

## El papel de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico y control de tuberculosis

Verónica Loera-Castañeda,\* José Sánchez-Corona,\* María Cristina Morán-Moguel\*

### Contexto histórico

A la tuberculosis (TB) se le conoce como una de las enfermedades más antiguas que han afectado a la humanidad. Se han encontrado datos de TB espinal en momias de Egipto que datan desde 2,400 años a.C. Alrededor del año 460 a.C, Hipócrates identifica a la "phtisis" (término acuñado por los griegos) como enfermedad contagiosa de consecuencia por lo general fatal. Sylvius en 1702, identificó las lesiones pulmonares o "tubérculos" como cambios consistentes y característicos en pulmones y otros órganos de los pacientes con TB. En 1720 el físico Inglés Benjamin Marten fue el primero en aseverar en su publicación "*A New Theory of Consumption*", que la TB puede ser causada por "diminutas criaturas vivientes", las cuales pueden introducirse en el cuerpo generando las lesiones y los síntomas de la enfermedad. El botánico Hermann Brehmer, en 1854 concluye su tesis doctoral titulada "*Tuberculosis is a Curable Disease*", producto de estudios que realizó después de padecer la enfermedad y haber sanado. La etiología de la TB fue discutida hasta el descubrimiento del bacilo tuberculoso por Robert Koch en 1852, que aunado a la mejora en las condiciones socioeconómicas y el aislamiento del paciente tuberculoso en hospitales, representó un impacto importante en la epidemiología mundial de la TB en la primera mitad del siglo XX. En 1895 otro gran avance fue el descubrimiento de la radiación por Wilhelm-Konrad von Röntgen, herramienta importante para el seguimiento de los pacientes con TB y posteriormente el descubrimiento de las bases para la vacuna a partir del Bacilo de Calmette y Guerin (BCG) por parte de Calmette y Guerin, la cual se distribuye ampliamente en nuestros días.<sup>1</sup>

La secuencia genómica completa de *Mycobacterium tuberculosis* fue descrita en Junio de 1998 por Cole y cols. en la cepa H37Rv,<sup>2</sup> suceso que proporcionó una nueva dirección a las diversas técnicas de ADN recombinante en la detección e identificación de micobacterias y en la identificación molecular de resistencia. Estas técnicas aunque rápidas y exactas, son susceptibles a modificación tratando de disminuir sus limitaciones y aumentar sus ventajas. Las versiones simplificadas cada vez son más asequibles para los laboratorios clínicos. Sin embargo, las placas para análisis en microscopio, y los procedimientos de cultivo, continúan siendo los estándares de oro para el diagnóstico micobacteriano.

### Detección molecular de *Mycobacterium tuberculosis*

Algunos de los métodos moleculares para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* se basan en la amplificación de secuencias repetidas de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de las siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) obteniendo un resultado en 24 a 48 horas. La PCR es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacterianos en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis, en muestras con resultado negativo a la tinción de Ziehl-Neelsen o en el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones no bacilíferas de pacientes con cuadros atípicos asociados a infección por VIH.<sup>3</sup> Sin embargo, se han reconocido dos grandes obstáculos al éxito de la técnica: las dificultades relacionadas con la ruptura de la pared celular micobacteriana y la extracción de ADN y la presencia de inhibidores de la PCR. Otros factores que pueden influir en la sensibilidad y especificidad de la técnica son la variabilidad biológica y la amplificación inespecífica. La sensibilidad

\* División de Medicina Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Centro Médico Nacional de Occidente. IMSS. Guadalajara, Jalisco. México.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: M. en C. María Cristina Morán Moguel. Sierra Mojada #800 col. Independencia, Sector Libertad. C.P. 44340. Guadalajara, Jal. México. cmoran\_moguel@hotmail.com

de la PCR en muestras pulmonares se ha reportado entre 74 y 100%.<sup>3</sup> Una variedad de la PCR es la PCR "nested" o "anidada" que consiste en dos reacciones de PCR con el fin de hacer más específica la amplificación y aumentar el rendimiento.<sup>4</sup>

Las primeras sondas disponibles comercialmente fueron las sondas isotópicas para el complejo *M. tuberculosis* y las especies *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. goodii*, marcadas con <sup>125</sup>I y que hibridan con ARN que permitían la identificación rápida (2 h aproximadamente) de las micobacterias más comunes en ADN extraído de cultivo o tejido. Esto permitió acortar el tiempo de identificación de 4-6 semanas a 2-4h, creando una ventaja tangible entre el uso de técnicas moleculares y las técnicas de identificación tradicionales.

#### *Resistencia a antifímicos y mecanismos moleculares de resistencia*

Desde 1946 cuando se administraba estreptomina como monoterapia, se reportan pacientes con resistencia clínica al fármaco y desde 1973 se tiene antecedente de pacientes infectados con cepas resistentes a múltiples antifímicos.<sup>4</sup> Los mecanismos moleculares de resistencia a fármacos son: inactivación del fármaco, dificultad para acceder al blanco y alteración del blanco por mutación. De estos tres solamente el tercero se ha descrito como mecanismo de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. Esta resistencia es el resultado de mutaciones génicas espontáneas que ocurren con una frecuencia aproximada de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-8</sup>.<sup>4</sup> Actualmente se conocen diez genes y sus productos proteicos involucrados en dicha resistencia: Cuatro genes cuyas mutaciones condicionan resistencia a isoniazida (*KatG*, *inhA*, *katA* y *oxyR-ahpc*); se ha identificado un gen en la resistencia a etambutol (*embB*); uno en la resistencia a fluoroquinolonas (*gyrA*); uno en la resistencia a pirazinamida (*pncA*); dos genes (*rpsL*, *rrs*) en la resistencia a estreptomina y un gen (*rpoB*) en la resistencia a rifampicina; en este último, se ha descrito una región que contiene los puntos calientes para mutación denominada región Rif. Todas las mutaciones que en ella se han identificado confieren resistencia a rifampicina, la mayoría son mutaciones de sentido equivocado, es decir, cambia un aminoácido por otro; además se ha descrito que aproximadamente el 66.8% de estas cepas desarrollan resistencia a otras drogas.<sup>4</sup>

#### *Estrategias moleculares para identificar mutaciones que confieren resistencia*

Para la identificación de mutaciones pueden utilizarse diversas técnicas moleculares, ya sea en forma directa

(en la muestra remitida al laboratorio) o en cultivo. De acuerdo con el grado (de menor a mayor) de especificidad y costo o requerimiento de equipo especial, las más utilizadas son: PCR heterodúplex, técnica que permite analizar cambios hasta de una sola base dentro de la secuencia específica de un fragmento de ADN de doble cadena, evidente como un cambio en el patrón electroforético, debido al mal apareamiento en la doble cadena de ADN. PCCS (*Polimorfismo conformacional de cadena sencilla*) técnica para detectar diferentes conformaciones de una sola cadena de ADN dadas por la presencia de mutaciones. Estas dos técnicas proporcionan una manera fácil y rápida de detectar presencia pero no el tipo y sitio específico de la mutación, lo que es una limitante para su aplicación en estudios epidemiológicos de prevalencia y caracterización de las cepas resistentes a antifímicos, sin embargo, son una opción rápida y de menor costo. La hibridación con sondas actualmente utiliza membranas de diferente material y es posible cargarlas con sondas de interés, como aquellas que contienen mutaciones conocidas responsables de resistencia a diversos fármacos, lo cual favorece el diagnóstico temprano y específico de resistencia en pacientes en control con antifímicos de primera línea. PLH (del inglés; *PCR-reverse Line Blot Hybridization*), técnica que consiste en hibridación reversa de una región de interés, que es amplificada por PCR con un iniciador biotinilado. El producto de PCR es hibridado en una membrana cargada con sondas de secuencias silvestres y mutantes, las cuales se unen a la membrana covalentemente. El resultado positivo indica una hibridación exitosa y se detecta mediante una señal que emite el conjugado de estreptavidina-peroxidasa.<sup>5</sup> INNO-LiPA-Rif TB (del inglés; *INNOGenetics Line Probe Assay*), prueba de hibridación reversa que permite la identificación rápida de la mutación causante de resistencia en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Otorga una correlación del 100% con el análisis convencional de susceptibilidad a drogas y se ha validado con una sensibilidad y especificidad del 100%. La hibridación reversa se realiza entre un fragmento de ADN de interés (producto de un sistema de PCR nested) y una sonda de ADN con una mutación conocida biotinilada en su extremo 5'. Estas dos técnicas ofrecen una detección rápida, fácil y específica de mutaciones conocidas, pero sus limitaciones incluyen costos elevados, la incapacidad para detectar mutaciones desconocidas, el número limitado de sondas y en ocasiones la necesidad de un gran inóculo.<sup>5</sup> Secuenciación. Técnica mediante la cual se puede determinar el orden de nucleótidos en regiones específicas del genoma. Ha permitido la asignación e identificación clara de nuevas especies de micobacterias, así como de mutaciones asociadas con la resistencia a múltiples antifímicos. El costo y el requerimiento de

equipo especializado para secuenciación limitan su uso en la mayoría de los laboratorios.<sup>5</sup>

La especificidad y la rapidez de las técnicas moleculares actuales, representan una ventaja plausible frente a las técnicas tradicionales, esto motiva a la búsqueda de versiones con mayor sensibilidad, especificidad y con menores costos, que sean asequibles para su aplicación en el diagnóstico de infección y la identificación de mutaciones que confieren resistencia, lo que representaría un impacto importante en el control epidemiológico de la tuberculosis en el mundo.

## Referencias

1. **Heinrich-Herzog B.** Tuberculosis a specter returns. *Karger Gazette* 1996;60:1-5.
2. **Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3<sup>rd</sup>, Tekaida F, Badcock k, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin k, Feltwell T, Gentles S, Hamun N, Holdroy S, Homsby T.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from complete genome sequence. *Nature*. 1998;393:537-544.
3. **Morán-Moguel MC, Aceves HD, Peña Montes de Oca PM, Gallegos AMP, Flores MSE, Montoya FH, Figuera VLE, Villa ML, Sánchez CJ.** Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del Noroccidente de México. *Rev. Panam Salud Pública* 2000;7:389-394.
4. **Inderlied CB, Nash KA.** Antimicrobial agents: *in vitro* susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore, Md: Williams & Wilkins. 1996;127-175.
5. **Pfyffer GE.** Antimicrobial Susceptibility Testing in the Management of Multidrug-resistant Tuberculosis. Presented at Diagnostic Technologies in the Management of HIV/AIDS and Other Life-Threatening Coinfectious Diseases: An IAPAC Symposium. Vienna, Austria. October 10,1999.