diagnóstico, pueden producir resultados falsos positivos, debido a que se pueden detectar otras micobacterias que contengan ese elemento de inserción. Por otro lado se pueden obtener resultados falsos negativos, debido a que no todas las micobacterias poseen esta inserción. Es por ello que en adición a la secuencia IS6110, se utilizan otros genes blanco, tales como MBP64, ropb y hsp65, que se supone que son especie-específicos (1).

No obstante, *kits* similares si se utilizan en países desarrollados. Ensayos basados en la PCR son empleados como métodos de rutina en los laboratorios, principalmente para la identificación del complejo de *Micobacterium* que esté infectando, que además pueden acoplarse a ensayos del tipo INNO-LIPA (detección por sondas), para evidenciar si presenta resistencia anti-drogas, principalmente rifampicina. Estas técnicas en la mayoría de los laboratorios utilizan equipos de alto costo. La ventaja de estas técnicas se traduce en tratamientos más eficaces a la vez que evitan la promoción de micobacterias multi-resistentes, como ocurre al emplear tratamientos incorrectos (1).

A pesar de todo esto, siguen existiendo discrepancias en cuanto al diagnóstico de muestras clínicas provenientes de menores, debido a que la obtención de la muestra es sumamente difícil, pues en la mayoría de los niños resulta complicado obtener un esputo, por lo que otras técnicas de recolección de muestras tienen que ser utilizadas (2). Es por ello que en la mayoría de los estudios que se realizan en este campo, se trata de implementar la PCR como un método capaz de detectar a los microorganismos directamente de nuestras clínicas, convirtiéndola en una técnica más atractiva como método de rutina. Sin embargo, los problemas de contaminación con

otras bacterias y la ocurrencia de reacciones cruzadas todavía no han sido resueltos, por lo que se registra un gran número de falsos positivos.

¿Por qué no se ha implementado la técnica de la PCR como método de rutina para el diagnóstico de la TBC?

La especificidad de una PCR bien diseñada puede ser alta, aunque la sensibilidad suele ser menor a la de los cultivos, pero ambos parámetros pueden optimizarse mediante variaciones en los protocolos utilizados. La PCR reduce el tiempo de identificación del *Mycobacterium tuberculosis* pues puede completarse en 3 a 6 horas. No obstante, la PCR no es utilizada como método diagnóstico de rutina, sobre todo en países en desarrollo, en vista de su considerable costo y el equipamiento que requieren los laboratorios

Es pertinente mencionar la importancia que tiene conocer los fundamentos de la PCR, pues ellos permitirán una visión más crítica de uso de este método como prueba diagnóstica de la TBC.

La PCR se fundamenta en el principio de complementaridad que existe entre las bases nitrogenadas que conforman la doble hebra del ADN, esto es, la adenina es complementaria de la timina y la citosina es complementaria a la guanina. Esta complementaridad es medida por la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno entre ellas. El ADN de doble cadena está conformado por una hebra líder y una complementaria, de manera que en la cadena líder existe una ubicación específica de las bases nitrogenadas, una al lado de la otra, unidas mediante enlaces fosfodiéster. La ubicación de las bases determina una secuencia específica, que en el momento de la duplicación del ADN, la secuencia de la hebra secundaria debe complementar, controlándose así la fidelidad de su replicación. Con la técnica de la PCR se trata de magnificar *in vitro* este proceso y con la tecnología disponible actualmente se logra hacer con alta calidad, es decir, especificidad, fidelidad y eficiencia.

La PCR es una técnica que permite detectar la presencia de una determinada secuencia blanco, es decir, un gen específico, complemento o fragmento del mismo, a partir de una muestra que contiene el ADN genómico de un organismo determinado. La sutileza de esta técnica está en la selección de la secuencia blanco y esto último está directamente

relacionado con la finalidad del estudio. Para el caso particular del diagnóstico de la TBC, la secuencia blanco debe ser un gen conservado en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* causal de la enfermedad, pero que a su vez no se encuentre presente en otros tipos de *Mycobacterium*. Igualmente debe tenerse cuidado con el origen del ADN a utilizar en la PCR, debido a que puede contener fuentes de contaminación bacteriana y producir resultados erróneos.

La exactitud y la fidelidad de las pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAA), ha sido extensamente estudiado. En el Cuadro 1 presentamos un resumen de algunos de estos estudios. La mayoría de ellos reportaron un alto valor de especificidad para TBC pulmonar y extrapulmonar.

Los valores de sensibilidad han sido más bajos y altamente variables entre los estudios, más bajos en los casos de TBC pulmonar con esputo negativo y los casos de TBC extrapulmonar. En contraste, la sensibilidad de esta prueba demostró ser mayor en los casos de TBC pulmonar con esputo positivo. También se hace evidente que las pruebas NAA no comerciales están más limitadas para el uso clínico que los *kits* comerciales (6).

Los resultados del Cuadro 1 sugieren que las pruebas NAA pueden reemplazar pruebas convencionales, tales como la baciloscopia y los cultivos, pero estas pueden utilizarse e interpretarse en conjunto, pues las pruebas NAA en general, poseen alta especificidad y un alto valor predictivo positivo. Debido a que este tipo de pruebas tienen relativamente baja sensibilidad, particularmente en pacientes con esputo negativo y enfermedad extrapulmonar, se pueden utilizar como pruebas confirmativas (6).

Diagnóstico de TBC mediante un sistema no comercial de la PCR

Como ya hemos señalado anteriormente, uno de los obstáculos de la técnica de la PCR para el diagnóstico de la TBC es el elevado costo de los sistemas comerciales disponibles para aplicación clínica y de los cuales dimos algunos ejemplos. El desarrollo de un sistema de amplificación en el ámbito local permitiría su aplicación clínica con un costo accesible. Presentamos a continuación un ejemplo.

Con el propósito ya señalado un grupo de investigadores de la Universidad Autónoma de Baja California desarrolló un sistema de amplificación por PCR para *M. tuberculosis*. El fragmento de

ADN a amplificar es una secuencia específica de *M. tuberculosis* aislada y caracterizada por Parra, Londoño, Del Portillo y Patarollo (7,8). Dicho gene es denominado mtp40, el cual codifica una proteína del mismo nombre.

Con el fin de estandarizar la técnica con esta nueva cadena de oligonucleótidos y determinar su sensibilidad, especificidad y valores predictivos en especímenes clínicos de origen respiratorio, se procedió a analizar por PCR los especímenes enviados para estudio microbiológico convencional al Laboratorio Estatal de Tuberculosis de Baja California.

Se analizaron muestras de expectoración y líquido pleural por medio de amplificación directa por reacción en cadena de la polimerasa utilizando las secuencias ^{5'}CAGCCCGCTGGAGTCCCGCGGA^{3'} y ^{5'}GCGCGTTCACCATGGACACCG^{3'}. Se utilizó como estándar de oro el cultivo en Lowenstein-Jensen. Para la descripción detallada del aislamiento de los ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa, remitimos al lector al trabajo original (9).

Se incluyeron 79 pacientes consecutivos y un total de 212 especímenes. Sólo presentamos los resultados de PCR vs. cultivo con muestras de expectoración (Cuadro 2).

Como puede observarse la sensibilidad fue de 97 %, la especificidad de 17 % y el valor predictivo positivo de 57 %.

En los 55 casos con baciloscopia positiva en expectoración (datos no presentados) la PCR fue positiva en 54 (98,18 %).

Los autores concluyen que la secuencia utilizada en este proyecto tiene una sensibilidad y valor predictivo positivo adecuados para poder ser utilizada en muestras de expectoración con baciloscopia positiva, con el fin de identificar rápidamente a los pacientes infectados con micobacterias tuberculosas y distinguirlos de aquellos infectados por micobacterias no tuberculosas, las cuales habitualmente son resistentes a los antifímicos convencionales. Esto reviste particular importancia en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, quienes con frecuencia presentan infección por micobacterias no tuberculosas.

PRUEBA DIAGNÓSTICA EN TUBERCULOSIS

Cuadro 1

Revisión del meta-análisis Autores, año	Nº de estudios incluida la revisión	Tipo de TBC	Tipo de prueba NAA	Hallazgo principal	Conclusión
Flores y col.(2005)	84	Pulmonar	PCR no comercial	Estimaciones muy variables Sensibilidad menor que especificidad	La precisión es baja. Alta inconsistencia. Uso de IS6110 y PCR anidada asociada a mayor precisión
Sarmiento y col. (2003)	50	Pulmonar esputo negativa	PCR comercial y no comercial	Idem	Inconsistente. No recomendable para el tipo de TBC
Pai y col. (2004)	40	Pleuritis	Idem	Alta especificidad, sensibilidad más baja y variable	Puede tener un rol potencial en la aceptación del diagnóstico de pleuritis pero no su descarte. Resultados inconsistentes
Persimoni y Scarparo (2003)	>40	Pulmonar y extrapulmonar	PCR comercial	Idem	Prueba NAA junto con extendido/cultivo. Valor clínico depende de la probabilidad pretest
Pai y col. (2003)	49	Meningitis	PCR comercial y no comercial	Idem	Rol potencial en la confirmación del diagnóstico pero no en su descarte. Resultados inconsistentes

Resultados de revisiones sistemáticas en relación a la exactitud de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para tuberculosis (Nahid P., 2006).

Cuadro 2

Resultados de PCR vs cultivo

	Cultivo (+)	Cultivo (-)	Total
PCR (+)	33	25	58
PCR (-)	1	5	6
Total	34	30	64

REFERENCIAS

1. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technology Assessment*. 2007;11:3-
2. Broglia B, Bonifachich E, Cerqueiro M, Díaz N, Diez G, González N, et al. Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil: consenso. *Arch Argent Pediatr*. 2002;100(2):159-
3. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3: 141-147-
4. American Thoracic Society Workshop. Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:1804-1814.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR. Morb Mortal Wkly Rep*. 1996;45:950-952.
6. Nahid P, Pai M, Hopewell P. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;3:103-110.
7. Parra CA, Londoño LP, Del Portillo P, Patarroyo ME. Isolation, characterisation and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: Identification of a species-specific sequence. *Infect Immunity*. 1991;59:3411-3417.
8. Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2163-2168.
9. Laniado-Laborin R, Enriquez-Rosales ML, Licea-Navarroll AF. Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2001;14(1):22-26.

NOVEDADES CIENTÍFICAS Año 1, Nº 1, 19/3/2009 .Monitoreo de la producción celular

de proteínas por análisis del perfil de ribosomas (ribosome profiling)

Dra. Lilia Cruz de Montbrun Miembro Correspondiente Nacional

Revisamos el trabajo “Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling” publicado en línea en Science Express (www.scienceexpress.org/ 12 February 2009 /Page 1/ 10.1126/science. 1168978), por NT Ingolia, S Ghaemmaghami, JRS Newman y JS Weissman, investigadores de la Universidad de California, San Francisco, y del Instituto Howard Hughes de Investigación Médica. Repasamos brevemente el proceso de traducción genética.

Describen una novedosa técnica, el análisis del perfil de ribosomas (secuenciación profunda de fragmentos de ARN mensajero protegidos por ribosomas), que permite monitorear con gran precisión y rapidez la identidad y cantidad de cada proteína que está siendo sintetizada por células vivas (traducción) en cualquier momento y en respuesta a condiciones cambiantes. La clave está en que se logra capturar cada molécula de ARNm en su unión con los ribosomas, sitio de la síntesis de proteínas. La identificación de las proteínas es posible al conocer con exactitud las partes del ARNm leídas por los ribosomas. La cantidad de cada proteína sintetizada es indicada por

el número de ribosomas unidos simultáneamente a cada molécula de ARNm.

Fue aplicada en células de levadura, eucariotas, cuyo genoma es simple y sus proteínas están bien caracterizadas, con los siguientes resultados: de un total de 5 295 genes, fueron traducidos 4 648. La eficiencia de la traducción varía entre 0 y 100 veces y existe extenso control (aproximadamente 30%) de la síntesis de proteínas a nivel del proceso de traducción, tanto en condiciones normales como en respuesta al estrés por privación de nutrientes.

Este método de alta precisión puede ser adaptado sin mayores problemas a toda clase de células, incluyendo humanas. Permitirá obtener información relevante en relación con todos los procesos biológicos y para las ciencias médicas. Por ejemplo: identificar proteínas que inducen la aparición de enfermedades, seleccionar proteínas que pueden constituir un blanco para la acción de drogas u otras intervenciones, contribuir al diagnóstico y pronóstico de enfermedades, comprender mejor muchos aspectos de la biología tales como el desarrollo, aprendizaje, envejecimiento, etc.