

III. Diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas por bacterias intracelulares

Mario César Salinas-Carmona*

Resumen

Las bacterias intracelulares que producen enfermedad en el hombre incluyen entre otras: Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium lepre, Nocardia brasiliensis, Nocardia asteroides sensu escrito, N. farcinica, N. nova etc. En general las enfermedades producidas por estos microorganismos son difíciles de diagnosticar por las siguientes razones: a) las manifestaciones clínicas que producen son vagas; b) el cultivo del tejido infectado con frecuencia obliga a procedimientos invasivos; c) usualmente estas bacterias son de crecimiento lento; y d) la taxonomía del género Nocardia aún es incompleta. El diagnóstico serológico de utilidad en la clínica se tiene solamente disponible para N. brasiliensis pero en todos los otros casos estos no es posible. Los avances de la Biología Molecular a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa permite detectar un número muy pequeño de bacterias en cultivos aislados de pacientes infectados. En este trabajo se describen las técnicas mas comunes que tienen utilidad clínica en el diagnóstico de algunas enfermedades por bacterias intracelulares.

Palabras clave: Biología molecular, infecciones bacterianas, diagnóstico

Summary

A partial list of intracellular pathogens producing human diseases includes Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium lepre, Nocardia brasiliensis, Nocardia asteroides sensu stricto, N. farcinica, N. nova, etc. Human diseases produced by these bacterial species are hard to diagnose. This is mainly due to the following facts: a) typical clinical symptoms are absent in most diseases produced by the above mentioned bacterial species; b) obtaining of biopsies to cultivate the causal agents frequently involves invasive procedures; c) in general, the above-mentioned microbial species grow slowly under in vitro conditions, and d) taxonomy of Nocardia genus is still incomplete. Serological diagnosis is only available for N. brasiliensis but not for the remaining intracellular bacterial species that have medical interest. Recent advances in molecular biology, in particular the arrival of the polymerase chain reaction (PCR), are very promising for improving clinical diagnoses of the above-mentioned diseases, considering the high sensitivity and specificity that these techniques possess. These new methods allow detecting a very small number of microorganisms isolated from clinical samples. In this paper, some techniques, that have potential utility for clinical identification of intracellular pathogenic agents, are described.

Key words: Molecular biology, bacterial infections, diagnosis

* Académico numerario.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Departamento de Inmunología Facultad de Medicina y Hospital Universitario José E. González. Universidad Autónoma de Nuevo León. Eduardo Aguirre-Pequeño y Francisco I. Madero # 325 Norte Colonia Mitras, Monterrey, N.L. CP 64460, Monterrey N.L. Teléfono y fax (8) 333-10-58 Correo electrónico msalinas@ccr.dsi.uanl.mx Proyecto apoyado parcialmente por CONACYT y PAICYT.

Las enfermedades infecciosas bacterianas en general pueden ser diagnosticadas por el cuadro clínico que se manifiesta en los pacientes y luego confirmarse mediante las técnicas microbiológicas clásicas diseñadas para la identificación del agente causal. Sin embargo, en algunas situaciones clínicas, el tiempo excesivo que esas técnicas requieren para obtener un diagnóstico es inaceptable. Por lo cual, durante el pasado siglo XX se desarrollaron técnicas inmunológicas basadas en la demostración de anticuerpos contra antígenos específicos de algunas bacterias, así se utilizaron las técnicas como la hemaglutinación, la fijación del complemento y más recientemente, (ELISA), para aumentar la sensibilidad de las pruebas que utilizan los ensayos inmunológicos enzimáticos en fase sólida. Esto ayudó indudablemente a disminuir el tiempo para identificar algunos agentes infecciosos pero no resolvió el problema completamente en el caso de las infecciones causadas por agentes bacterianos intracelulares.

En los últimos años del siglo XX fuimos testigos de los avances científicos y tecnológicos en el área de la Biología Molecular. Estos avances tecnológicos se están utilizando en el campo de la Medicina. El área de diagnóstico de enfermedades infecciosas no ha escapado a esta corriente innovadora y cada día vemos como las pruebas basadas en la tecnología de los ácidos nucleicos, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se usa con mas frecuencia. Esta técnica ha mostrado ya su utilidad clínica en la identificación de patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, etc.¹ Esta técnica de reacción en cadena de la polimerasa también ha sido utilizada con éxito en la identificación de parásitos como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Giardia lamblia*, etc. La

lista de agentes infecciosos en donde esta técnica de PCR ha sido utilizada en beneficio de los pacientes crece día con día. En este trabajo nos referiremos en especial al diagnóstico molecular de algunas enfermedades producidas por microorganismos bacterianos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides* y *N. brasiliensis*, los cuales son ejemplo representativo de los microorganismos que se incluyen en el cuadro I.

Las técnicas de diagnóstico molecular, como la PCR que hemos mencionado en los párrafos previos, tienen una especificidad y sensibilidad superior a las técnicas microbiológicas clásicas, pero no resuelven todo el problema de diagnóstico, ni tampoco harán desaparecer a algunos de los métodos clásicos de la microbiología diagnóstica, al menos en el corto tiempo. En el caso de la tuberculosis pulmonar por ejemplo, las técnicas clásicas de diagnóstico han estado encaminadas fundamentalmente a la demostración del agente causal en una muestra biológica proveniente del enfermo con sospecha de infección, o en la demostración de la respuesta del huésped a través de la hipersensibilidad tardía en una prueba cutánea con el uso de una mezcla de antígenos como la tuberculina o el derivado proteico purificado (PPD)

En el caso de la tuberculosis pulmonar hasta hoy la prueba más simple que se ha utilizado para el diagnóstico ha sido la demostración por microscopía de luz de bacilos ácido-alcohol resistentes en la expectoración del paciente, hallazgo que luego se corrobora con el cultivo en medios microbiológicos. Desgraciadamente la búsqueda de bacilos por esta técnica tiene una sensibilidad baja; especialmente cuando en las muestras clínicas el número de bacterias es bajo. En casos como estos o para estudiar la relación epidemiológica entre enfermos y contactos, se utilizó la demostración de una secuen-

Cuadro I. Algunos microorganismos intracelulares patógenos para el hombre

Bacterias	Hongos	Parásitos
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Nocardia asteroides</i>		
<i>Brucella melitensis</i>		

cia de inserción conocida como IS6110 en las bacterias aisladas, esto resultó de una gran utilidad médica, ya que esta secuencia de inserción es específica para todas las cepas del complejo *M. tuberculosis*.²

Las infecciones humanas por *N. asteroides* se han incrementado notablemente en personas con el sistema inmune comprometido; como es el caso de los enfermos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH1/2), o pacientes transplantados que reciben inmunosupresores. Aunque en el 40% de los casos de infecciones por *N. asteroides* no se encuentra un estado de compromiso inmunológico demostrable. Las infecciones que produce la *N. asteroides* son principalmente infección pulmonar o absceso cerebral; lo cual dificulta aun mas la toma de muestras clínicas para su cultivo. Pero aun cuando el cultivo es posible, tarda mas de dos semanas tener la confirmación del diagnóstico porque estos son gérmenes de crecimiento relativo lento. El diagnóstico rápido y preciso de las infecciones por *N. asteroides* es difícil. Las técnicas de biología molecular todavía tiene mucho que aportaren este campo.

Recientemente el uso de la tecnología de los ácidos nucleicos permitió separar el complejo *N. asteroides* en *N. farcinica*, *N. nova* y *N. asteroides sensu stricto*. Para ello Steingrube y colaboradores amplificaron un segmento de 439 pares de bases del gen que codifica para la proteína de choque térmico de 65-kDa y analizaron los patrones de digestión con diferentes endonucleasas.³ Esta información tiene importancia taxonómica; pero además utilidad clínica porque la susceptibilidad a los antibióticos de las diferentes cepas no es igual.⁴ Otra técnica de ácidos nucleicos conocida como Ribotipificación ha sido utilizada con éxito por Laurent y colaboradores, también para diferenciar especies bacterianas antes consideradas como complejo *N. asteroides*. En esta técnica se amplificó mediante la PCR: un fragmento del ADN que codifica para una secuencia parcial del ácido ribonucleico ribosomal 16S perteneciente a la especie de interés, si el ADN de la especie bacteriana aislada del paciente se hibrida con ADN ya caracterizado se tendrá una evidencia fuerte de que las bacterias aisladas de los pacientes pertenecen a la misma especie que el ADN utilizado como molde.⁵

En el caso de la infecciones por *N. brasiliensis*, en el departamento de Inmunología del Hospital Universitario José E. González se desarrolló una técnica inmunoenzimática para el diagnóstico serológico del actinomicetoma, basada en la respuesta de anticuerpos del huésped.⁶ El uso de la Biología Molecular en el caso de *N. brasiliensis* no está encaminada al diagnóstico, sino a la taxonomía. Gracias a ello Wallace y colaboradores pudieron proponer la existencia de una nueva especie conocida como *N. Pseudobrasiliensis*, que fue reconocida entre muestras clínicas aisladas de pacientes con lesiones invasivas.⁷

En mayo de 1999, nosotros publicamos una parte de la secuencia del gen que codifica para una proteína que se comporta como antígeno inmunodominante en los enfermos infectados con *N. brasiliensis*, y resultó ser una proteína con actividad de catalasa. En el mencionado artículo, las secuencias NB 10 y NB11 se buscaron en bacterias de géneros relacionados a *Nocardia* como *Gordona* y *Rhodococcus* y se sugirió su utilidad potencial en la diferenciación de especies.⁸

De todo lo anterior puede concluirse que las técnicas basadas en la demostración de secuencias de ácidos nucleicos específicas en bacterias patógenas para el hombre tendrán un uso importante en el corto plazo. En este caso están las enfermedades producidas por microorganismos intracelulares como *N. brasiliensis* que en ocasiones produce infecciones graves que ponen en riesgo la vida del enfermo y donde urge un diagnóstico rápido.⁹

Referencias

1. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. En Diagnostic molecular microbiology. Principles and Applications. Am. Soc. microbiology. Washington DC. 1993.
2. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH and Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Disease 1990;161:977-981.
3. Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC Jr, Blacklock Z, Wallace RJ Jr. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes including *Actinomyces*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. Clin. Microbiol. 1997;35:817-822.

4. **Steingrube VA, Wallace RJ Jr, Brown BA, Pang Y, Zeluff B, Steele LC, Zhang Y.** Acquired resistance of *Nocardia brasiliensis* to clavulanic acid related to a change in β -Lactamase following therapy with amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991;35:524-528.
5. **Laurent F, Carlotti A, Boiron P, Villard J, Freney J.** Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *J. Clin. Microbiol* 1996;34:1079-1082.
6. **Salinas-Carmona MC, Welsh O, Casillas SM.** Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:2901-2906.
7. **Wallace RJ.Jr, Brown BA, Blacklock Z, Jost K, Brown JM, McNeil MM, Onyi G, Steingrube VA, Gibson J.** New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia*. *J Clin. Microbiol.* 1995;33:1528-1533.
8. **Vera-Cabrera L, Johnson WM, Welsh-Lozano O, Salinas-Carmona MC.** Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona* and *Rhodococcus*. *J Clin. Microbiol.* 1999;37:1971-1976.
9. **Salinas-Carmona MC, Castro A, Licón-Trillo A, Welsh O, Nagesh S, Eisenach KD, Rendón A.** Constrictive pericarditis and recurrent mycetoma due to *Nocardia brasiliensis* in non-immunocompromised patient. *J. Mycol. Med.* 1997;7:47-50.