

Utilidad diagnóstica de la detección de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa realizada en tiempo real

M.^a Gema Codina-Grau y M.^a Teresa Tórtola-Fernández

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. España.

Las primeras técnicas genéticas utilizadas en el diagnóstico microbiológico se basaban en hibridación con sondas de ADN. Aunque de elevada especificidad, en general su sensibilidad no es adecuada. Una excepción la constituyen aquellos procesos que suelen cursar con carga microbiana elevada, como el caso de la infección cervical por papilomavirus, en la que la técnica de captura de híbridos continúa siendo de referencia.

La estrategia más utilizada para aumentar la sensibilidad se basa en crear múltiples copias de un fragmento del genoma. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) supuso un gran avance y permitió introducir la biología molecular de forma generalizada en los laboratorios asistenciales. Se trata de una reacción enzimática sencilla, rápida y susceptible de ser automatizada. El hecho que complica y alarga extraordinariamente el proceso es la visualización del producto una vez amplificado, que debe hacerse por hibridación en solución o en fase sólida (*southern blot*). De esta manera, y según nuestra experiencia, se tarda entre 2 a 4 días en poder informar un resultado, y se necesita disponer de personal altamente especializado y de un espacio suficiente para poder separar varias áreas de trabajo con la finalidad de evitar la temible contaminación por ADN sintetizado con anterioridad (amplicones).

La mayoría de estos inconvenientes se han solucionado con la introducción de la PCR realizada en tiempo real (PCR-RT), que elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia de la PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación de ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con PCR-RT esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. Existe una amplia oferta de aparatos en el mercado. La mayoría pueden trabajar con las diversas opciones de marcado fluorescente y son "abiertos", es decir, permiten programar las condiciones de amplificación y lectura de forma que su uso no queda limitado a unos reactivos determinados.

La incorporación de fluorescencia al proceso de PCR se puede hacer de muy diversas maneras, pero las más utilizadas son colorantes intercalados o bien sondas marcadas. La modalidad más sencilla y económica, si bien la menos específica, es el colorante SYBR Green. Las sondas fluorescentes más usadas son de tres tipos: sondas con actividad 5' nucleasa (TaqMan), *molecular beacons* y sondas FRET. Las tres se pueden aplicar en microbiología clínica, aunque las sondas FRET son conceptualmente las más complejas.

Cuando nos planteamos implementar este tipo de tecnología en un laboratorio, podemos recurrir a dos fuentes para obtener los reactivos: preparados por nosotros o bien comerciales en forma de *kit*. Con un poco de experiencia, la primera opción es relativamente sencilla y encontramos numerosos fabricantes que nos preparan el material que les indiquemos ("a la carta"). En este caso, es habitual optar por la tecnología menos complicada, como los colorantes SYBR Green o las sondas Taqman.

Actualmente, ya hay disponibles en el mercado numerosos equipos preparados que nos permiten disponer de los protocolos optimizados y de certificación de calidad. Estos *kits* comerciales son considerablemente más caros, y es habitual que cubran únicamente las técnicas que generan un mayor número de determinaciones en la práctica clínica: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis o citomegalovirus (CMV). Por el contrario, los métodos comerciales nos ofrecen las ventajas del control en su producción y gran simplicidad en su realización.

Las indicaciones de la PCR-RT diagnóstica son en esencia las mismas que con la PCR convencional: microorganismos de lento crecimiento o de difícil aislamiento. A ellas, podríamos añadir aquellos procesos que por su gravedad puedan beneficiarse especialmente de un diagnóstico rápido. Dentro del campo de la bacteriología, nos gustaría destacar la meningitis (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*)¹ y las infecciones respiratorias (*Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*)². El diagnóstico por PCR ha sido tradicionalmente de gran utilidad en virología. Es de especial interés en meningoencefalitis (virus del herpes simple³, virus varicela-zóster³, enterovirus⁴) o cuantificación de virus capaces de establecer latencia (CMV⁵, virus Epstein-Barr⁶ y virus herpes 6³).

La obtención de resultados durante la fase exponencial de la síntesis de ADN implica que la PCR-RT es el método más preciso de que disponemos para cuantificar. A pesar de ello, debemos señalar varias limitaciones del procedimiento. En el momento actual no existe un acuerdo inter-

Correspondencia: Dra. M.G. Codina-Grau.
Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Vall d'Hebron.
P.^o Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. España.
Correo electrónico: mgcodina@vhebron.net

Manuscrito recibido el 24-8-2006; aceptado el 6-9-2006.

nacional sobre puntos de corte para valoración de carga viral. Como es conocido, éstos deben establecerse teniendo en cuenta varios parámetros, dependiendo del tipo de microorganismo, del paciente (tipo y grado de inmunodepresión), o de la técnica. A pesar de que nos encontramos en una fase en que se deben realizar estudios que conduzcan a la normalización de los procedimientos, desde la recepción de muestra hasta la validación facultativa, consideramos que las técnicas que acabamos de señalar deberían introducirse en la sistemática asistencial.

En este número de *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* se presenta un estudio sobre la detección de CMV en plasma utilizando SYBR Green I como señal de amplificación⁷. Los autores ponen a punto un método no comercial, comparando los resultados con otra técnica de PCR-RT que utiliza sondas FRET, y con antigenemia clásica. Estudian pacientes inmunodeprimidos con y sin sospecha clínica de enfermedad, y personas sanas. El sistema propuesto por ellos es rápido, económico y similar a las técnicas que consideran de referencia. Destacamos, sin embargo, la dificultad ya apuntada anteriormente de generalizar su uso en otros centros hospitalarios por cuanto la preparación de todos los materiales, incluso de los calibradores, es a cuenta de cada laboratorio. Remarcamos una vez más la gran importancia de la estandarización, para que técnicas como la propuesta puedan aplicarse en asistencia y los resultados obtenidos por diferentes centros sean comparables.

Si queremos introducir la PCR-RT en un laboratorio, debemos considerar algunos aspectos prácticos. Se trata de una tecnología mucho más sencilla de realizar que la PCR convencional, de manera que con el mismo personal se puede asumir más carga de trabajo, y los resultados se informan el mismo día de recepción de la muestra.

Debido a que los tubos que contienen el ADN amplificado ya no se tienen que volver a abrir, prácticamente se elimina la contaminación por amplicones. No es necesario disponer de gran infraestructura con sistemas de ventilación específicos y ambientes separados de forma absoluta. Por ello, es factible su adaptación a laboratorios pequeños.

Actualmente ya podemos encontrar en el mercado sistemas que automatizan simultáneamente la preparación de muestra y la amplificación con una manipulación realmente mínima, de forma que pueden utilizarse en laboratorios de urgencias. Es habitual que en esta situación se

cuenta con poco personal y se nos pida una respuesta rápida. La PCR-RT con preparación de muestra simultánea es una opción muy atractiva, y el principal inconveniente actualmente es su precio elevado.

Por último, quisiéramos señalar que, a pesar de la simplicidad técnica, la PCR-RT comporta similar complejidad conceptual que la convencional. El haber trabajado durante la etapa de la PCR clásica, ardua en numerosas ocasiones, proporciona un bagaje valioso cuando debemos utilizar un método aparentemente más sencillo pero que nos va a plantear así mismo problemas técnicos y diagnósticos. Aunque es posible pasar directamente del cultivo a la PCR-RT, este proceso se realizará con mayor seguridad si podemos contar con la ayuda de profesionales con experiencia.

Agradecimientos

Muy especialmente al doctor Guillermo Prats Pastor por su estímulo, guía y confianza.

Bibliografía

1. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1553-8.
2. Welti M, Jaton K, Altwegg M, Sali R, Wenger A, Bille J. Development of multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;45:85-95.
3. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartner R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5189-98.
4. Verstrepen WA, Bruynseels P, Mertens AH. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol*. 2002;25:S39-S43.
5. Hernando S, Folgueira L, Lumbreras C, San Juan R, Maldonado S, Prieto C, et al. Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplant Proc*. 2005;37:4094-6.
6. Ruiz G, Pena P, De Ory F, Echevarría JE. Comparison of commercial real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus DNA. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2053-7.
7. Varela-Ledo E, Romero-Yuste S, Ordóñez-Barbosa P, Romero-Jung P, Prieto-Rodríguez E, Aguilera-Guirao A, et al. Detección de ADN de CMV en plasma mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR-Green I como señal de amplificación. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:541-5.