

La trascendencia de la metodología molecular en el diagnóstico

Alejandro Escobar-Gutiérrez,* Ana Flisser **

Resumen

El Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), apoya parcialmente a los programas de vigilancia epidemiológica por medio de la identificación de la mayoría de los agentes infecciosos prevalentes en el país. El éxito del programa para el control o erradicación de una enfermedad infecciosa, en particular, depende grandemente en la caracterización oportuna y precisa del agente etiológico correspondiente. Para el diagnóstico de laboratorio en el INDRE se utilizan tanto metodologías convencionales, como el examen directo o microscópico de muestras, o el crecimiento en medios de cultivo seguido de la caracterización fisiológica o inmunológica del aislamiento, así como técnicas basadas en procedimientos bioquímicos, inmunológicos o de biología molecular. En muestras clínicas se pueden demostrar antígenos por medio de ELISA con anticuerpos policlonales o monoclonales. Es posible extraer el ácido nucleico específico e identificarlo o tipificarlo con técnicas de electroforesis, hibridación con sondas genómicas, reacción en cadena de la polimerasa o análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción. Se utilizan moléculas recombinantes o antígenos muy purificados para la determinación de anticuerpos, principalmente por ELISA indirecto, ELISA para captura de IgM e inmunoelectrotransferencia. La mayor eficiencia, especificidad y sensibilidad de estos procedimientos de laboratorio ahora proveen de resultados más rápidos, con la misma o mayor precisión que los convencionales y a menor costo.

Palabras clave: Vigilancia epidemiológica, diagnóstico molecular, ELISA.

Summary

The National Institute for Epidemiological Diagnosis and Reference (INDRE) partially supports epidemiological surveillance programs through the identification of most infectious agents prevalent in the country. The success of a program for the control or eradication of a particular infectious disease mainly depends on the opportune and accurate identification of the corresponding etiologic agent. For laboratory diagnosis at INDRE, both conventional methodology using direct or microscopic examinations of specimens or growth in culture media followed by physiological or immunological characterization of the isolate, as well as new techniques based in biochemical, immunochemical and molecular biology procedures are carried out. Antigens can be detected in clinical samples by ELISAs with polyclonal or monoclonal antibodies. Specific nucleic acids can be extracted, identified and typed with techniques like electrophoresis, hybridization with genomic probes, polymerase chain reaction or fragment restriction length polymorphism. Recombinant molecules or highly purified antigens are being obtained and used for the determination of antibodies, mainly with indirect ELISA, IgM capture-ELISA and Western Blot. The better performance, specificity and sensitivity of these laboratory procedures, provide faster results, with equal or greater accuracy than traditional ones, at lower cost.

Key words: Epidemiological surveillance, molecular diagnostic, ELISA, Western Blot.

* Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Ssa.

** Académica Numeraria, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Ssa.

Correspondencia y solicitudes sobre el artículo: Dirección INDRE, Carpio No. 470, Sto. Tomás, 11340 México, D. F. Te 341-43-89/11-01, Fax: 341-32-64.

Gran parte del éxito para lograr el control o la erradicación de las enfermedades infecciosas, depende de la eficacia en la obtención de un diagnóstico correcto y oportuno de los casos clínicos, lo que a su vez es consecuencia de la capacidad de los laboratorios de diagnóstico para la identificación, preliminar o definitiva, de los agentes causales involucrados. Después de que Pasteur propusiera a mediados del siglo XIX la teoría microbiana de las enfermedades transmisibles y que ésta se confirma mediante el aislamiento de diversos agentes etiológicos, comenzaron a desarrollarse métodos para el trabajo rutinario de identificación de tales agentes. Inicialmente, estos métodos se basaron en la demostración microscópica de agentes presentes en muestras clínicas, en su crecimiento *in vitro* en un cultivo o *in vivo* en un animal de experimentación, seguidos por la caracterización fisiológica o inmunológica de los organismos aislados. Debido a su importancia práctica, muchos de esos procedimientos se continúan utilizando rutinariamente, sólo con las modificaciones más o menos importantes a que ha dado lugar el desarrollo tecnológico.

En una evaluación objetiva de los métodos "convencionales" de diagnóstico, se encuentra que muchos tienen limitaciones importantes en cuanto a su sensibilidad, su especificidad o en la oportunidad del resultado que se obtiene, además de que no cubren todo el espectro de agentes causales identificados a la fecha. Estos problemas se han ido resolviendo satisfactoriamente como consecuencia del extraordinario desarrollo tecnológico del último cuarto de siglo.¹ En el terreno combinado de la bioquímica y la biología molecular se tiene ahora la posibilidad de contar con moléculas cuya homogeneidad y pureza es de calidad uniforme, también se disponen de separaciones electroforéticas que cada día son más eficientes y de procedimientos de acoplamiento entre moléculas que resultan muy sencillos de llevar a cabo. Los métodos inmunológicos como los radioinmunoensayos o los ensayos inmunoenzimáticos se han beneficiado por la disponibilidad de anticuerpos monoclonales y de proteínas obtenidas por la tecnología del DNA recombinante. Esta última además ha generado toda una gama de nuevas técnicas para la detección de secuencias genéticas específicas de agentes infecciosos a través de su

hibridación con sondas conocidas, cuya demostración posterior se puede hacer directamente o después de haberse amplificado con una DNA-polimerasa. La consecuencia inmediata de estos avances ha sido que los resultados se logren en un tiempo mínimo, que se incrementa la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico, y muy importante, que se pueda demostrar la presencia de agentes cuyo cultivo *in vitro* es muy difícil o imposible.²

Aunque no cabe la menor duda de que los métodos moleculares han generado una verdadera revolución en la salud pública, hay que considerar que también se han acompañado de nuevos tipos de problemas como son los resultados positivos falsos debidos a la contaminación con ácidos nucleicos o de su propia "ultrasensibilidad" que permite la identificación de agentes no viables o de cantidades insignificantes del patógeno presentes en un individuo sano. No obstante, paulatinamente estos problemas se han ido resolviendo, cada día es más frecuente su uso en el diagnóstico rutinario y la única limitación que permanece para su total difusión es el costo de los equipos y reactivos que puede rebasar fácilmente el presupuesto de muchos laboratorios.³

El Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) de la Secretaría de Salud, es una entidad que participa activamente en el diagnóstico de problemas de importancia en salud pública que están sujetos a programas de vigilancia epidemiológica. Ante la necesidad de ampliar y mejorar las capacidades diagnósticas del INDRE se han desarrollado, adaptado o incorporado nuevas técnicas moleculares como se ejemplifica a continuación.

El mejor ejemplo de la evolución en el INDRE de un método de diagnóstico basado en la determinación de moléculas lo constituye el ELISA, que es el que se utiliza con mayor frecuencia en la institución. En sus orígenes, la aplicación de este método se dirigió a la búsqueda de anticuerpos en lípidos corporales y actualmente se ha extendido a la detección de antígenos en circulación o en excretas. También se ha pasado el uso de antígenos crudos (gérmenes completos, extractos solubles o proteínas semipurificadas) a la utilización de proteínas recombinantes como fuentes de antígeno. Para poner de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo o capturar antígenos o

anticuerpos a partir de materiales clínicos, únicamente se usaban anticuerpos policlonales y recientemente están siendo sustituidos por anticuerpos monoclonales en los casos en que se demuestra su ventaja operacional. Cada día se emplean más los sistemas biotinados y conjugados enzimáticos acoplados a avidina o estreptavidina para incrementar la sensibilidad de las pruebas.

En lo que toca a las aplicaciones precisas del ELISA, se puede hacer mención de varios ejemplos. El ELISA indirecto es la variedad metodológica de mayor uso para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en seres humanos, ya que la presencia de anticuerpos específicos en líquidos corporales indica contacto con el agente y si se logra establecer que esos anticuerpos son de la clase IgM, se infiere que el proceso infeccioso se halla en curso. En estos casos, es crucial contar con antígenos de la mayor pureza y especificidad que eviten el riesgo de reacciones positivas falsas, especialmente con agentes cuyas moléculas constitutivas tienen un número importante de epítomos comunes con organismos de géneros y especies diferentes, como sucede con los protozoarios parásitos. Por este motivo, el Departamento de Parasitología en asociación con el Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, lograron obtener un antígeno recombinante de *Trypanosoma cruzi*[†] con la especificidad adecuada para usarse en ELISA, a fin de identificar si un donador de sangre está infectado, lo cual representa una invaluable aportación para controlar el mecanismo de transmisión de la enfermedad de Chagas que parece ser más importante.

Una variación muy interesante del ELISA es la que permite la concentración de anticuerpos de clase IgM mediante su captura específica, como se utiliza en el Departamento de Virología Diagnóstica para las pruebas confirmatorias de sarampión y de dengue. Por su importancia, a continuación se describe el caso de sarampión, ya que la norma nacional indica que para establecer en forma definitiva que un caso de enfermedad febril exantemática corresponde a sarampión se deben identificar anticuerpos específicos del isótopo IgM mediante esta modalidad del ELISA. Para esto se cuenta con placas de ELISA sensibilizadas

con anticuerpos monoclonales anti-IgM humana que capturan la IgM del suero problema, se añade una proteína recombinante del virus del sarampión y si ésta es retenida por la IgM del paciente, podrá reaccionar con un segundo anticuerpo contra dicha proteína que está conjugado a peroxidasa.⁵ Para ilustrar el impacto de esta adaptación metodológica, basta mencionar que de cada diez diagnósticos clínicos de sarampión, se identifican siete por un ELISA indirecto convencional y de éstos sólo uno de dos son confirmados por la prueba de captura de IgM.

Como ejemplo de la importancia de la determinación de antígenos por ELISA, se puede citar el diagnóstico de la meningitis tuberculosa, el cual necesita ser oportuno para poder instaurar la quimioterapia adecuada y evitar lesiones irreversibles o la muerte del paciente. Aunque por ELISA indirecto se pueden demostrar anticuerpos contra *Mycobacterium tuberculosis* en el líquido cefalorraquídeo, puede suceder que éstos aún no aparezcan en la fase aguda o que su concentración sea muy baja: por ello se prefiere buscar el agente causal y puesto que el cultivo está contraindicado por el tiempo que tarda en tornarse positivo, en el Departamento de Inmunología se ha desarrollado un ELISA de captura de antígeno con este fin.⁶ En este caso la placa se recubre con anticuerpos antimicobacterianos que capturan las moléculas del bacilo presentes en el líquido cefalorraquídeo y éstas se ponen en evidencia con anticuerpos biotinados específicos y un conjugado estreptavidina peroxidasa. El tiempo de realización de esta prueba no rebasa las tres horas y con ello se puede ofrecer al clínico una herramienta oportuna y de enorme utilidad para el manejo correcto de sus casos clínicos.

Con el propósito de lograr un diagnóstico diferencial de problemas infecciosos gastrointestinales, tanto para casos individuales como para encuestas epidemiológicas, los Departamentos de Biotecnología y de Bacteriología Entérica están desarrollando un ELISA múltiple para la detección de antígenos de bacterias y parásitos intestinales siguiendo un método previamente estandarizado para la identificación de coproantígenos de *Taenia*.⁷

Las tiras reactivas para el diagnóstico ofrecen grandes posibilidades, especialmente cuando es necesario contar con un diagnóstico muy especí-

fico. Estas tiras se obtienen constitutivas de un agente infeccioso en un gel de poliacrilamida y después para transferirlas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se corta en tiras, cada una se hace reaccionar con un suero problema y las reacciones se revelan mediante un ELISA. Este procedimiento, conocido como inmunoelectrotransferencia o western-blot, ha tenido una aplicación práctica extraordinaria para la confirmación de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. A este respecto, la Unidad de Investigación de Retrovirus Humanos cuenta con la tecnología completa para cultivar el virus y preparar tiras reactivas de diagnóstico, con una excelente calidad, que son indistinguibles de las ofrecidas comercialmente.⁸ Por lo que toca a otras aplicaciones, el Departamento de Biotecnología cuenta con tiras reactivas para el diagnóstico de cisticercosis y ha desarrollado otras para el de trichinelosis, que al incrementar la especificidad y sensibilidad del diagnóstico serológico han resultado de gran utilidad para la identificación de casos de estas dos zoonosis en estudios poblacionales.^{9,10}

La identificación directa del material genético de un agente infeccioso se utiliza también como método para su diagnóstico, como es en los rotavirus. Estos agentes son la causa más frecuente de gastroenteritis aguda en infantes en todo el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo como México, por lo cual es prioritario contar con métodos para su diagnóstico. Los rotavirus tienen un genoma formado por 11 segmentos de RNA de doble cadena que al someterse a electroforesis en un gel de poliacrilamida, presentan un patrón de migración diferencial y específico que permite caracterizar al virus. Esta técnica se conoce como rotaforesis¹¹ y para llevarla a cabo se requiere de un mínimo de equipo de laboratorio por lo que su uso es del todo preferible al de la microscopía electrónica, el cultivo o aún el de ensayos inmunoenzimáticos.¹² En el Laboratorio de Rotavirus del Departamento de Virología se lleva a cabo la técnica de rotaforesis, la cual se ha transferido a una red de laboratorios ubicados en hospitales del país que funcionan como centinelas para determinar no sólo la frecuencia con la que el virus es causante de gastroenteritis, sino también para analizar sus patrones de distribución epidemio-

lógica a través del seguimiento de sus variantes.¹³ La rotaforesis también ha servido para demostrar que otros virus de RNA pueden causar casos agudos de gastroenteritis infantil, tal como son los picobirnavirus, que contienen dos segmentos de RNA de doble cadena, y que son responsables de aproximadamente 4% de los casos de gastroenteritis en sujetos de ese grupo de edad.¹⁴

Con respecto a métodos basados en la tecnología del DNA recombinante se pueden citar varios ejemplos. El Laboratorio de Bacteriología Molecular del Departamento de Biología Molecular cuenta con distintos métodos de hibridación con sondas marcadas con digoxigenina para la identificación de genes codificantes de toxinas presentes en cepas de *Escherichia coli*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*. Por razones de sensibilidad se emplean métodos de hibridación en fase sólida como el dot blot y el colony blot con colonias aisladas en medios de cultivo sólidos a partir de muestras clínicas y además, en el caso de *V. cholerae*, de cepas ambientales. Los métodos para este propósito son muy importantes ya que no todas las cepas de las especies mencionadas son virulentas y sólo así puede asegurarse con certeza que la cepa aislada es la responsable del caso en estudio.¹⁵

El método más relevante en esta misma categoría es sin lugar a dudas la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a que su potencial es enorme y en una sola serie de amplificaciones se puede lograr que unos cuantos genes se amplifiquen varios millones de veces. El Departamento de Biología Molecular tiene entre sus funciones apoyar el desarrollo o adaptación metodológica, la síntesis de los oligonucleótidos y la aplicación de este método a diversos problemas diagnósticos. La amplificación de DNA se ha aplicado o se está desarrollando para *Mycobacterium tuberculosis*, las toxinas de *Vibrio cholerae* y de *Escherichia coli* y para *Bordetella pertussis* y *Leptospira*. En el caso particular de la tuberculosis se utiliza como iniciador el elemento de inserción IS6110¹⁶, cuya identificación después de su amplificación indica la presencia de *M. tuberculosis* en muestras de expectoración, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural o sangre. La técnica se basa en la extracción del DNA de las células presentes en la muestra, su desnaturalización con calor, la adición del iniciador y la de una DNA polimerasa termoestable

dependiente de DNA, la Taq polimerasa; después de 30 ciclos de amplificaciones, en una minigel de agarosa se busca la presencia de una sola banda de 123 pares de bases.¹⁷ Gracias a este PCR se ha podido acortar notablemente el tiempo en el que se llega a un diagnóstico positivo, con el impacto correspondiente en el tratamiento inmediato y adecuado de los casos, para la instauración de medidas profilácticas y para estudios poblacionales de vigilancia epidemiológica.¹⁸

Un caso especial de la PCR es cuando se aplica para identificar el genoma de virus con RNA. En este caso, antes de realizar el procedimiento ya descrito para DNA, se tiene que hacer la conversión de RNA en DNA utilizando una DNA polimerasa dependiente de RNA proveniente de retrovirus, que se llama transcriptasa reversa, por lo cual el método se le suele llamar RT-PCR. Esto ha sido aplicado para rotavirus en el Laboratorio de Rotavirus y para el virus de la hepatitis C en el Departamento de Inmunología Clínica, sin embargo, la aplicación de mayor trascendencia de la RT-PCR en nuestro país ha estado a cargo de los laboratorios de Poliomieltis y de Virus Ambientales y se trata de la diferenciación entre cepas silvestres y vacunas del virus de la poliomieltis.¹⁹ Con iniciadores específicos para regiones que codifican para el extremo aminoterminal de la proteína VP1 del genoma de los poliovirus vacunales Sabin de los serotipos 1, 2 y 3 y de un virus silvestre mexicano, se ha establecido sin ninguna duda que los casos de parálisis flácida aguda que han aparecido en los últimos años no son causados por el virus silvestre, que en efecto, México es un país que ha erradicado el virus de la poliomieltis.

Finalmente, el Departamento de Biología Molecular también cuenta con una aplicación de la técnica para determinar el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (FRLP) para clasificar -25 especies micobacterianas en pocas horas. El procedimiento parte de una colonia aislada de una micobacteriana, se extrae el DNA, se corta con la enzima de restricción PvuII en sitios específicos y luego de someterla a electroforesis en un gel de agarosa se transfiere a una membrana. Con la sonda IS6110 marcada por PCR con digoxigenina se reconoce el sitio donde está la secuencia correspondiente mediante una técnica de quimioluminiscencia. El patrón resultante es

muy fácil de observar y analizar y permite determinar la especie a la que corresponde el aislamiento. Con este método se puede definir en poco tiempo, con un alto grado de seguridad y bajo costo, si un caso clínico compatible con tuberculosis que es reactivo al tratamiento específico o que se presenta en un sujeto inmunodeficiente se debe a *M. tuberculosis* o a una micobacteriosis causada por otra especie.¹⁸

Aunque muchos de estos métodos por el momento sólo se llevan a cabo en el INDRÉ, se deberán hacer esfuerzos para que a la brevedad posible la tecnología molecular se transfiera a otros laboratorios. Puesto que el INDRÉ norma, coordina y supervisa el diagnóstico epidemiológico de los Laboratorios Estatales de Salud Pública, nuestra responsabilidad primaria es transferir a dicha red los métodos más adecuados y eficientes para que efectúen el mejor diagnóstico posible y sólo quedarían centralizados aquellos procedimientos que por reglamentos internacionales sólo se puedan llevar a cabo en laboratorios certificados, los que implican un riesgo de contagio muy alto y por eso requieren de laboratorios de alta seguridad, los que sean de poca demanda o aquéllos cuyo costo resulta muy elevado. Este programa de descentralización tiene como reto abatir el costo de esta transferencia y los problemas en cuanto a mantener la calidad óptima.

Referencias

1. McMichael AJ. Invited commentary -Molecular epidemiology: new pathway or new travelling companion? *Am J Epidemiol* 1994;140:1-11.
2. Wirth DF, Rogers WO, Barker R Jr, Dourado H, Suesebang L, Albuquerque B. Leishmaniasis and malaria: New tools for epidemiologic analysis. *Science* 1986;234:975-979.
3. Persing DH. Diagnostic molecular microbiology. Current challenges and future directions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;16:159-163.
4. Guzmán Bracho C, Velasco Castrejón O, Rangel López E, Baylón Pacheco L, Rosales Encina JL. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of a recombinant antigen with potential application in the serologic diagnosis of chagas' disease. Abstracts IV Latin American Congress of Immunology, Zacatecas, Zac.; 1996.
5. Valdespino JL, Zárate ML, Del Río A. Diagnóstico etiológico de las enfermedades exantemáticas con énfasis en sarampión. *Higiene (México)* 1993;1:89-100.

6. Escobar Gutiérrez A, Amazcua ME, Gonzalez Mata S, Cázares JV, Llaguno P, **Trujillo VM**. Desarrollo de ELISA de captura de anticuerpos IgG en líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de meningitis tuberculosas. Memorias del X Congreso Nacional de Inmunología. Ixtapa-Zihuatanejo, Gro.;1993.
7. **Allan JC**, Avila G, García **Noval J**, Flisser A, Craig PS. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. Parasitology 1990;101:473-477.
8. Vázquez R, **Soler C**. Presencia de respuestas inmunes no esperadas en sueros HIV-1 positivos. Memorias del X Congreso Nacional de Inmunología. Ixtapa-Zihuatanejo, Gro.;1993.
9. Alcántara P, Correa D. Human humoral immune responses against *Trichinella spiralis*. Int J Parasitol 1993;23:657-660.
10. De la Rosa JL, Acantara P, Correa D. Investigation of cross-reactions against *Trichinella spiralis* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay in patients with various diseases. Ctin Diagn Lab Immunol 1995;2:122-124.
11. Espejo R, Romero P, Calderón E, González N. Diagnóstico de rotavirus por electroforesis del RNA viral. Biol Med Hosp Infant (Méx) 1978;35:323-331.
12. **Álvarez Muñoz MT**, Guiscafré-Gallardo JP, Mondragón **Sánchez C**, **Morales Castillo E**, **Ruiz Gómez J**, Martínez Palomo A. Comparación de las técnicas de electroforesis del RNA viral, ELISA y fijación de complemento con la microscopia electrónica para demostrar rotavirus. Arch Invest Méd (Méx) 1982;13:145-153.
13. Ramírez González E, Celasco Villa A, Palmerín R, García Lozano H. Diversidad de electroderotipos de rotavirus en un hospital pediátrico. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Microbiología, Acapulco, Gro.;1996.
14. Mayén Pimentel E, García Lozano H. Detección de picobirnavirus en niños con gastroenteritis aguda. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Microbiología, Acapulco, Gro.;1996.
15. Giono Cerezo S, Rodríguez Angeles G, Rodríguez Cadena MJ, Valdespino JL. Identificación de enterotoxinas y citotoxinas de *Escherichia coli* por cultivo de células Vero e hibridación en fase sólida (colony blot). Rev Latinoamer Microbiol 1994;36:231-241.
16. **Thierry D**, **Brisson-Noel A**, **Vincent-Levy-Frebault V**, Nguyen S, Guesdon J-L, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 1990;28:2668-2672.
17. Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, **Crawford JT**. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. Amer Rev Resp Dis 1991;144:1160-1165.
18. Olivera H. Técnicas moleculares en el diagnóstico de la tuberculosis. Ciencia Médica 1995;1:38-39.
19. Olivera H, Clemens O, Briseño B. El diagnóstico etiológico de parálisis flácidas con énfasis en poliomielititis. Higiene (México) 1993;1:79-86.