

# El futuro es la (micro)biología molecular

Emilio Pérez-Trallero

Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián. España.

Hasta finales de la década de 1980 la biología molecular no obtuvo un protagonismo digno de ser resaltado en el campo de la microbiología clínica. Desde entonces, y con movimientos ondulantes de euforia y decepción, llegamos a la segunda mitad de la década de 1990. A partir de esa fecha el enorme potencial de la biología molecular para el desarrollo de la microbiología clínica y de la medicina en general se hizo evidente. La versatilidad y elevada capacidad diagnóstica que podrá ser obtenida por el uso de la genética molecular ayudada por la bioinformática hacen de la biología molecular uno de los instrumentos imprescindibles para nuestro desarrollo. El saber adaptar los procedimientos del futuro sin perder el factor humano que los modula, traduce y enriquece, será el reto definitivo de nuestra especialidad de microbiología clínica.

**Palabras clave:** Biología molecular. Diagnóstico molecular. Genética molecular.

The future is molecular (micro)biology

Until the end of the decade of the 1980's molecular biology did not obtain a significance worthy of standing out in the field of clinical microbiology. From then on and with oscillating movements ranging from euphoria to deception we arrived to the second half of the decade of the 1990's. Since then the enormous potential of molecular biology for the development of clinical microbiology and of medicine in general became evident. The versatility and high diagnostic capacity that will be able to be obtained by the use of genetics helped by bioinformatics make molecular biology one of the indispensable instruments for its progression. Knowing how to adapt the procedures of the future without losing the human factor that modulates, translates and enriches them will be the definitive challenge of our speciality of Clinical Microbiology.

**Key words:** Molecular biology. Molecular diagnostic. Molecular genetics.

## La reacción en cadena se ha desencadenado

Cuando en una sala del edificio del Insalud en Madrid, Rogelio Martín y Evelio Perea me transmitieron la invitación de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) para participar en este simposio, mi respuesta fue rápida: el futuro es la [micro]biología molecular. Estaba y estoy convencido que el futuro se llenará de más reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), secuencias y *microchips*, aunque las obligadas incursiones en actividades burocráticas (acreditación, adaptación al mercado, etc.) distraigan momentáneamente nuestra percepción o agoten nuestra necesidad de cambio.

Es evidente que una reacción "molecular" se puso en marcha hace ya varios años. La escasa energía generada en un principio hizo pensar a más de un observador que la reacción terminaría extinguiéndose. Hoy ya genera suficiente energía para autoalimentarse y acelerar la reacción. Aceleración que es casi vertiginosa en los últimos 2 años.

## Un cercano pasado

Hasta la década de 1980, la prácticamente única actividad observada en el campo de la (micro)biología molecular era la de los taxonomistas, algo demasiado alejado de la práctica clínica para ser tenido en cuenta. A partir de entonces aparecieron las primeras irrupciones de la biología molecular en la microbiología clínica. En un principio con trabajos que obtenían tímidos resultados y requerían gran movilización de medios, pero que ya permitían intuir el camino del futuro; entre ellos destacan artículos sobre hibridación utilizados para la detección de microorganismos en el lugar de la infección<sup>1,2</sup> y sobre *fingerprinting* para mejorar la caracterización epidemiológica de microorganismos previamente identificados por métodos tradicionales<sup>3,4</sup>. No obstante, hasta la introducción de PCR la repercusión de la biología molecular en nuestra especialidad fue escasa. Su inicio puede constatarse analizando el contenido de las dos revistas más emblemáticas para nuestro colectivo: *Journal of Clinical Microbiology* (JCM) y *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (EIMC). En JCM los primeros artículos sobre PCR aparecieron durante 1989 con apenas 9 artículos en todo el año, aunque fueron más de 40 los artículos publicados durante 1990 (tabla 1). Que me conste, los primeros trabajos sobre biología molecular aparecidos en la revista EIMC trataban de sondas de hibridación<sup>5-7</sup>. Posteriormente aparecieron los artículos que trataban de la aplicación de la PCR a la clínica, siendo los debutantes los equipos de Juan García de Lomas<sup>8,9</sup> y Ramón Cisterna<sup>10</sup>. También deseo destacar que en el verano de 1988 Guillermo Prats, con su perspicacia habitual, ya citaba entre las técnicas del futuro a las sondas de hibridación y la PCR<sup>11</sup>.

Correspondencia: Dr. E. Pérez-Trallero.  
Servicio de Microbiología. Hospital Donostia.  
Pº Dr. Beguiristain, s/n. 20014 San Sebastián. España.  
Correo electrónico: mikrobiol@terra.es

TABLA 1. Algunos ejemplos de la detección de microorganismos en muestras clínicas por PCR aparecidas en la revista *Journal of Clinical Microbiology* (1989-1990)

Agente infeccioso	Año y mes publicación	Volumen y páginas
<i>Leptospira</i>	1989 octubre	27:2258-62
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1989 noviembre	27:2492-6
<i>Rickettsia rickettsii</i>	1989 diciembre	27:2866-8
Parvovirus	1989 diciembre	27:2647-51
Papillomavirus	1989 diciembre	27:2660-5
VIH	1990 enero	28:16-9
Rotavirus	1990 febrero	28:276-82
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1990 marzo	28:513-8
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1990 marzo	28:566-72
Herpesvirus 6 humano	1990 mayo	28:970-4
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1990 junio	28:1254-60

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

En esos primeros años, casi todos compartimos la pasión y posterior desilusión de lo que pareció un amor de verano. Si la PCR era capaz de amplificar en miles o millones el número de copias de una cadena y esta amplificación era tan específica como lo fuese la propia cadena, debería tener resuelto el problema de la sensibilidad y especificidad en la prueba diagnóstica. La práctica en esos primeros años nos mostró que ni lo uno ni lo otro, resultando que detectar el ácido nucleico de un microorganismo en una muestra era habitualmente menos sensible que un cultivo tradicional, era más caro y con frecuencia podía dar un resultado erróneo ("ya te digo", un auténtico amor de verano). Esa época era tiempo de trincheras: ni la PCR nos facilitaba las cosas, ni los paneles de identificación automática ahorran personal, ni las microplacas de concentración inhibitoria mínima (CIM) parecían aventajar a los resultados de sensibilidad obtenidos con la difusión en disco. No obstante, la reacción continuaba. En julio de 1995, Smith et al<sup>12</sup> publicaron la secuencia completa del genoma de *Haemophilus influenzae* y posteriormente se publicó la de *Streptococcus pneumoniae*<sup>13</sup>. En el tiempo transcurrido entre 1995 y la celebración de este simposio (6 veranos), se completó la secuencia del genoma de casi 40 especies bacterianas y no es aventurado pensar que el ritmo de descubrimientos se acelerará en los próximos años, pudiendo disponer en breve de la secuencia completa del genoma de la totalidad de los patógenos importantes en medicina humana. El cambio de denominación que en 1997 llevó a cabo la American Society for Microbiology con su revista *Microbiology Reviews*, que pasó a llamarse *Microbiology and Molecular Biology Reviews* puede considerarse como un signo de los tiempos.

## El presente: de la reacción en cadena a la secuenciación, pasando por los campos pulsados

Sería erróneo interpretar el presente de la biología molecular en la clínica microbiológica según su accesibilidad potencial. Ni todo lo teóricamente disponible lo está, ni mucho de lo disponible ha mostrado su eficacia. Por más amplio que parezca el futuro, la experiencia nos aconseja ceñirnos al presente y para poder hablar con propiedad del

presente parece adecuado aceptar la sugerencia de los editores y analizar con breves ejemplos lo que actualmente hacemos. Asumo *a priori* que el lector es consciente de que la experiencia de mi laboratorio no puede servir a otros más que en apuntar las tendencias de una disciplina tan dinámica como la microbiología clínica. El servicio de microbiología del Hospital Donostia, donde trabajo, realiza la rutina microbiológica de 3 hospitales, y la mayor parte de la rutina de la provincia generada en el medio ambulatorio, sirve de apoyo a los hospitales comarcales de Guipúzcoa, colabora con el Departamento de Salud Pública en epidemiología infecciosa y actúa como referencia en la comunidad autónoma en áreas concretas como por ejemplo la gripe. En este laboratorio, la sección de biología molecular es la que ha sido objeto en los últimos 5 años de mayores inversiones en material inventariable y donde se han generado los nuevos puestos de personal (técnicos de laboratorio y especialmente facultativos). En esta sección se genera gran parte del trabajo de investigación, el cual con frecuencia es incorporado a la rutina de trabajo en breve plazo, al ser investigación aplicada lo que mayoritariamente se realiza en este servicio de microbiología. En epidemiología de brotes de infección las técnicas moleculares constituyen actualmente la base de las determinaciones y, con frecuencia, una vez detectado el microorganismo, las únicas determinaciones utilizadas. Un cambio espectacular con lo realizado apenas hace 5 años, cuando el fenotipo era la base, si no el único modo, de intentar la caracterización de un brote. Desde identificar una fuente de infección en un pequeño brote de *Legionella* a relacionar entre sí unos casos de parotiditis en sujetos vacunados, se pudo realizar gracias a la genética molecular. En el primer caso fue preciso aislar el microorganismo en los pacientes y en las muestras ambientales para una vez identificados por métodos tradicionales (*Legionella pneumophila* serogrupo 1), comprobar la similitud de sus genotipos por electroforesis en geles de campos pulsantes (PFGE). En el segundo caso, aunque se aisló el virus en cultivo, esto no hubiese sido imprescindible, ya que la detección mediante PCR del gen SH (*small hydrophobic*) y la posterior secuenciación de sus amplicones permitió caracterizar los virus y además establecer su pertenencia a un genotipo de virus salvaje previamente conocido. En la identificación de microorganismos todavía son escasas las pruebas por biología molecular que actualmente están comercializadas. No obstante, la agilidad ofrecida por el acceso electrónico a través de Internet de la información necesaria para montar una técnica novedosa, así como la rapidez en obtener los *primers*, enzimas de restricción u otro material necesario, compensan esta falta del comercio. Actualmente un gran número de pruebas moleculares no comercializadas son fácilmente utilizables por alguien con mínima experiencia en este campo.

Su introducción en el trabajo habitual soluciona con eficacia problemas hasta entonces no resueltos o mejora la manera de resolverlos con los métodos previamente existentes. En nuestro laboratorio, la identificación de las especies de *Nocardia* y otros *Actinomycetes* aerobios se realizan tras el análisis con endonucleasas de restricción mediante PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), habiendo mostrado su utilidad en más de 100 aislamientos clínicos de *Nocardia*. Algunas técnicas diagnósticas resultan más rápidas, más sensibles y también más económicas utilizando biología molecular que métodos

tradicionales, incluyendo entre estos últimos la detección de antígeno por métodos inmunológicos, novedosos medios de cultivo o modernas técnicas de concentración. Como ejemplo valga la alta sensibilidad y especificidad obtenida con la PCR para detectar y caracterizar la especie de *Plasmodium* en la sangre de sujetos con baja parasitación. A nuestro juicio, la PCR es la mejor alternativa a la microscopía en esta poco común determinación, resultándonos a un coste inferior a otras alternativas ya comercializadas. Las técnicas ya comercializadas tienen enormes ventajas sobre “las caseras” (homologación, simplicidad, etc.) y un gran inconveniente, su elevado coste comparativo. Entre las técnicas de biología molecular ya comercializadas destacan las que detectan y cuantifican virus de alta prevalencia en medicina humana como por ejemplo el VIH, el virus de la hepatitis C o el citomegalovirus. Habitualmente estas pruebas son realizadas en las unidades o secciones de la clásica “serología”, al compartir con ellas el uso de grandes aparatos y un alto nivel de automatización. La modificación de los hábitos diagnósticos mediatizada por la imposición de la tecnología o del mercado, así como el “quién y en dónde” se realizan las pruebas diagnósticas no es tema baladí que requiere ser debatido y previsto para que el futuro no nos sorprenda más de lo necesario. Pero esto es casi hablar del futuro y antes quisiera terminar con otro ejemplo de lo que actualmente hacemos mediante la biología molecular, refiriéndome al estudio de los mecanismos de resistencia antimicrobiana. La biología molecular permite actualmente llevar a cabo estudios de epidemiología de la resistencia antimicrobiana que apenas hace unos años nos atrevíamos a plantear. Si actualmente puede constatar que el aumento de la resistencia en una especie bacteriana determinada se debe a la difusión de un único clon o de múltiples clones, es únicamente debido a la biología molecular. De igual modo, el conocer si estos clones llevan un integrón con capacidad de incorporar nuevos genes determinantes de resistencia, o si una especie bacteriana puede intercambiar con otra especie estos determinantes de resistencia antimicrobiana, se lo debemos a la biología molecular.

Las ventajas de estas técnicas no están exentas de problemas. Como todo, en manos imprudentes pueden dar resultados erróneos. Cegados por lo novedoso algunos olvidan que sensibilidad y especificidad no siempre van unidas y que cierta similitud en determinados genes no equivale a identidad. No es lo mismo detectar un gen de resistencia por PCR que detectarlo e hibridarlo o que detectarlo y secuenciarlo. Por otra parte, no es igual un resultado de PCR negativo cuando se ha comprobado que en cada muestra ha habido ADN amplificado (control de extracción con un *primer* universal) que cuando este control no se ha realizado. Entre las incorporaciones más recientes del mercado a la biología molecular destaca por su comodidad y rapidez la PCR a tiempo real.

## El futuro

*Why should I care about posterity? What's posterity ever done for me?*

Groucho Marx, 1895-1977

Probablemente lo más sensato sería mantenerse alejado de lo especulativo, pero tratar de prever lo que puede suceder es un ejercicio, si no ya imprescindible, sí es al menos

aconsejable en este contexto. Lo que el futuro nos deparará probablemente tendrá mucho que ver con algo “portátil”, “automático” e “inmediato”. Portátil (movible y fácil de transportar) para poder llevar el diagnóstico a pie de enfermo. Automático (donde el operador humano es sustituido por procesos mecánicos o electrónicos) para aquellas pruebas diagnósticas no realizables a pie de enfermo y que deberán ser realizadas en el laboratorio. Inmediato (que sucede en seguida, sin tardanza) para poder obtener los resultados sin las esperas que los clientes de la microbiología clínica tan paciente y resignadamente han/hemos debido soportar. Inmediatez y automatización que, al unirse, nos lleva a la necesidad de un nuevo diseño de los laboratorios donde la actividad no se concibe restringida a un horario de 8:00 a 15:00 h. Las anteriores características, tan inquietantes por lo que amenazan nuestra organización actual del trabajo, son tan aplicables a la (micro)biología molecular como a las otras técnicas diagnósticas, con la ventaja de que las técnicas moleculares se prestan como muy pocas otras a participar en estas pruebas de nueva generación. El conocimiento de la secuencia genética de los microorganismos con el soporte de la bioinformática y de Internet, así como la introducción de los *microchips* o *microarrays* en grandes aparatos automáticos o en pequeños artilugios portátiles podrá dar a la biología molecular una utilidad para la microbiología clínica difícilmente comparable a otra metodología. El saber adaptar los procedimientos del futuro (aquí previstos o no) sin perder el factor humano que los modula, traduce y enriquece, será el reto definitivo de nuestra especialidad de microbiología clínica.

## Bibliografía

1. Echeverría P, Seriwatana J, Chityothin O, Chaicumpa W, Tirapat C. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water by filter hybridization with three enterotoxin gene probes. *J Clin Microbiol* 1982;16:1086-90.
2. Schmid GP, Steigerwalt AG, Johnson SE, Barbour AG, Steere AC, Robinson IM, et al. DNA characterization of the spirochete that causes Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1984;20:155-8.
3. Bjorvatn B, Lund V, Kristiansen BE, Korsnes L, Spanne O, Lindqvist B. Applications of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1984;19:763-5.
4. Eizuru Y, Inagawa S, Minamishima Y. Application of “Hirt supernatant” DNA to the molecular epidemiology of cytomegalovirus infections. *J Clin Microbiol* 1984;20:1012-4.
5. Martínez JL, Baquero F. Aplicación de las sondas de ADN en Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1989;7:122-5.
6. Palomares JC, Lozano MC, Aznar J, Perea EJ. Hibridación con sonda de ADN para el diagnóstico de infecciones por *Neisseria gonorrhoeae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1989;7:140-3.
7. Roy C, Tirado M, Reig R, Hermida M, Fontanals D, Esteva C, et al. Actividad de betalactamasa de tipo TEM en una cepa de *Neisseria meningitidis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1989;7:206-9.
8. García de Lomas J, Muñoz C, Gimeno C. Amplificación de ADN (*polymerase chain reaction*: [PCR]) en el diagnóstico microbiológico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990;8:574-83.
9. Mora A, Gimeno C, Bernacer B, Nieto A, García de Lomas J, Navarro V. Meningoencefalitis herpética: su diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992;10:245.
10. Gallego L, Aranguiz A, Sarria L, Alonso R, Colom K, Cisterna R. Obtención mediante la técnica de PCR de sonda marcada con digoxigenina para detectar betalactamasa tipo TEM. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992;10:220-3.
11. Prats G. Pasado y futuro de la Microbiología Clínica en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1988;6:227-34.
12. Smith HO, Tomb JF, Dougherty BA, Fleischmann RD, Venter JC. Frequency and distribution of DNA uptake signal sequences in the *Haemophilus influenzae* Rd genome. *Science* 1995;269:538-40.
13. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 2001;293:498-506.