

VI. La biología molecular en el diagnóstico micológico en México

Francisca Hernández-Hernández*

Laboratorio de Micología Médica Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología,
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 16 de enero de 2008

Aceptado: 25 de enero de 2008

RESUMEN

En los últimos 20 años la biología molecular ha alcanzado todas las áreas de la medicina. La micología médica no ha sido la excepción y uno de sus principales objetivos es la identificación temprana de los agentes causales de las infecciones por hongos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido la técnica molecular más utilizada para este objetivo. Sin embargo, en México el desarrollo de estos procedimientos aún es muy limitado, particularmente debido a la necesidad de personal altamente capacitado y al costo que representan. Así, son pocos los laboratorios que han logrado estandarizar la técnica y pueden ofrecerla como parte de los servicios hospitalarios. Las infecciones que han recibido mayor atención son las micosis sistémicas causadas por hongos de bajo potencial patógeno como *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* y algunas especies de mucorales, debido a que resultan en elevada mortalidad en pacientes con graves factores de riesgo. Algunas de estas especies son especialmente difíciles de identificar por procedimientos no moleculares como el cultivo y la histopatología, que consumen mucho tiempo, por lo que el establecimiento de estos métodos en los laboratorios de diagnóstico micológico debe ser prioritario.

Palabras clave:

Micosis oportunistas, biología molecular

SUMMARY

In the last 20 years the molecular biology has reached all the medicine areas. The medical mycology has not been the exception and one of its major objectives is the early identification of the etiological agents of fungal infections. The polymerase chain reaction (PCR) has been the molecular technique most widely used. However in Mexico the development of these procedures is yet limited mainly because it requires highly specialized staff and the high costs. Therefore, the laboratories which have succeeded in the standardization of this technique and offer it as a part of the hospital services are very few. Infections which get more attention are systemic mycosis caused by low virulence fungi such as *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* and some mucorales species, due to the high mortality in patients with severe risk factors. Some of these species are difficult to identify by non molecular procedures such as culture and histopathology which are time consuming, so the establishment of these methods in the mycological diagnosis laboratories is necessary.

Key words:

Opportunistic mycosis, molecular biology

Para fundamentar y ampliar la comprensión de este tema, es necesario considerar la frecuencia con que se están presentando los diferentes grupos de micosis en la población general, variable dependiendo del estado inmunológico del paciente y de su nivel socioeconómico, lo que repercute en los recursos o la infraestructura para establecer el diagnóstico o dar tratamientos oportunos y adecuados; o incluso si se trata de una infección micótica causada por hongos filamentosos o por hongos levaduriformes. Independientemente de estos factores, el número de pacientes inmunodeprimidos y consecuentemente el número de infecciones micóticas oportunistas están aumentando.¹

De acuerdo con algunos estudios realizados en México y considerando los grupos mundialmente aceptados de micosis (superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas), la mayoría de estas infecciones se presenta en tejidos superficiales, pero de los cuatro grupos, las más graves son las infecciones en pacientes con un alto grado de inmunosupresión. En este estudio, los autores informan un porcentaje de 22% de micosis oportunistas del total de pacientes atendidos en un laboratorio de diagnóstico micológico en un periodo de cinco años, cifra que debe ser motivo de reflexión y de toma de decisiones sobre acciones concretas.²

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Francisca Hernández-Hernández. Laboratorio de Micología Médica Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior de Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, 04510 México D.F., México. Tel.: (55) 5623 2458. Correo electrónico: micoher@hotmail.com

En términos generales, las micosis oportunistas, que mundialmente son consideradas como micosis invasivas, son la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes inmunosuprimidos en algunos hospitales de Estados Unidos.³ Por otro lado, de acuerdo a un centro clínico-universitario de Alemania, las micosis invasivas causan 40% de mortalidad en los pacientes de terapia intensiva y afectan a 23% de los pacientes que reciben trasplante con células troncales. Para citar solamente los datos de una revisión, García-Ruiz informó porcentajes muy elevados de las micosis invasivas que afectan tanto a los pacientes con cáncer como a los pacientes infectados con VIH.⁴

Tradicionalmente las micosis son identificadas en el laboratorio a través de diferentes procedimientos (examen directo, cultivo, histopatología, pruebas inmunológicas), cada uno de ellos con una sensibilidad y especificidad diferente de acuerdo al agente causal. La mayoría de esos procedimientos requiere de un tiempo prolongado para dar un resultado preciso, que puede ser desde 3 hasta 15 o más días. Este largo periodo para proporcionar los resultados diagnósticos ha sido motivo de la búsqueda de procedimientos más rápidos, sensibles y específicos. Así surge la necesidad de echar mano de los métodos moleculares. Este grupo de técnicas se basa principalmente en la amplificación de ADN correspondiente a fragmentos de genes o de genes completos, desarrollada y dada a conocer como PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por Kary Mullis en 1983.

De esta técnica se han derivado diversas modalidades: PCR-RAPD, PCR-RFLP, RT-PCR, etc., cuya principal utilidad se ha reflejado en los estudios diagnósticos y epidemiológicos.^{5,6} Como ejemplo está que a través del análisis de los fragmentos amplificados se ha podido diferenciar la fuente (pacientes o naturaleza) de diversos aislados del agente causal de la esporotricosis.⁷

A través de la utilización de primers específicos para una región de ADN, se logra la amplificación de fragmentos únicos de un tamaño definido, y esto permite identificar agentes fúngicos también específicos. En algunos casos es necesarios adicionar otro procedimiento, como la secuenciación, para lograr este objetivo.

A continuación, mencionaré brevemente tres grupos de trabajo que en México están desarrollando técnicas moleculares enfocadas al diagnóstico micológico molecular, particularmente de micosis que afectan a los pacientes inmunosuprimidos y que causan un elevado índice de mortalidad.

El grupo del doctor Arellano-Galindo, del Hospital Infantil de México, quien ha establecido métodos moleculares para la identificación de diversos hongos, entre ellos especies de *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus neoformans*, a partir de muestras biológicas. En otra técnica utiliza un mecanismo de hibridación con sondas específicas para el producto de PCR, mediante el modelo de ELISA. En un resumen de sus resultados, el doctor Arellano informó 100% de positividad de los procedimientos moleculares para la identificación de algunas micosis oportunistas, en contraste con el porcentaje menor en la positividad de otros procedimientos como el cultivo.

A través de las pruebas tradicionales de laboratorio es prácticamente imposible identificar a *C. dubliniensis*, espe-

cie descrita hace algunos años, bioquímica y morfológicamente muy similar a *C. albicans*. El grupo encabezado por los doctores Villa-Tanaka y Hernández-Rodríguez de la ENCB, ha aplicado dos procedimientos que diferencian a las dos especies: uno a través de un PCR con primers arbitrarios (RAPD), que da como resultado un patrón de bandedo propio para cada especie de *Candida* y de esta forma se pueden diferenciar. Otro a través de la amplificación de regiones que codifican para aspartilproteasa (SAP), y que diferencian *C. albicans* de *C. dubliniensis*: para cada especie amplifica un fragmento de tamaño diferente, o bien no amplifica.⁸

En la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México se tiene el interés por utilizar la PCR con primers específicos como único recurso para hacer la identificación de infecciones fúngicas, de tal forma que se puedan abatir costos y el personal involucrado requiera solamente de una capacitación básica. En este proyecto se han incluido las especies de levaduras y hongos filamentosos que con mayor frecuencia se obtienen de muestras clínicas: *Candida spp.*, *C. neoformans*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Absidia sp.*, *Aspergillus fumigatus*, y algunos hongos altamente patógenos como *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Para la mayoría se han utilizado cepas de referencia (ATCC) para determinar especificidad y sensibilidad de la técnica. Se ha utilizado el ADN obtenido directamente de las cepas de referencia, ADN de cepas recientemente obtenidas de pacientes y muestras biológicas (LCR, sangre, orina, líquido de lavado bronquioalveolar, etc.). Todos los primers hasta hoy empleados con cuatro especies de *Candida* han sido específicos y la técnica de PCR ha sido altamente sensible (1 a 10 pg de ADN), con algunas diferencias entre especies. Para *C. neoformans* se han incluido todos los serotipos. La amplificación hasta este momento ha sido específica para esta especie y la sensibilidad también es bastante aceptable.

Los procedimientos de biología molecular han sido introducidos en diversos laboratorios de las grandes ciudades en nuestro país, particularmente en la ciudad de México, y están enfocados a la investigación básica. Sin embargo, son pocos los laboratorios que aplican esta tecnología con la finalidad de establecer un diagnóstico temprano de las micosis. Por lo tanto, es necesario que las instituciones correspondientes destinen un mayor presupuesto para capacitar al personal de laboratorio encargado de realizar los procedimientos necesarios para confirmar o descartar un agente fúngico como causante de una infección sistémica, particularmente en los pacientes de alto riesgo por presentar uno o más factores de inmunosupresión.

Referencias

1. Bodey G, Bueltmann B, Duguid W, Gibas D, Hanak H, Hotchi M, et al. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:99-109.
2. Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Macotela-Ruiz E, Manzano-Gayosso P, Serrano-Jaen L, Carmona-Castañón A, et al. Variación en la frecuencia de micosis en México. *Rev Argent Microbiol* 1999;31:107-103.
3. Karthaus M, Cornely OA. Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Ann Hematol* 2005;84:207-216.

4. **García-Ruiz JC, Amutio E, Pontón J.** Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Rev Iberoam Micol* 2004;21:55-62.
5. **Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, et al.** Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35:1353-1360.
6. **Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Ferreira JA, Tendler M.** rDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients. *Can J Microbiol* 2004;50:514-520.
7. **Ramírez-Gaona AY.** Identificación fenotípica y genotípica de aislados de *Sporothrix schenckii* obtenidos de la naturaleza en el estado de Puebla. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, 2005.
8. **Baires-Varguez L, Cruz-García A, Villa-Tanaka L, Sánchez-García S, Gaitán-Cepeda LA, Sánchez-Vargas LO, et al.** Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and ATB ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol* 2007;24:148-151.