

Es realmente difusa la barrera entre la revisión de la investigación reciente sobre un tema y una contribución para la actualización docente. Esta sección recoge artículos de revisión apropiados para la enseñanza de temas de frontera.

La reacción en cadena de la polimerasa y su aplicación al diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas

Raúl Garza Velasco,¹ Marisol López López² y Manuel R. Saavedra Trejo¹

Abstract: (Application of the polymerase chain reaction to the laboratory diagnosis of bacterial diseases)

The polymerase chain reaction (PCR) has revolutionized the detection of bacterial, fungal and viral pathogens. Traditionally, in bacterial diseases the identification of the infectious agent is accomplished by culturing the microorganisms in the laboratory. However they can be identified molecularly by recognizing specific DNA or RNA sequences; a probe is then constructed which hybridizes to the microbial target sequences.

The PCR is an alternative to direct hybridization methods. Basically, this technique involves combining a DNA sample with oligonucleotide primers, deoxynucleotide triphosphates and the thermostable *Taq* DNA polymerase in a suitable buffer and then repetitively heating and cooling the mixture for several hours until the desired amount of amplification is achieved. The final product represents the target DNA sequence in a million-fold increased concentration and can be easily detected on a gel. The PCR technology greatly increases the sensitivity of detection to a particular pathogen in bacterial diseases.

Introducción

El diagnóstico microbiológico por el laboratorio, tarea encomendada al químico-farmacéutico, tiene como propósito fundamental el de contribuir en la determinación del tratamiento óptimo de los padecimientos infecciosos, a fin de que los enfermos involucrados recuperen su salud a la brevedad posible y, consecuentemente, dejen de fungir como fuentes de contagio para otros individuos.

En este sentido, es claro que las técnicas de biología molecular representan la herramienta diagnóstica más confiable, ya que establecen con exactitud la presencia de los agentes etiológicos en los diversos especímenes clínicos, con base en la detección de segmentos de DNA específicos de cada microorganismo. De hecho, en ciertos laboratorios ya resulta relativamente común el empleo de

sondas¹ comerciales, tanto para confirmar resultados obtenidos mediante metodologías convencionales, como para aplicarlas directamente a las muestras patológicas.

Si bien desde la década de los ochenta han venido destacando los análisis moleculares mediante *Southern-blot* del DNA y *Northern-blot* del RNA, es preciso tomar en cuenta que, en ambos casos, el éxito depende —entre otros factores— de que la muestra en estudio contenga una cantidad relativamente considerable de la secuencia “blanco”, equivalente a la presencia de varios miles de células microbianas.

Es precisamente en este aspecto, que el reciente desarrollo de la “reacción en cadena de la polimerasa (PCR)” ha venido a enriquecer la práctica diagnóstica molecular de las enfermedades infecciosas en los laboratorios de todo el mundo: una vez recolectada y preparada la muestra, ocurre en su seno la rápida multiplicación (amplificación) del DNA perteneciente al agente causal, y los millones de copias obtenidas incrementan notablemente la sensibilidad de cualquier técnica que se elija —a continuación— para lograr la detección correspondiente.

En resumen, el PCR es una reacción bioquímica, catalizada por una enzima, en la cual pequeñas cantidades de cualquier segmento “blanco” del DNA se multiplican logarítmicamente.

Cabe señalar que el PCR no constituye por sí misma un método diagnóstico: en una muestra clínica, el proceso global asociado a la detección del agente causal, con base en el reconocimiento de su DNA, consta de tres pasos:

- a) Procesamiento de la muestra
- b) Amplificación del DNA por PCR
- c) Identificación del DNA amplificado

Evidentemente, la exactitud y precisión del diagnóstico molecular se fundamentan en dos factores generales: 1) la gran consistencia de la secuencia nucleotídica en los segmentos “blanco” de DNA; 2) la posibilidad de establecer en forma rápida, confiable y, actualmente, con mayor sensibilidad, la procedencia de los ácidos nucleicos (ya que éstos presentan segmentos específicos para cada género, especie, tipo y cepa microbianos).

¹ Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

² Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Xochimilco.

Recibido: 27 de junio de 1997; Aceptado: 23 de octubre de 1997.

¹ Fragmentos de DNA obtenidos a partir de agentes patógenos plenamente identificados. Las sondas sólo hibridan (por complementariedad de bases) con cadenas simples de DNA homólogo, lo cual determina la posibilidad de detectar al agente causal en la muestra analizada.

El PCR es relativamente fácil de llevar al cabo, ya que sólo requiere de un tubo de reacción, de algunos reactivos y de una fuente estable de calor. Adicionalmente, el DNA que se desea copiar puede encontrarse puro o constituir una pequeña porción de una mezcla compleja de materiales biológicos.

Una vez efectuada la amplificación, la procedencia del DNA "blanco" se puede establecer mediante diferentes métodos, que comprenden desde una simple electroforesis en gel de agarosa, hasta diversos ensayos inmunogenéticos que incluyen el empleo de sondas marcadas. No obstante, dada su generalizada aceptación para reconocer o confirmar al producto amplificado, la técnica más utilizada continúa siendo la de *Southern-blot*.

El presente trabajo aborda los aspectos más relevantes asociados a los fundamentos del PCR y a su aplicación en el diagnóstico de laboratorio de las enfermedades de origen bacteriano, tratando de que la terminología empleada resulte comprensible para el profesional o estudiante de cualquier rama de la Química.

Muestras clínicas a analizar por PCR y obtención del DNA "blanco"

El reciente desarrollo del PCR ha modificado en todo el mundo los criterios implicados en la práctica diagnóstica de las enfermedades infecciosas. Debido a que el método es rápido, se ha logrado automatizar y sólo requiere de la adición de una "mezcla estándar" al tubo de reacción correspondiente; además, su eficacia es reproducible prácticamente en cualquier tipo de muestras clínicas: biopsias, sangre y diversos productos sanguíneos, semen, secreciones uretrales y vaginales, expectoraciones, aspirados transtraqueales, materia fecal, orina, y los líquidos cefalorraquídeo (LCR), sinovial, pleural, peritoneal y amniótico, entre algunos otros (Podzorski, 1995; Whelen, 1996).

Inicialmente, es necesario efectuar un previo procesamiento de las muestras clínicas, a fin de provocar la lisis del patógeno y, por ende, la liberación de su DNA genómico a amplificar por PCR.

Entre los métodos de lisis bacteriana que se aplican con buenos resultados para realizar el PCR, figuran el de congelamiento-descongelamiento, el de congelamiento-ebullición y el de ebullición con Chelex 100; con este último se logra estabilizar al DNA (dentro del agua que hierve), manteniendo la fuerza iónica del medio pero, sobre todo, se alcanza una mayor efectividad en cuanto a la liberación de los ácidos nucleicos a partir de numerosas bacterias y de algunos quistes de protozoarios (Whelen, 1996).

Cabe señalar que la amplificación de DNA por PCR requiere que exista al menos una molécula intacta del DNA "blanco"; no obstante, cifras mayores aumentan la probabilidad de que el proceso resulte exitoso (Innis, 1995).

La cantidad total de DNA "blanco" utilizado en el PCR es realmente pequeño: de 0.05 a 1.0 µg, intervalo que asegura la detección de una copia única de la secuencia "blanco" presente en la muestra (McPherson, 1995).

Adicionalmente, no es indispensable que la muestra se encuentre altamente purificada, si bien algunas impurezas tales como formaldehído, ácido húmico, agentes quelantes, detergentes y metales pesados pueden impedir la amplificación del DNA "blanco"; bajo tales condiciones resulta conveniente intentar la eliminación de dichos elementos o, por lo menos, su dilución (Innis, 1995).

En caso necesario, el DNA se puede purificar mediante el tratamiento con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, o bien, por la técnica de extracción salina y precipitación con etanol (Innis, 1995; Podzorski, 1995).

Fundamento del PCR

La amplificación de DNA por PCR corresponde a una reacción enzimática ejecutada por alguna DNA polimerasa; esta clase de enzimas cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el 3'-OH en el extremo creciente de la cadena de DNA a elongar (el iniciador) y el grupo 5'-PO₄ del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) entrante (figura 1) (Innis, 1995, Newton, 1995).

La elección de cada nucleótido a incorporar está determinada por el DNA molde, al que el iniciador se ha unido previamente por complementariedad de bases (McPherson, 1995).

La amplificación del DNA se logra mediante ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales presenta tres etapas distintivas de temperatura² (figuras 2 y 3) (Innis, 1995).

- 1) Desnaturalización del DNA molde —entre los 94° y 96°C—.
- 2) Alineamiento de los iniciadores al molde —entre los 42° y 60°C—.
- 3) Extensión (elongación) de los iniciadores por la DNA polimerasa —entre los 60° y 72°C—.

La reacción de amplificación contempla la participación de dos iniciadores (*primers* o cebadores), que se hibridan (se unen por complementariedad de bases) a cadenas opuestas del segmento "blanco"; cada iniciador se orienta de forma tal que la elongación se lleva a cabo a partir de su extremo 3'-OH, a través de la zona delimitada entre ambos iniciadores y hasta la región homóloga al "otro iniciador". Como

² Cada etapa dura apenas entre uno y algunos minutos, por lo cual casi resulta indispensable que el laboratorio cuente con un termociclador; éste permite programar las temperaturas y la duración de los diversos periodos, para todo el proceso.

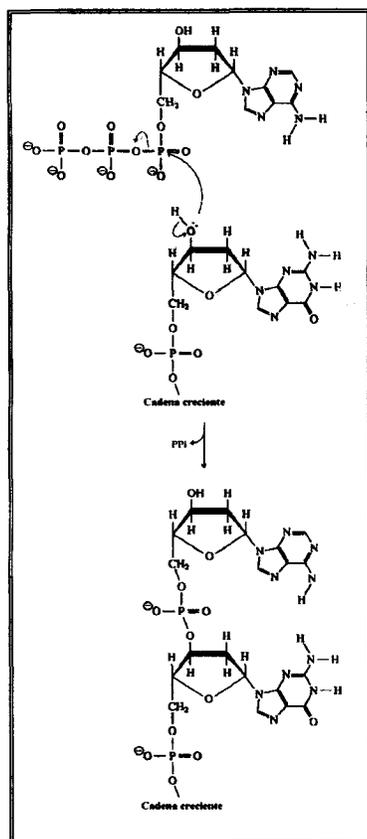


Figura 1. Formación del enlace fosfodiéster mediante la DNA polimerasa (Newton, 1995).

cada producto de la amplificación incluye la secuencia complementaria a la del "otro iniciador", prácticamente todos los productos de cada reacción sirven de molde para el siguiente ciclo del PCR (Newton, 1995).

En la primera etapa del ciclo del PCR, se provoca la desnaturalización del DNA molde, entre los 94° y 96°C. En la segunda etapa, la mezcla de reacción se somete a la temperatura óptima de alineamiento entre el iniciador y su molde (42° a 60°C). Finalmente, en la tercera etapa, la temperatura se modifica a 72°C, que es ligeramente inferior a la óptima de una DNA polimerasa termoestable. De esta manera, los iniciadores se elongarán hasta producir nuevas hebras de DNA, incorporando los dNTPs que correspondan –por complementariedad–, a través de la participación de la enzima (Carleton, 1995; Innis, 1995).

Evidentemente, la hibridación inespecífica de los iniciadores puede conducir a la acumulación de productos inespecíficos o a ausencia de amplificación.

Cabe señalar que la reacción concluye cuando la cantidad de enzima se reduce hasta niveles insuficientes (por la inactivación térmica ocurrida después de cada paso de desnaturalización), pero también gravita el hecho de que la efectividad del alineamiento de los iniciadores va decrecien-

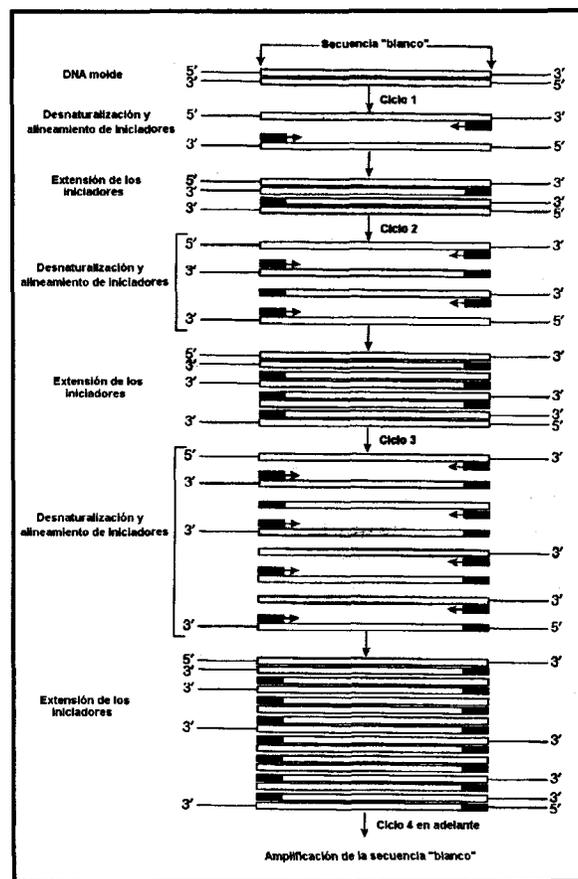


Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa -PCR- (Innis, 1995; Newton, 1995; Whelen, 1996)

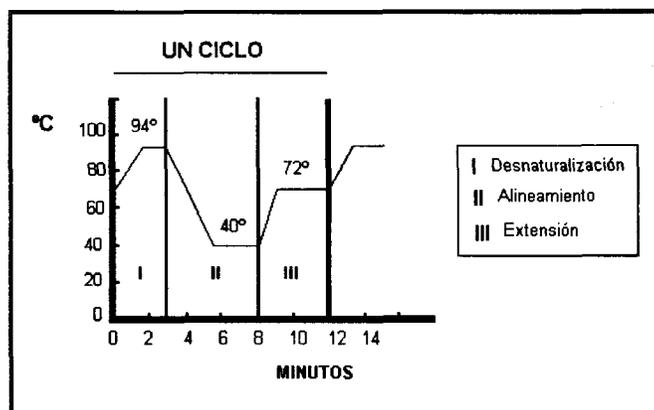


Figura 3. Programa de temperaturas de un termociclador de PCR (Innis, 1995; McPherson, 1995; Podzorski, 1995).

do paulatinamente (al irse disminuyendo su concentración e incrementando en forma exponencial el número de secuencias "blanco") (Innis, 1995).

Principales componentes del PCR

Secuencia "blanco"

Dado que una molécula de DNA bacteriano suele ser relativamente larga, en realidad se busca evidenciar una parte de aquélla cuya secuencia de bases resulte representativa (específica) de la especie en cuestión; en este sentido, es conveniente tomar en cuenta que una secuencia "blanco" óptima presenta una longitud de 150 a 500 pares de bases (bp), aunque segmentos mayores también son susceptibles de amplificarse en forma efectiva (Innis, 1995).

Dado que el PCR es capaz de detectar mínimas cantidades de DNA, es indispensable evitar cualquier riesgo de contaminación con ácidos nucleicos provenientes de ensayos anteriores (Rys, 1993).

Iniciadores de la amplificación (primers)

Los iniciadores son oligonucleótidos que, en condiciones ideales, deben presentar una composición y longitud (de 15 a 25 bp) semejantes, a fin de que sus respectivas temperaturas de fusión (T_f , la temperatura a la cual sólo el 50% del iniciador está separado del DNA molde) sean similares (McPherson, 1995).

La temperatura de fusión (T_f), utilizada para la fase de alineamiento, se calcula con base en el contenido total de GC³ y AT⁴ del iniciador correspondiente, mediante la fórmula (Newton, 1995): $T_f = 2(A + T) + 4(G + C)$.

Los iniciadores no deben ser complementarios entre sí, para evitar la formación de estructuras secundarias; asimismo, es preferible que no presenten series de tres o más G's o C's en el extremo 3' y que su contenido de GC sea similar al del DNA molde (figura 4).

La formación de estructuras secundarias que presentan la forma de "pasador de cabello" (*hairpin*), debidas a hibridaciones intramoleculares ocurridas en algún iniciador, así como la producción de DNA de doble cadena debida a uniones interiniciadores, representan dos de las principales causas de aparición de productos secundarios (inespecíficos), cuyo peso molecular es generalmente bajo (McPherson, 1995).

Dichos "dímeros" pueden fungir por sí mismos como moldes y competir con el DNA "blanco" tanto por la enzima, como por los dNTPs y por los iniciadores, lo que deriva en rendimientos escasos de los productos de amplificación de-

seados. A este respecto, las técnicas de arranque en caliente (*hot start*) del PCR disminuyen o eliminan tales inconvenientes (Innis, 1995; McPherson, 1995).

Por lo regular, los iniciadores se utilizan en niveles de 0.1 a 0.5 μ M, ya que concentraciones mayores suelen promover uniones inadecuadas al DNA molde, provocando la acumulación de productos inespecíficos (McPherson, 1995).

El diseño de iniciadores suele basarse en el empleo de programas comerciales que identifican características críticas de diseño y permiten al investigador encontrar algún par de iniciadores con propiedades conocidas y predictivas. De hecho, aportan datos tales como el tamaño esperado del producto, la temperatura óptima de alineamiento, así como el peso molecular, la localización y secuencia de cada iniciador.

DNA Polimerasa I termoestable

Los protocolos originales del PCR se desarrollaron contemplando el empleo del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (DNA pol I) de *Escherichia coli*; sin embargo, tal enzima no es termoestable y la mayor parte de ella resultaba inactivada durante la fase de desnaturalización, lo que obligaba a añadir otras cantidades antes de que ocurriera la siguiente etapa de alineamiento. Dicha limitación, sumada a la baja temperatura requerida para la elongación, daba lugar a reacciones de baja eficiencia y especificidad (Carleton, 1995; Newton, 1995).

En ese contexto, el reemplazo de la enzima Klenow por una serie de DNA polimerasas termoestables ha venido a representar uno de los avances técnicos de mayor importancia para el PCR. La primera y más utilizada de tales enzimas es la *Taq* DNA polimerasa I (*Taq* pol I), producida por la bacteria termófila Gram-negativa *Thermus aquaticus*. Cabe señalar que el gen estructural que codifica para la síntesis de dicha enzima se ha logrado clonar y secuenciar en forma óptima, por lo cual actualmente no existen razones de peso para prescindir de ella.

La *Taq* pol I altamente purificada tiene una temperatura óptima de 70° a 80°C con una V_{max} próxima a los 180 nucleótidos/segundo/molécula de enzima (nt/s), cifra que supera notablemente a los 16 a 20 nt/s de la *E. coli* DNA pol I (Newton, 1995).

La concentración a la cual se utiliza la *Taq* pol I es de 1.0 a 2.5 unidades, ya que cuando aquélla es muy elevada se pueden acumular productos inespecíficos y, en contraste, cuando es muy baja, suele obtenerse una cantidad insuficiente del producto deseado (Innis, 1995).

Desoxirribonucleótidos

La síntesis de DNA requiere de desoxirribonucleótidos trifosfatados libres (dNTPs); la concentración de cada uno de

³ G = guanina y C = citosina

⁴ A = adenina y T = timina.

ellos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) en el PCR debe ser 200 μM , para lograr una especificidad óptima. En todo caso, es conveniente que los cuatro dNTPs se utilicen en concentraciones aproximadas, a fin de reducir los errores en la incorporación (Innis, 1995; McPherson, 1995).

En un volumen de reacción de 100 μL , basta una concentración 20 μM de cada uno de los dNTPs, para sintetizar 2.6 μg de una secuencia “blanco” de 400-bp (McPherson, 1995).

Otros componentes

Uno de los participantes “secundarios” más importantes del PCR es el ión Mg^{2+} , ya que su participación influye en lo relativo al alineamiento de los iniciadores, a la temperatura de fusión del DNA y a la actividad enzimática de la *Taq* DNA pol I; su proporción óptima en la mezcla de reacción fluctúa entre 0.5 y 4.0 mM. Evidentemente, la presencia de EDTA o de otros agentes quelantes puede disminuir la concentración de este componente (Innis, 1995).

Por otra parte, la solución amortiguadora recomendada para el PCR es la de Tris-Cl, 10 a 50 mM a pH 8.3 a 8.9. Ésta proporciona un adecuado medio de reacción que incrementa la especificidad y el rendimiento de los productos de amplificación (Innis, 1995; McPherson, 1995).

Cuando el DNA molde se encuentra mezclado con numerosas estructuras secundarias, es oportuno incorporar urea, formamida o dimetilsulfóxido al 1 a 10%; finalmente, la adición de albúmina o glicerol incrementa el rendimiento de la reacción de amplificación cuando se trata de fragmentos de DNA molde mayores de 2.5 kbp (Innis, 1995).

Identificación del DNA amplificado

Una de las principales decisiones de quienes emplean el PCR consiste en seleccionar un método adecuado para detectar el producto amplificado dado que, entre los que se encuentran disponibles, existen diferencias muy significativas en términos de sensibilidad, especificidad, fiabilidad, dificultad y costo (Podzorski, 1995).

Como el producto primario del PCR es una molécula dúplex de DNA lineal, de longitud y secuencia definidas, el método de detección ideal debe permitir una determinación precisa del tamaño y de la pureza del producto amplificado (Innis, 1995).

En este sentido, existen técnicas que se basan en el uso de simples geles de agarosa hasta las que contemplan la secuenciación del DNA. A continuación se mencionan tres de las que se emplean con mayor frecuencia:

Electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida

El corrimiento electroforético de los productos de la PCR representa el método empleado más frecuentemente en los laboratorios, ya que aporta resultados relativamente confia-

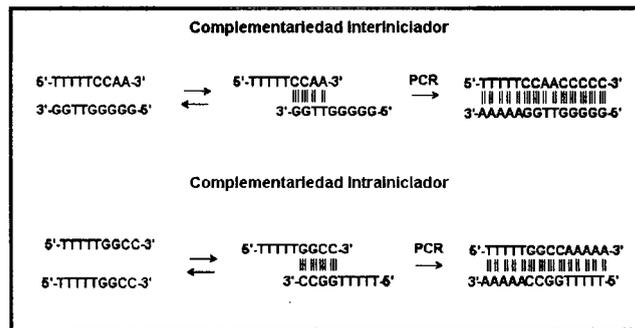


Figura 4. Estructuras secundarias (indeseadas) producidas por los iniciadores (McPherson, 1995).

bles, con una sensibilidad de 1.0 a 5.0 ng de DNA.

El procesamiento simultáneo de marcadores de peso molecular y de controles positivos provenientes de microorganismos caracterizados con anterioridad, permite realizar las comparaciones correspondientes y, consecuentemente, establecer la procedencia del DNA amplificado por PCR (Carleton, 1995; Podzorski, 1995; Whelen, 1996).

Evidentemente, el uso de geles de agarosa a los que se ha incorporado un tinte fluorescente como bromuro de etidio —el cual se intercala entre las bases apiladas del DNA— facilita las lecturas con sólo exponer las placas correspondientes a la luz U.V. Las terminales de la fuente de poder deben conectarse de tal manera que el DNA emigre hacia el ánodo; una vez concluido el corrimiento, el sistema se puede fotografiar, colocándolo en un transiluminador U.V., utilizando filtros rojo o naranja y película de blanco y negro (Carleton, 1995; Podzorski, 1995; Whelen, 1996).

Southern blot

Esta metodología representa una herramienta muy efectiva para establecer el origen del DNA presente en una muestra clínica. Una vez que se ha llevado a cabo la separación de los productos del PCR —mediante electroforesis en gel—, se puede identificar un fragmento específico del DNA, previa transferencia de los diversos segmentos a una membrana de nylon o nitrocelulosa; posteriormente, la secuencia “blanco” se identifica vía su hibridación con una sonda (segmento monocatenario de DNA, de 18 a 50 nucleótidos de largo, proveniente de algún microorganismo plenamente identificado), marcada con algún elemento radioactivo. Después del lavado de la membrana, las dobles cadenas de DNA (constituidas por la sonda marcada y el DNA “problema”), permanecerán unidas a dicho soporte, en tanto que las moléculas monocatenarias se habrán eliminado. El revelado correspondiente se logra mediante la exposición de la membrana a una película de rayos-X (Podzorski, 1995).

Fragmentos polimórficos de restricción con longitudes variables (RFLP)

Otra metodología relacionada con el uso de sondas para identificar especies bacterianas consiste en el denominado "fragmentos polimórficos de restricción con longitudes variables".

La mayoría de los genomas microbianos posee regiones que presentan una variabilidad muy evidente, lo que determina que, en ciertas partes del DNA, las secuencias de los oligonucleótidos varíen no sólo entre una y otra especie bacterianas, sino también, de una cepa a otra (Isobe, 1996; Podzorski, 1995).

Esta variabilidad puede ser demostrada cuando el DNA cromosómico es purificado y se fragmenta en varios segmentos, vía la acción de endonucleasas de restricción, las cuales cortan el DNA en regiones muy específicas, que presentan una determinada secuencia de bases nitrogenadas (tabla 1).

Una vez digerido el DNA con la enzima de restricción en turno, los fragmentos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa; la distancia recorrida en el gel por cualquiera de los segmentos del DNA, puede relacionarse con marcadores de peso molecular.

Cuando el DNA de dos cepas diferentes es digerido por la misma enzima de restricción, y a continuación sus respectivos productos se separan mediante electroforesis, generalmente es fácil establecer diferencias entre ambos conjuntos de bandas. Sin embargo, ocasionalmente dichas diferencias pueden ser muy pequeñas, en cuyo caso se puede recurrir al análisis por *Southern-blot* (figura 5) (Carleton, 1995; Isobe, 1996; Podzorski, 1995).

La aplicación del PCR al diagnóstico de laboratorio de las enfermedades de origen bacteriano

En general, se acepta que el diagnóstico de laboratorio de diversas enfermedades infecciosas se puede establecer de dos maneras: 1) Evidenciando la existencia —a niveles significativos— de anticuerpos séricos dirigidos contra sustancias propias del microorganismo responsable, sean éstas estructurales, funcionales o de desecho; y 2) Detectando al agente causal o a sus antígenos en las muestras provenientes de los tejidos afectados (Podzorski, 1995).

En el primer caso, se obtiene el suero del enfermo y, por lo regular, diluciones de dicho líquido orgánico se enfrentan a concentraciones fijas de antígenos purificados de distribución comercial —pertenecientes a microorganismos plenamente identificados—; bajo tales condiciones, una reacción positiva que persiste hasta diluciones mayores del suero, suele interpretarse como infección activa o de curación reciente, ocasionada por un patógeno íntimamente relacionado con aquél del que se adquirieron comercialmente los antígenos empleados. Lógicamente, el nombre de la técnica seleccionada depende de algunas características: la naturaleza del antígeno (si es soluble o insoluble, e inclusive, si se encuentra libre o unido a algún soporte sólido), la eventual participación de ciertos reveladores (anticuerpos marcados con fluoresceína o con alguna enzima), etcétera. A este respecto, figuran las denominadas reacciones de inmunoprecipitación, aglutinación, coaglutinación, hemaglutinación, inmunofluorescencia, inmunoensayos enzimáticos, etcétera (Whelen, 1996; Podzorski, 1995).

Por lo que se refiere a la detección del agente causal en las muestras provenientes de las regiones anatómicas afecta-

Tabla 1. Secuencias de reconocimiento⁶ de algunas enzimas de restricción

Microorganismo	Nombre de la enzima	Secuencia de reconocimiento
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	G↓AATTC
<i>Escherichia coli</i>	EcoRII	↓CCAGG (secuencia no palindrómica)
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindII	GTPy↓PuAC
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	AAG↓CTT
<i>Bacillus subtilis</i>	BsuRI	GG↓CC
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	T↓CGA

CLAVE: Las flechas indican el sitio en que ocurre el ataque enzimático en cada caso. Pu = cualquier purina. Py = cualquier pirimidina; A = adenina; T = timina; G = guanina; C = citosina. Sólo se muestra la secuencia en dirección 5' → 3'.

⁶ La secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción suele presentar entre 4 y 6 nucleótidos de largo; en una molécula de DNA, generalmente se encuentra un número limitado de fragmentos con dicha secuencia.

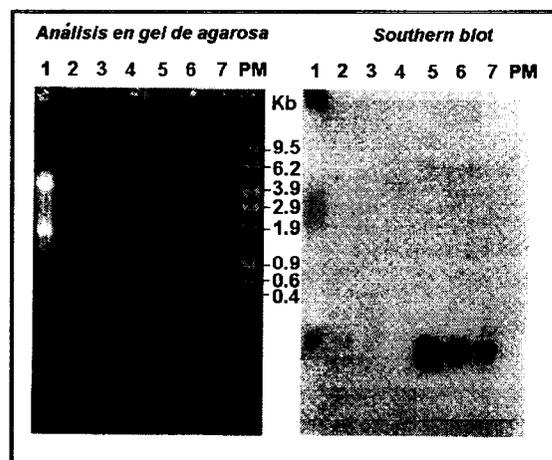


Figura 5. Mapa de restricción obtenido mediante RFLP.

das, una de las actividades tradicionales del laboratorio consiste en analizar al microscopio dichos especímenes (preparando, a partir de ellos, extensiones en fresco o frotis teñidos); ocasionalmente, esta clase de estudios llega a aportar alguna información oportuna pero, con frecuencia, el agente causal no se detecta, ya que suele confundirse (queda enmascarado) entre numerosos integrantes de la microflora habitual del organismo del paciente; por tal motivo, resulta prácticamente indispensable recurrir a otros métodos de identificación más sensibles y confiables.

En realidad, el método clásico consiste en cultivar las muestras, a fin de lograr la reproducción de los agentes infecciosos hasta que formen colonias puras; éstas no sólo se pueden observar y diferenciar en forma presuntiva a simple vista sino que, principalmente, se pueden someter a diversas pruebas bioquímicas hasta identificar al microorganismo. No obstante, lo anterior implica el empleo de diversos medios de crecimiento y la realización de varios subcultivos

(resiembras), lo que se traduce en costos significativos y en periodos relativamente prolongados, durante los cuales se puede incrementar la gravedad del paciente (Podzorski, 1996).

Evidentemente, las pruebas inmunológicas también se pueden utilizar para identificar al patógeno (y no sólo para detectar y cuantificar anticuerpos en el suero del enfermo), cuando se cuenta con sueros hiperinmunes purificados —de distribución comercial— dirigidos contra determinados agentes microbianos. Esta alternativa diagnóstica rápida, empleada de manera independiente o complementaria —en referencia al cultivo—, incluye la posibilidad de que el químico obtenga resultados “falsos positivos”, debido a antigenuidad cruzada entre diferentes microorganismos.

En conclusión, el PCR y la amplia gama de técnicas moleculares relacionadas con ella, aportan al diagnóstico bacteriológico una mayor sensibilidad y confiabilidad (exactitud y precisión), así como una incomparable rapidez. La

Tabla 2. Características y tiempos asociados al PCR y al diagnóstico tradicional de algunas enfermedades infecciosas.

Bacterias/afecciones	DIAGNÓSTICO TRADICIONAL EN EL LABORATORIO DE INFECTOLOGÍA		AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)		
	Estudios involucrados	Tiempo prom.	Segmento “blanco”	Tiempo promedio	referencia
<i>Bordetella pertussis</i> (tosferina)	Cultivo y aislamiento en Bordet-Gengou; las colonias se someten a reacciones de quellung con sueros anti-K7 y anti-K1.	72 h	IS480	2.2 h: 6.5 min/ciclo, durante 20 ciclos	1
<i>Clostridium difficile</i> (colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos)	Cultivo anaerobio y aislamiento en TCFA; las colonias se someten a pruebas de ureasa, reducción de nitratos, Voges Proskauer, lipasa, lecitinasa, gelatinasa. Sobrenadantes de las evacuaciones se enfrentan a las antitoxinas A y B, cuyos anticuerpos se encuentran adsorbidos a partículas de látex.	72 h	gen que codifica la síntesis de la toxina B	1.7 h: 3.0 min/ciclo, durante 35 ciclos	22
<i>Escherichia coli</i> (septicemia, infecciones urinarias, meningitis, etcétera)	Cultivo y aislamiento en EMB o Endo; las colonias se someten a pruebas bioquímicas: fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y manitol, citrato, indol, movilidad, ácido sulfhídrico, ureasa.	48 h	lacZ lamB	2.3 h: 4.0 min/ciclo, durante 35 ciclos	2
ECET: <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (diarreas agudas voluminosas)	Cultivo y aislamiento en EMB o Endo; las colonias se propagan en gelosa sangre y se someten a pruebas de aglutinación con sueros dirigidos contra el antígeno O.	50 h	gen que codifica la síntesis de la toxina LT1	2.5 h: 5.0 min/ciclo, durante 30 ciclos	19
ECEH: <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (graves diarreas sanguinolentas)	Cultivo y aislamiento en EMB o Endo; las colonias se propagan en gelosa sangre y se someten a pruebas de aglutinación con sueros dirigidos contra el antígeno O.		gen que codifica la síntesis de la toxina Shiga-like 1 (st-1A)	2.5 h: 5.0 min/ciclo, durante 30 ciclos	8
<i>Haemophilus influenzae</i> (meningitis, septicemia, carditis, neumonía, etcétera)	Cultivo y aislamiento en Levinthal y Fildes; las colonias se someten a auxogramas para factores X y V y a pruebas de quellung y coagulación.	48 h		1.7 h: 4.0 min/ciclo, durante 25 ciclos	17

Continúa en la siguiente página...

Tabla 2. Características y tiempos asociados al PCR y al diagnóstico tradicional de algunas enfermedades infecciosas (continuación)

	DIAGNÓSTICO TRADICIONAL EN EL LABORATORIO DE INFECTOLOGÍA		AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)		
<i>Helicobacter pylori</i> (gastritis, duodenitis, úlceras gástricas y duodenales, etcétera)	Biopsias de los tejidos afectados (obtenidas por endoscopia) se someten a tinciones de Giemsa y a la prueba "rápida" de la urea; el enfermo se somete a la prueba respiratoria de ureasa (previa ingestión de urea ¹³ C); detección de anticuerpos séricos anti- <i>H. pylori</i> .	12-24 h	genes que codifican la síntesis de ureasa A y/o proteína 16S rRNA	2.3 h: 4.0 min/ciclo, durante 35 ciclos	11
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (tuberculosis)	Cultivo y aislamiento en Lowenstein Jensen; las colonias se someten a pruebas bioquímicas: acumulación de niacina, Desarrollo en presencia de T ₂ H, arilsulfatasa, catalasa, reducción de nitrosos.	25 días	diversos genes seleccionados al azar, amplificados por RAPD	1.7 h: 2.5 min/ciclo, durante 40 ciclos	13
<i>Neisseria meningitidis</i> (meningitis, septicemia)	Cultivo y aislamiento en Thayer Martin; las colonias se someten a pruebas de la citocromo oxidasa y de oxidación de carbohidratos: glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y fructosa.	96 h	gen que codifica la síntesis de la proteína 16S rRNA	1.7 h: 4.0 min/ciclo, durante 25 ciclos	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (infecciones nosocomiales, septicemia, infecciones en quemaduras, etcétera)	Cultivo y aislamiento en gelosa sangre y Mac Conkey; las colonias se someten a pruebas bioquímicas: oxidasa, fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y manitol, ureasa, movilidad, indol, ácido sulfhídrico.	48 h	gen que codifica la síntesis de la exotoxina A (ETA)	1.5 h: 3.0 min/ciclo, durante 30 ciclos	10
<i>Salmonella typhi</i> (fiebre tifoidea)	Enriquecimiento en caldos tetrionato y selenito; cultivo y aislamiento en gelosa sangre y Mac Conkey; las colonias se someten a pruebas bioquímicas: fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y manitol, ureasa, movilidad, indol, ácido sulfhídrico.	60 h	gen que codifica la síntesis de flagelina	3.7 h: 5.5 min/ciclo, durante 40 ciclos	20
<i>Shigella spp</i> (disentería bacilar)	Cultivo y aislamiento en XLD, SS y Mac Conkey; las colonias se someten a pruebas bioquímicas: fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y manitol, ureasa, movilidad, indol, ácido sulfhídrico.	48 h	plásmido que codifica la síntesis de antígeno invasivo H (IpaH)	2.3 h: 4.0 min/ciclo, durante 35 ciclos	8
<i>Staphylococcus aureus</i> (infecciones nosocomiales, etcétera)	Cultivo y aislamiento en S110 y manitol sal agar; las colonias se someten a la prueba de la coagulasa.	48 h	gen que codifica la síntesis de enterotoxina A (sea)	2.1 h: 5.0 min/ciclo durante 25 ciclos	9
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (neumonía, meningitis, septicemia, etcétera)	Cultivo y aislamiento en gelosa sangre de camero; las colonias se someten a pruebas de susceptibilidad a 5 U de optoquina y/o a reacciones de quellung.	96 h	gen que codifica la síntesis de autolisina (lyt)	3.5 h: 6.0 min/ciclo, durante 35 ciclos	5
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Enfermedades de transmisión sexual, tracoma, conjuntivitis, etcétera)	Detección de antígeno clamidial por cultivo en células McCoy o HeLa, o por inmunofluorescencia indirecta, ensayo inmunoenzimático, etcétera.	12-72 h	gen que codifica la síntesis de la proteína 16S rRNA	4 h: 6.0 min/ciclo, durante 40 ciclos	15
<i>Vibrio cholerae</i> O1 (cólera)	Enriquecimiento en caldo peptonado alcalino; cultivo y aislamiento en TCBS; las colonias se someten a pruebas de aglutinación con suero antiO1 y a pruebas de las oxidasas, Voges Proskauer, etc.	56 h	gen que codifica la síntesis de la toxina colérica (ctx)	1.7 h: 4.0 min/ciclo, durante 25 ciclos	4

tabla 2 resume las actividades y tiempos asociados al diagnóstico tradicional de varias enfermedades de origen bacteriano, y compara estos últimos con los requeridos por el PCR; asimismo, señala los iniciadores de distribución comercial y los segmentos "blanco" a amplificar, por tratarse de fragmentos específicos del microorganismo en cuestión. ■

Referencias bibliográficas

- Bäckman, A., Johansson, B., Olcén, P., Nested PCR optimized for detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal samples, *J Clin Microbiol.* 32(10), 2544-2548 (1994).
- Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., Atlas, R.M., Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes, *Appl Environ Microbiol.* 56(2), 307-314 (1990).
- Carleton, S., The PCR: applications in genomic analysis, "En" *Human chromosomes: principles and techniques*, Verma R. & Babu A. Eds. Mc Graw Hill, 2nd. ed., U.S.A. (1995).
- Fields, P., Popovic, T., Wachsmuth, K., Olsvik, O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 strains from the Latin America cholera epidemic, *J Clin Microbiol.* 30(8), 2118-2121 (1992).
- Hassan-King, M., Baldeh, I., Secka, O., Falade, A., Greenwood, B., Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR, *J Clin Microbiol.* 32(7), 1721-1724 (1994).
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., PCR Strategies, Academic Press Inc., San Diego, California (1995).
- Isobe, K., Aoki, K., Itoh, N., Ohno, S., Takashima, I., Hashimoto, N., Serotyping of *Chlamydia trachomatis* from inclusion conjunctivitis by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis, *Jpn J Ophthalmol.* 40(2), 279-285 (1996).
- Jackson, M.P., Detection of shiga toxin-producing *Shigella dysenteriae* Type 1 and *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction with incorporation of digoxigenin-11-dUTP, *J Clin Microbiol.* 29(9), 1910-1914 (1991).
- Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R., Rozee, K.R., Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol.* 29(3), 426-430 (1991).
- Khan, A.A., Cerniglia, C.E., Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR, *Appl Environ Microbiol.* 60(10), 3739 - 3745 (1994).
- Lin, S.Y., Jeng, Y.S., Wang, C.K., Ko, F.T., Lin, K.Y., Wang, C.S., Liu, J.D., Chen, P.H., Chang, J.G., Polymerase chain reaction diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal diseases: comparison with culture and histopathological examinations, *J Gastroenterol Hepatol.* 11(3), 286-289 (1996).
- McPherson, M.J., Hames, B.D., PCR2: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, England (1995).
- Monno, L., Angarano, G., Romanelli, C., Gianelli, A., Apicce, A., Carbonara, S., Costa, D., Pastore, G., Polymerase chain reaction for non-invasive diagnosis of brain mass lesions caused by *Mycobacterium tuberculosis*: report of five cases in human immunodeficiency virus-positive subjects, *Tuber Lung Dis.* 77(3), 280-284. (1996).
- Newton, C.R., PCR: Essential data series, John Wiley and Sons Inc., New York, NY (1995).
- Olafsson, J.H., Davidsson, S., Karlsson, S.M., Pálsdóttir, R., Steingrímsson, O., Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infection in high-risk females with PCR on first void urine, *Acta Derm Venereol.* 76(3), 226-227 (1996).
- Podzorski, R.P., Persing, D.H., Molecular detection and identification of microorganisms "En" *Manual of Clinical Microbiology*, 6th edition, Murray, P.R. et al (Eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1995): 130-157.
- Radström, P., Bäckman, A., Qian, N., Kragstjerg, P., Pahlso, C., Olcén, P., Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococci* using a seminested PCR strategy, *J Clin Microbiol.* 32(11), 2738-2744 (1994).
- Rys, P.N., Persing, D.H., Preventing false positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products, *J Clin Microbiol.* 31(9), 2356-2360 (1993).
- Schultsz, C., Pool, G.J., Ketel, R., Wever, B., Speelman P., Dankert, J., Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR, *J Clin Microbiol.* 32(10), 2393-2397 (1994).
- Song, J., Cho, H., Park, M.Y., Sun Na, D., Moon, H.B., Hyun, P.C., Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol.* 31(6), 1439-1143 (1993).
- Whelen, A.C., Persing, D.H., The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory, *Annu Rev Microbiol.* 50, 349-373 (1996).
- Wolfhagen, M.J.H.M., Fluit, A.C., Torensma, R., Poppelier, M.J.J.G., Verhoef, J., Rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile* in fecal samples by magnetic immuno PCR assay, *J Clin Microbiol.* 32(7), 1629-1633 (1994).