

Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria:

Las técnicas de Biología Molecular (BM) permiten la detección de material genético (Ácidos Nucleicos), tanto DNA como RNA, que constituyen la característica inequívoca de especie y sus modificaciones como mutaciones, deleciones y translocaciones, las cuales tienen diferentes implicancias según la situación estudiada.

En microbiología permiten la detección de porciones de ácidos nucleicos(**AN**) (**DNA** o **RNA**) que son específicos de cada microorganismo, en diferentes materiales clínicos. Su aplicación, surge como una necesidad para poder detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivos o desarrollos tardíos y donde las técnicas serológicas de detección de antígenos(Ag) y anticuerpos(Ac) carecen de suficiente sensibilidad y especificidad diagnóstica. Esta circunstancia se ajusta principalmente a la detección de virus, es por ello, que el desarrollo de técnicas moleculares comenzó en esta área.

Las primeras técnicas de BM, utilizadas desde los años 70 se basan en el mismo principio que las actuales, que es **la hibridación** (unión de pares de bases complementarias) entre cadenas de AN. Esta unión es de alta **especificidad**, superior a la unión Ag-Ac, pero carecen de sensibilidad, lo que las convirtió en poco útiles para la detección y se utilizan principalmente para la identificación de microorganismos.

En la década de los 80, la incorporación de la amplificación de AN a través de enzimas termoestables (polimerasas) y la evolución de los sistemas de detección, permitió mejorar notablemente la **sensibilidad**. Todo este proceso que comenzó en los laboratorios de investigación se ha trasladado a nuestro laboratorio, formando parte de una de las herramientas más importantes para colaborar en el diagnóstico de alta complejidad en la práctica diaria. Ejemplo: informes de carga viral de Citomegalovirus, en 24 hs, en urgencias clínicas de pacientes transplantados.

¿Cómo evolucionaron las técnicas moleculares?

En la evolución de las técnicas moleculares, se fueron incorporando mejoras en función de minimizar las principales desventajas.

El primer punto es haber trasladado muchas de las metodologías **caseras** a formatos **comerciales**, permitiendo una **mejor estandarización, evaluación de controles** internos y externos internacionales, e **interpretación adecuada** de los resultados para evaluar el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes.

En forma conjunta, se dio la incorporación de los **controles internos que pueden ser de concentración conocida**, que consisten en transcritos similares al target a medir pero con una diferencia de 25 a 30 pb, que se amplifiquen con los mismos cebadores (primers) y acompañan todos los pasos de la muestra, pero pueda detectarse en forma separada. Esto generó la capacidad de controlar el aislamiento, la amplificación, la detección, la presencia de inhibidores y realizar la cuantificación en cada muestra en particular, ya que la utilización de una curva externa con calibradores, no era de utilidad por la gran variabilidad que producen los diferentes pasos de las técnicas moleculares.

Sin ninguna duda, este fue un paso sustancial que permitió **cuantificar el AN detectado (carga viral)**, metodología que fue incorporada rápidamente al seguimiento de pacientes con infecciones virales crónicas, así como también a una mejor evaluación de los resultados obtenidos con las **técnicas cualitativas** que definen patologías de extrema importancia, como por ejemplo: Sistema Nervioso Central (SNC).

El segundo punto importante, era el efecto negativo y de difícil control como son las contaminaciones, fundamentalmente aquellas producidas por reamplificación del producto de amplificación previo o "**Amplicones**". Para ello, se utilizan métodos químicos y físicos que intentan eliminar en su totalidad la presencia de amplicones, sin embargo, ninguno es totalmente efectivo y es fundamental un correcto esquema de trabajo y estructura adecuada.

La incorporación de la automatización en los diferentes pasos, como el aislamiento, amplificación y la detección, permitieron generar esquemas de trabajo cerrados donde, al no abrirse tubos con

productos de amplificación, la diseminación de “amplicones” es insignificante y por consiguiente el fantasma de la contaminación que venía acompañando a las técnicas moleculares, en particular a las **Nested PCR (Doble round de PCR)** como lo son la mayoría de las técnicas caseras para aumentar la sensibilidad, se convierte en anecdótico.

El tercer inconveniente que comenzó a surgir a través del tiempo, es poder realizar cuantificaciones de microorganismos, donde la cantidad de muestras en los laboratorios nunca serán suficientes como para que las empresas de diagnóstico generen equipos comerciales controlados y estandarizados, así como la necesidad de resultados en tiempos más cortos y siempre generando resultados cada vez más exactos, fue dando origen a las **técnicas moleculares en tiempo real**. Estas técnicas permiten ir detectando el producto de amplificación a medida que se va formando, o sea, en vez de realizar una hibridación del producto final de la reacción, se va realizando **a medida que se obtiene el producto amplificado**. Esta metodología incorpora una serie de ventajas con respecto a las anteriores mencionadas, **mayor exactitud**, por evitar la medición de productos espurios, **mayor rapidez**, permite la **cuantificación** con curvas externas debido a su **alta reproducibilidad** y algo de suma importancia que es un **sistema abierto**, o sea, que permite la incorporación de diferentes tipos de protocolos sin necesidad de tener equipos comerciales cerrados.

Las técnicas moleculares en tiempo real hoy refieren al último escalón de desarrollo de estas técnicas, aportando las ventajas antes mencionadas y generando esquemas de trabajo diferentes. En este sentido, nos permiten además de la detección, cuantificación de AN, también detectar mutaciones, genotipos, translocaciones, determinaciones que aportan a diferentes especialidades dentro de la Medicina.

De esta forma, hoy conviven en nuestro Laboratorio de Biología Molecular, técnicas caseras, la mayoría Nested PCR, comerciales manuales o automatizadas, sistemas de aislamiento automatizados, metodologías en tiempo real. Por lo cual, es fundamental que los laboratorios incorporen en su informe qué tipo de metodología o técnica utilizan, cuándo y cómo utilizan controles internos, para poder realizar una correcta interpretación de los resultados.

¿Cuáles son las ventajas y desventajas de las técnicas de Biología Molecular?

Ventajas:

- ✓ Su capacidad de multiplicación de la porción de **AN** buscada en el orden de 10^{6-9} copias y la detección a través de técnicas de ELISA, Hibridación, etc., le confieren su altísima **sensibilidad**.
- ✓ La utilización de iniciadores que reconocen una secuencia única elegida propia de cada microorganismo, le confiere su altísima **especificidad**.
- ✓ Su **rapidez** comparada con algunas técnicas tradicionales.
- ✓ La característica de detectar “presencia de AN” en vez de “viabilidad de microorganismos” permite su realización en una gran variedad de muestras.
- ✓ La capacidad de determinar la cantidad de AN específico (Cuantificación o Carga Viral), a través de la incorporación de controles internos de concentración conocida.

Desventajas:

- ✓ La falta de estandarización de las técnicas “HOME MADE”.
- ✓ La probabilidad de resultados **falsos positivos** por contaminación con productos de amplificados anteriores “Amplicones”, hace necesario una cuidadosa evaluación de sus resultados.
- ✓ La probabilidad de **falsos negativos** por la presencia de inhibidores o inconvenientes en los diferentes pasos de las técnicas, esto se controla y detecta con la incorporación de controles internos.
- ✓ No permite el aislamiento del microorganismo para la posterior detección de resistencia.
- ✓ Los costos. Si sólo se las compara con las técnicas tradicionales y no se las evalúa en el contexto total del cuidado del paciente y gastos indirectos de las entidades de salud.

¿Cuáles son las condiciones indispensables para su realización?

Se deben cumplir 3 condiciones fundamentales:

1) Muestra clínica adecuada: Consultar en todos los casos al laboratorio, tipo de muestra, conservación y transporte necesario para cada determinación en particular por ser cada una de éstas dependientes de la patología, estructura y distancias en cada situación. El concepto universal es que el recipiente debe ser **“nuevo y estéril”**.

2) Laboratorio con estructura apropiada: Tiene que constar de 2 ó 3 áreas separadas y aisladas, cada una con sus propios materiales para trabajar y estar instaladas en un sector con escasa circulación de personal. Equipamiento adecuado, materiales calibrados, estandarizados y sistemas de bioseguridad adecuados.

3) Personal altamente entrenado: El flujo de circulación del personal y la muestra, el uso adecuado de materiales y procedimientos, conjuntamente con la interpretación correcta de resultados permiten evitar el principal inconveniente de estas técnicas, que son los resultados falsos positivos por contaminación.

¿Cuándo es conveniente su solicitud?

1) Patologías y situaciones donde su utilidad está ampliamente comprobada:

La relación costo-beneficio de su realización es positiva, ya sea porque evita tratamientos innecesarios o porque permiten cambios de conducta médica que son de vital importancia para el paciente.

Immunodeficiencia por HIV

	Indicación clínica	Técnica	Muestra
	Diagnóstico -Recién nacido de madre HIV positiva -Primoinfección sintomática -Contacto de alto riesgo -Resultados serológicos Indeterminados	PCR Cualitativa: -De DNA proviral (Comercial o “Homemade” Nested-PCR)	5 a 10 ml de sangre entera con EDTA para la obtención de capa de leucocitos.
HIV	Seguimiento: -Inicio de tratamiento -Evaluación de tratamiento -Cambios de tratamiento -Evaluación de Resistencia	PCR Cuantitativas (*): -RT PCR (Amplicor-Roche, Cobas Amplicor, Taqman) -Nasba/Nuclisens (Biomerieux, NUCLISENS EASYQ HIV-1) -bDNA (Bayer, Versant) -Medición fenotípica (sólo en Laboratorios de referencia) -Medición Genotípica (secuenciación)	Plasma de sangre entera con EDTA

(*) Todas las técnicas de cuantificación tienen similar límite de detección, pero no pueden utilizarse alternativamente durante el seguimiento, por poseer diferentes metodologías y no ser comparables entre sí.

Infecciones del SNC

	Indicación clínica	Técnica	Muestra
Herpes simples -Enterovirus -Varicela Zoster -Toxoplasma gondii -Citomegalovirus -Mycobacterium tuberculosis -Epstein Barr	Diagnóstico - Infección del SNC - Infecciones en el huésped inmunocomprometido Pronóstico y Seguimiento: - Infección del SNC - Infecciones en el huésped inmunocomprometido	PCR Cualitativa: Nested-PCR Cualitativa (“Home made”) -PCR en tiempo real (Roche, Applied Biosystems) PCR Cuantitativas: -PCR en tiempo (Roche, Applied Biosystems)	-Líquido cefalorraquídeo (LCR) -Biopsia LCR

Hepatitis

	Indicación clínica	Técnica	Muestra
HCV	Diagnóstico -Infección aguda -Serología indeterminada -Control final de tratamiento	PCR Cualitativa: -RT PCR Cualitativa (Amplicor-Roche, Cobas Amplicor, Taqman) -NASBA (Biomérieux) -Nested RT PCR Cualitativa ("Home made")	-Plasma de sangre con EDTA -Suero
	Seguimiento -Iniciación de tratamiento -Evaluación de tratamiento	PCR Cuantitativas: -RT PCR Cuantitativa(Amplicor-Roche, Cobas Amplicor, Taqman) -NASBA (Biomérieux) -bDNA (Biomérieux) Genotipificación: -HCV INNO-LIPA (Bayer) -RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)	-Plasma de sangre con EDTA -Suero
HBV	Diagnóstico -Evaluación de situaciones especiales en infecciones crónicas	PCR Cualitativa: -PCR (Comercial Amplicor) o ("Homemade" Nested-PCR)	-Plasma de sangre entera con EDTA -Suero
	Seguimiento -Evaluación de tratamiento	PCR Cuantitativas: -PCR Cuantitativa(Cobas amplicor-Roche)	Plasma de sangre entera con EDTA -Suero

Otras patologías y situaciones especiales

	Indicación clínica	Técnica	Muestra
CMV	Pacientes inmunocomprometidos(IC) (Transplante, tumores, HIV).	PCR Cualitativas: -PCR (Comercial-Roche o Nested-PCR "Homemade") -Nasba pp67 (RNAm). -PCR cuantitativa Amplicor-Roche (Cobas Amplicor) - PCR en tiempo real	Sangre entera con EDTA -Plasma
		(Roche, Applied Biosystems)	-Plasma
CMV Carga viral	Pacientes inmunocomprometidos(IC) (Transplante, tumores, HIV)	PCR Cuantitativa: -Cobas AMPLICOR-Roche. - PCR en tiempo real (Roche, Applied Biosystems)	-Sangre entera con EDTA
EBV	Pacientes inmunocomprometidos (síndromes linfoproliferativos)	PCR Cualitativas: -Nested-PCR Cualitativa("Home made") PCR en tiempo real (Roche, Applied Biosystems)	-Plasma
EBV Carga viral	Pacientes inmunocomprometidos (síndromes linfoproliferativos)	PCR Cuantitativa: -PCR en tiempo real (Roche, Applied Biosystems)	-Plasma
Toxoplasma gondii	-Diagnóstico Prenatal	PCR Cualitativas: -PCR ("Homemade") -PCR en tiempo real (Roche, Applied Biosystems)	-Líquido amniótico -Biopsias
Mycobacterium tuberculosis	Diagnóstico: -Infecciones pulmonares y extrapulmonares.	-PCR Cualitativa: (Comercial-Roche o "In House" Nested-PCR) -LCX (Comercial-Abbott) -PCR en tiempo real (Roche, Applied Biosystems)	-Tracto respiratorio inferior
Chlamydia trachomatis	-Enfermedades de transmisión sexual (ETS)	PCR Cualitativa -PCR (Comercial-Amplicor-Roche, Cobas-Amplicor) -LCX (Comercial-Abbott)	-Muestras genitourinarias

¿Cuál es la perspectiva futura?

Además de las mencionadas, se podrían realizar técnicas de Biología Molecular en muchas otras situaciones de difícil **diagnóstico etiológico** dentro de las enfermedades infecciosas. Ejemplo: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Enterovirus*, *Helicobacter pylori*, etc.

También tienen demostrada utilidad para resolver problemas **taxonómicos** con rapidez y eficiencia. Ejemplo: *Mycobacterium tuberculosis* y otras Mycobacteriosis.

Significan un aporte incalculable en la detección más rápida de **resistencia a antimicrobianos**. Ejemplo: Resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*, resistencia a rifampicina como marcador de multiresistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.

Son importantes herramientas para el correcto **estudio epidemiológico** de brotes nosocomiales. La **Genotipificación** en algunas patologías posibilita el mejor conocimiento del pronóstico de las mismas. Ejemplo: HCV

En conclusión, podríamos aplicar técnicas de Biología Molecular para la detección y cuantificación “en teoría” de cualquiera de los agentes conocidos, pero la realidad es que el avance en las metodologías es mayor que el conocimiento del significado de los resultados obtenidos, es por ello, que es fundamental restringir su realización a las situaciones en que realmente está comprobada su utilidad clínica, epidemiológica.

Debemos considerar también su realización en otras especialidades de la Medicina (**Hematología, Oncología, estudios prenatales, Farmacogenética**) y muchas otras situaciones donde todavía nuestro conocimiento no es suficiente para reconocer las ventajas de su utilización.

Es decir, que las posibilidades presentes y futuras son tan infinitas como lo es la imaginación en busca del próximo siglo.

Centros Médicos Dr. Stamboulian

Revista N°	Marzo-Abril: Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria.
Revista N°	Mayo-Junio: Onco-Hematología: Contribución de la PCR en tiempo real.
Revista N°	Julio - Agosto: PCR en Tiempo Real, una herramienta en pacientes transplantados.
Revista N°	Septiembre - Octubre: Farmacogenética: Una disciplina que conduce a la Medicina personalizada. Utilidad en terapia anticoagulante.