

UTILIDAD DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMETRASA (PCR) EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR

RESUMEN

Se describen nuevos modelos moleculares de diagnóstico de tuberculosis (TBC) y se los comparó con la clásica metodología de identificación del mycobacterium TBC, enfatizando que la aplicación de la reacción de polimerasa en cadena (PCR) agiliza significativamente la obtención de resultados lo que se traduce en el aislamiento temprano del paciente y el inicio del tratamiento adecuado.

* *Palabras clave: Tuberculosis - Mycobacterium. Polimerasa.*

SUMMARY

We describe new molecular methods for the diagnosis of TBC, and compared with the classical way of identification of mycobacterium TBC, remarking that the polymerase chain reaction (PCR) accelerate the results and allows the early patient's isolation and accurate medical treatment.

* *Key words: Tuberculosis - Mycobacterium - Polymerase.*

INTRODUCCION

La incidencia por infecciones por mycobacterias ha aumentado en los últimos años en todo el mundo. Este incremento no es confinado a mycobacterium tuberculosis. Con el aumento de la incidencia del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y la inmunodeficiencia asociada, enfermedades causadas por otras especies de micobacterias, tales como:

M. avium, *M. intracellulare* y *M. kansasii*, han incrementado notablemente.

* *Jefe de la sección de histocompatibilidad e inmunogenética.*

** *Bioquímica becaria de la Fundación Nefrológica.*

*** *Bioquímica contratada del laboratorio de histocompatibilidad e inmunogenética.*

**** *Jefa del Departamento de Laboratorio.*

Dr. Constancio Giraudo *, Bioq. Susana Albano **, Bioq. Valeria Mas ***
y Dra. Teresita de Alvarellos ****
LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD E INMUNOGENETICA
(AREA BIOLOGIA MOLECULAR)
HOSPITAL PRIVADO CENTRO MEDICO DE CORDOBA

El diagnóstico rápido de infección por mycobacterias es crítico para la decisión del tratamiento de individuos afectados. Las especies difieren en su susceptibilidad al tratamiento con agentes antimicrobianos.

Los métodos tradicionales para el diagnóstico involucran el examen directo, el cultivo del microorganismo, seguido por la identificación bioquímica de la especie. El tiempo requerido para la obtención e identificación del mismo es de hasta dos meses.

El reciente desarrollo de técnicas moleculares, por ejemplo: la hibridación de ácidos nucleicos para la detección RNA ribosomal (rRNA) de mycobacterias y elementos repetitivos, ha acortado los tiempos requeridos para la identificación de 7 a 10 días.

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede disminuir aún mas el tiempo de diagnóstico.

METODO	LIMITE DE DETECCION	SENSIBILIDAD
Examen directo	1×10^4 /ml bacilos	50%
cultivo	1×10^2 /ml bacilos	85% - 90%
PCR	1×10^0 /ml bacilos	90% - 100%

PCR es un método de amplificación enzimática in vitro de fragmentos conocidos de ADN por ciclos repetidos de síntesis, utilizando oligonucleótidos específicos y una enzima termoestable denominada Taq. Polimerasa. Como resultado se obtiene una acumulación exponencial del fragmento de interés. La amplificación y subsecuente visualización del producto en gel de agarosa por electroforesis, pueden ser realizados en menos de 24 horas. Diferentes ensayos han sido desarrollados para la

amplificación de DNA de mycobacterias por PCR. Estos emplean diferentes estrategias básicas y amplifican diversas secuencias.

Las estrategias empleadas incluyen:

- 1) Amplificación especie-específica (Ej. *Mycobacterium* TBC).
- 2) Amplificación de múltiples especies de *mycobacterium* seguida por una hibridización con sondas específicas.
- 3) Amplificación con nested PCR (reamplificación del primer producto del PCR)
- 4) Amplificación de moléculas de rRNA.

La amplificación puede ser seguida de hibridación o no.

Las secuencias del genoma de *mycobacterium* generalmente utilizadas son genes que codifican para proteína de 65 K Da, proteína 38 K Da, 16 S ribosomal (r) RNA y elementos repetitivos altamente conservados.

Amplificando una secuencia repetitiva de DNA, IS 6110, Eisenach et al. (1) demostraron la alta especificidad para el complejo *mycobacterium tuberculosis* una ventaja adicional del segmento IS 6110 es que *mycobacterium tuberculosis* y *mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) difieren en el número de copias del elemento repetitivo por genoma y pueden ser diferenciados en los patrones de productos de amplificación. Esto es útil para cuando es necesario diferenciar una tuberculosis de una BCGitis.

La PCR se caracteriza por su alta sensibilidad y es la metodología de elección para muestras biológicas que poseen bajo número de bacilos (paucibacilares) o bien, aquellas que poseen el microorganismo no viable como consecuencia del método utilizado para la extracción del material o por tratamiento antituberculoso.

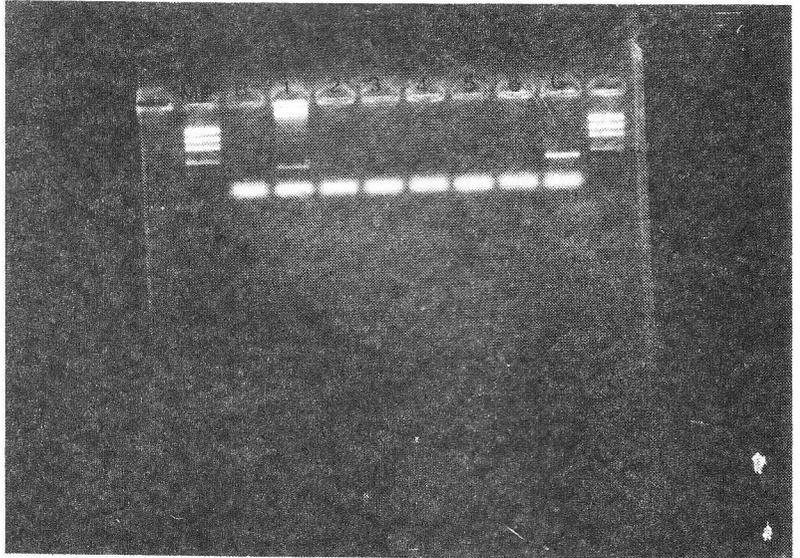


Figura 1. Utilidad de PCR en la detección de TBC extrapulmonar. Corrida electroforática en gel de agarosa con bromuro de etidium de un C. (+) (cepa HV 37 r), muestras negativas (2, 3, 4, 5, 6) muestra positiva para TBC (1) correspondiente a un líquido peritoneal y B (blanco reacción). MP.: marcador de peso molecular.

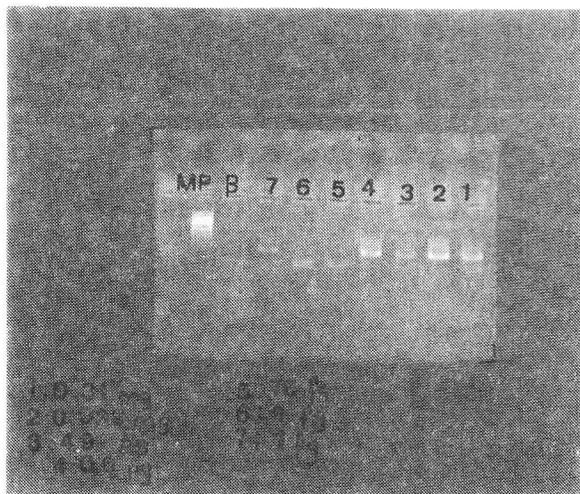


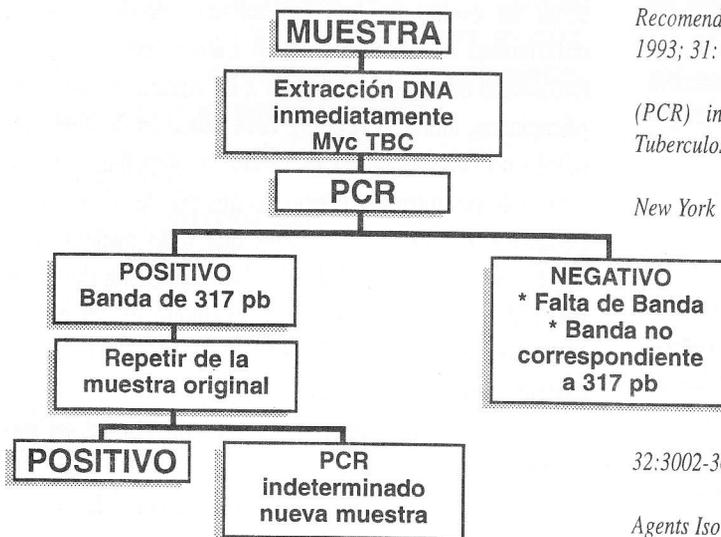
Figura 2. Curva de análisis de sensibilidad de PCR para TBC usando como secuencia de amplificación el elemento IS6110. Diluciones seriadas de concentración de ADN conocida de un standard de la cepa HV 37 r. El límite de detección fue de 1 fg de

ADN, equivalente a una copia de genoma del bacilo.

Se debe tener especial cuidado en el manipuleo de muestras y reactivos para evitar contaminaciones y resultados falso positivos.

Esta técnica tiene particular relevancia en la TBC extrapulmonar donde la recuperación de bacilos viables es dificultosa. En cambio, no estaría indicada en el seguimiento o monitoreo bacilar post-tratamiento.

A continuación describimos los pasos a seguir con la muestra en el laboratorio de biología molecular:



BIBLIOGRAFIA

- (1) Eisenach et al, *J Inf Dis* 1990; 161:977-981.
- (2) Nolte, Metchock, Mc Gavan et al; *Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Sputum by PCR and DNA Hybridization. J. Clin Microb* 1993; 31:1777-1782.
- (3) Jiel, E; Clanidge, et al. *Large Scale use of Polymerase Chain Reaction for Detection of Mycobacterium Tuberculosis in a Routina Mycobacteriology Laboratory J. Clin. Microb.* 1993; 31:2049-2056.
- (4) Jan-D, A Van Embden et al, *Strain Identification of Mycobacterium Tuberculosis by DNA Finger printing. Recomendations for a Standardized Methodology. J. Clin. Microb.* 1993; 31: 406-409.
- (5) Kaltwasser, G. et al; *Enzimatic DNA Amplification (PCR) in the Diagnosis of Extrapulmonary Mycobacterium Tuberculosis Infection; Mol. Cel. Prob.* 1993; 7:465-470.
- (6) Allaned, D; et al; *Transmission of Tuberculosis in New York City; N. Eng. J. Med.* 1993; 330:1710-1716.
- (7) Tanil; Kocagoz et al; *Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Sputum Samples by Polymerasa Chain Reaction Using a Simplified Procedure. J. Clin. Microb.* 1993' 31:1435-1438.
- (8) Myra, N; Widjoatmodjo et al; *Rapid Identification of Bacteria by PCR, Single - Strand Conformation Polimorphism. J. Clin Microb.* 1994; 32:3002-3007.
- (9) Sue Wall et al; *Identification of Spherplast-Like Agents Isolated from Tissues by Polymrase Chain Reaction. J. Clin. Microb.* 1993; 31:1241-1245.
- (10) Syun-Ichi Takewaki et al; *Genus Specific Polymerase Chain Reaction for thedna Igene and Specie-Specific oligonucleotide. Probes* 1993, 31:446-450.
- (11) Yoshit Sugu; Miyazaki et al; *Nested Polymerasae Chain Reaction for detection of Mycobacterium Tuberculosis in clinical samples. J. Clin. Microb.* 1993, 31:2228-2232.

Ser honesto del todo consigo mismo es el mejor esfuerzo que un ser humano puede realizar.

S. Freud