

Mesa redonda

Aplicaciones de la técnica PCR a la medicina

Moderador: M. I. Sr. D. Carlos Viader Farré*. *Ponentes:* Sr. Dr. D. José M. Zabay, D^a Juana M. Mulet

Principios de la técnica de reacción en cadena de la Polimerasa

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica secuencias específicas de DNA, permitiendo así la detección de las mismas. La amplificación por PCR de secuencias de RNA requiere un paso previo de transcripción inversa del RNA a cDNA (técnica RT-PCR).

Los principios básicos de esta técnica esquematizados en la Figura 1. El DNA de la muestra biológica en la que se pretende detectar la secuencia de interés es primeramente desnaturalizado por calentamiento a 92-95°C. A continuación, sendos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores) se unen, a temperaturas de 45-60°C, a las correspondientes secuencias complementarias de las cadenas del DNA desnaturalizado; estas secuencias complementarias de los iniciadores están en los extremos del fragmento del DNA que se desea amplificar. Por último, a una temperatura de 72°C y en presencia de deoxinucleótidos, una DNA-polimerasa termoestable extiende cada iniciador por su extremo 3', de modo que se crean dos cadenas de

DNA, complementarias de las originales, que contienen las secuencias de nucleótidos del fragmento de DNA que se quiere amplificar. Para que se produzca este fenómeno, las secuencias complementarias de los iniciadores tienen que estar relativamente cerca una de otra, a una distancia de 2 kilobases ó menos. El resultado de este primer ciclo de amplificación es, así, la duplicación del fragmento de DNA de interés. Mediante la repetición secuencial de este proceso se pueden crear millones de copias del fragmento de DNA de interés. Este gran acúmulo de copias puede ser fácilmente detectado por electroforesis en gel, eventualmente seguida de hibridación con una sonda complementaria marcada. Actualmente existe, además, la posibilidad de hacer una cuantificación del material genético de partida (PCR cuantitativa). En su notable capacidad de amplificación reside la gran SENSIBILIDAD de la técnica de PCR.

Cada uno de los pasos del ciclo de amplificación representado en la Figura 1 dura entre 30 y 60 segundos. En un análisis por PCR típico se realizan entre 30 y 40 ciclos de amplificación. Por consiguiente, el proceso en sí de amplificación del DNA por PCR es rápido. La muestra que debe ser ampliada exige a veces procesos complejos de preparación. Sin embargo, en la mayor parte de las aplicaciones clínicas el resultado de una determinación por PCR puede ser obtenido en un tiempo de 12 a 48 horas. Por tanto, el diagnóstico por PCR tiene también la propiedad de la RAPIDEZ.

La utilidad clínica de la técnica de PCR se basa en la existencia de secuencias de DNA que son específicas de distintos microorganismos y de distintos genes humanos normales y patológicos. Este hecho proporciona a la técnica de PCR una gran ESPECIFICIDAD, que la hace aplicable al diagnóstico de enfermedades infecciosas, neoplásicas y genéticas, y al tipaje del sistema mayor de histocompatibilidad.

* Académico Numerario

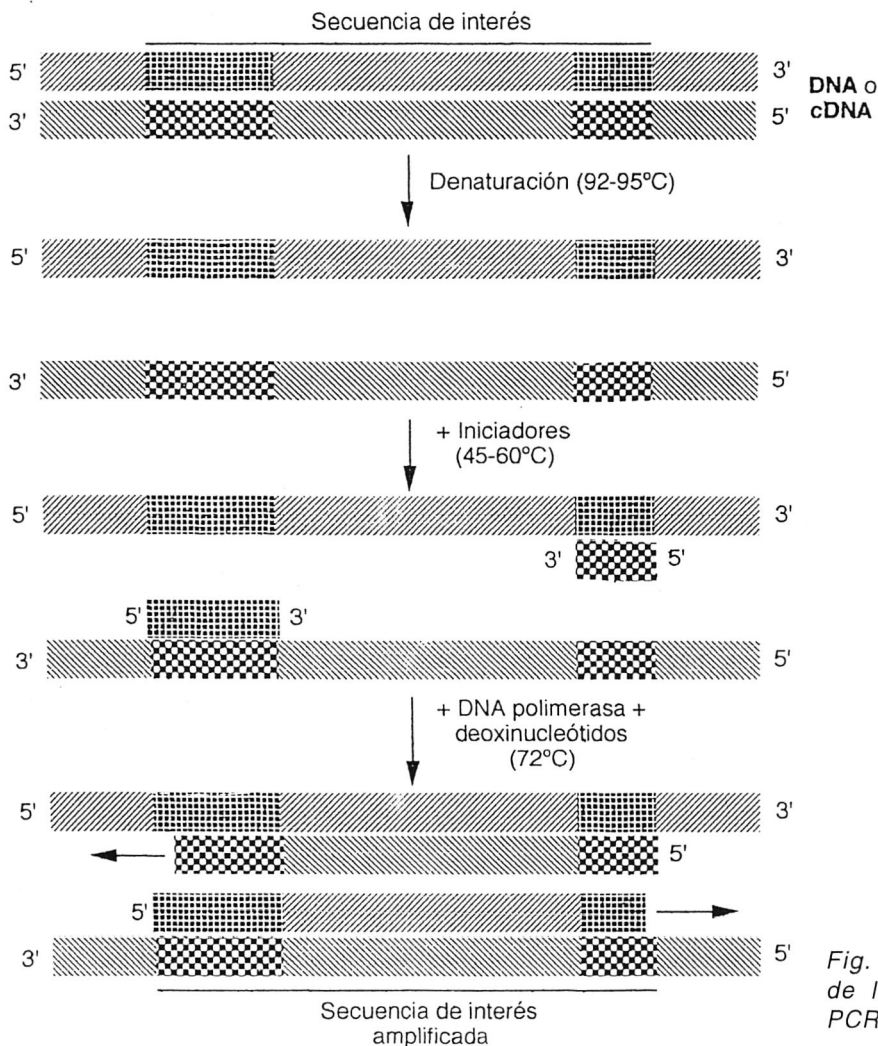


Fig. 1: Esquema de la técnica de PCR

Aplicaciones diagnósticas de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa disponibles en el laboratorio inmunogen.

El laboratorio Inmunogen tiene actualmente montadas técnicas de PCR aplicables al diagnóstico y valoración de diversas enfermedades infecciosas, y al tipaje del sistema HLA de clase II. a continuación se describen brevemente las venta-

jas potenciales de estas técnicas en cada una de las aplicaciones.

Hepatitis B

La técnica de PCR es la más sensible de las técnicas de biología molecular para la detección de DNA del virus de la hepatitis B (VHB) (1,2)?

La importancia del diagnóstico molecular de la hepatitis por VHB radica en los siguientes hechos:

- a) La determinación de DNA de VHB

en suero permite una estimación de la replicación viral más fiable que los métodos serológicos convencionales, tales como la determinación de HBeAg y de anticuerpos anti-HBeAg (1).

b) La pérdida de DNA de VHB indica ausencia ó reducción de la replicación viral, y frecuentemente predice la resolución de la enfermedad (1).

c) La cantidad de DNA de VHB circulante puede servir para la selección de pacientes con hepatitis crónica B para tratamiento con interferón (1).

d) La determinación de DNA de VHB en suero puede ser útil para la monitorización de la respuesta a tratamientos anti-víricos (4).

Hepatitis C

La importancia de la determinación del RNA del virus de la hepatitis C (VHC) en suero mediante RT-PCR se basa en los siguientes hechos:

a) Permite hacer un diagnóstico de la infección más precoz que la determinación de anticuerpos anti-VHC, ya que la presencia de RNA de VHC precede a la aparición de dichos anticuerpos (5).

b) puede contribuir a la distinción entre hepatitis crónica persistente y hepatitis crónica activa, ya que los niveles séricos de RNA de VHC son menores en la primera de las formas de hepatitis (6).

c) El nivel sérico de RNA de VHC permite estimar el grado de replicación viral (4). La evaluación de la replicación viral no puede hacerse por la determinación de anticuerpos anti-VHC, que no diferencian entre infección pasada e infección actual.

d) El nivel de RNA de VHC circulante puede servir para la selección de pacientes para tratamiento con interferón, ya que se ha observado una correlación inversa entre dicho nivel y la respuesta al tratamiento anti-vírico (7).

e) El nivel de RNA de VHC circulante puede ser útil para la monitorización de la respuesta a tratamientos anti-víricos (8).

Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

En la infección por VIH las técnicas de PCR tienen las siguientes aplicaciones:

a) Diagnóstico de la infección VIH en niños nacidos de madres infectadas. En los niños recién nacidos, el diagnóstico serológico convencional de la infección VIH tiene el problema de que los anticuerpos anti-VIH de clase IgG pueden ser de origen materno, transmitidos a través de la placenta, y pueden persistir en el niño hasta durante 18 meses. En estos casos, la PCR destinada a la búsqueda de DNA provírico en las células mononucleares de sangre periférica del niño es la técnica de elección para hacer el diagnóstico de infección VIH (9).

b) Diagnóstico de la infección VIH durante el periodo de seroconversión. Tras la infección por VIH existe un periodo generalmente de 3 a 6 semanas de duración, pero que puede ser bastante más largo, durante el cual no hay anticuerpos anti-VIH detectables. En estas circunstancias, la técnica de PCR destinada a la búsqueda de DNA provírico en las células mononucleares de sangre periférica es muy útil para hacer el diagnóstico precoz de infección VIH (10).

c) Diagnóstico de la infección VIH en casos en los que la determinación de anticuerpos anti-VIH por "Western-blot" da resultados indeterminados. En estos casos, la búsqueda por PCR de DNA provírico en las células mononucleares de sangre periférica es esencial para descartar que el resultado indeterminado del "Western-blot" sea debido a que el paciente se encuentra en una fase precoz de la infección VIH.

d) Distinción entre la infección por VIH-1 y la infección por VIH-2. Esta distinción

puede no ser posible mediante la determinación de anticuerpos anti-VIH, debido a la existencia de reacciones cruzadas. La técnica de PCR permite hacer el diagnóstico diferencial, mediante el uso de pares de iniciadores y de sondas específicos para cada tipo de VIH (11).

e) Cuantificación del RNA de VIH circulante. El nivel plasmático de RNA de VIH (carga vírica), determinado por RT-PCR, puede ser útil como marcador predictivo de progresión clínica de la infección VIH (12) y para monitorizar el efecto de diferentes tratamientos anti-retrovíricos (13).

Infección por Citomegalovirus

En la neumonitis por CMV, un problema frecuente en pacientes inmunodeprimidos, la técnica de PCR tiene las siguientes aplicaciones:

a) Diagnóstico de la infección. Utilizando muestras de lavado broncoalveolar (BAL), la técnica de PCR como procedimiento aislado tiene, para el diagnóstico de infección por CMV, una especificidad relativamente baja pero una sensibilidad de 100% (14,15). Por tanto, la técnica de PCR es muy útil para descartar el diagnóstico de infección por CMV con un alto grado de certeza y con mayor rapidez que el cultivo viral. La combinación de la técnica de PCR con la tinción por inmunofluorescencia de macrófagos alveolares da una especificidad también del 100% (15).

b) Monitorización de la eficacia del tratamiento anti-vírico. La persistencia de DNA de CMV en sangre tras el tratamiento anti-vírico puede predecir la recidiva de la enfermedad con un alto grado de certeza, aunque también se pueden observar recidivas en pacientes en los que llega a desaparecer el DNA de CMV (16).

Tuberculosis

El papel de las técnicas de PCR en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar se ha evaluado en dos situaciones distintas:

a) Diagnóstico de tuberculosis en los casos con baciloscopia negativa. Tomando como referencia el diagnóstico por cultivo, la técnica de PCR tiene una sensibilidad del 83-87 %, pero una especificidad del 98-99% (17, 18). Así, la técnica del PCR puede ser muy útil para hacer el diagnóstico de tuberculosis en casos con baciloscopia negativa, ya que es un procedimiento mucho más rápido que el cultivo; sin embargo, una PCR negativa no excluye en estos casos la existencia de infección.

b) Diagnóstico de tuberculosis activa en pacientes con prueba de la tuberculina positiva, o con historia clínica de tuberculosis previa tratada y/o de enfermedad inactiva. En estos casos, también tomando como referencia el diagnóstico por cultivo, la sensibilidad es máxima (100%), pero la especificidad es baja (70%) (19). Por tanto, en estos pacientes no parece estar indicada la realización de estudio por PCR.

Infección por chlamydia trachomatis

La técnica de PCR ofrece niveles de sensibilidad y de especificidad similares a los de la técnica convencional de cultivo celular para el diagnóstico de infección por *C. trachomatis* (20), teniendo sobre la metodología de cultivo las ventajas de una mayor rapidez y de una menor complejidad técnica.

Infección por papilomavirus humano (PVH)

Puesto que el PVH no se ha podido cultivar, las técnicas de biología molecular son las únicas disponibles para la detección y el tipaje del virus. Mediante la técnica de PCR se obtiene una prevalencia de infección por PVH mayor que la que se observa con otras técnicas moleculares, tales como la hibridación "in situ" en biopsias (77% vs 68%) y la hibridación en medio líquido en frotis y en muestras de

orina (50% vs 22%) (21). Esto, unido a su mayor rapidez y a su mayor sencillez, hace de la PCR la técnica de elección para el diagnóstico de infección por PVH. Además, mediante la técnica de PCR puede hacerse el tipado del virus, por lo que es una metodología válida para el estudio epidemiológico de los distintos tipos de PVH en la población (21).

Tipaje de los genes de las moléculas HLA de clase II

La genotipificación de los alelos del sistema HLA tiene más resolución que la tipificación de las proteínas por métodos serológicos ó celulares. Ello es debido a que el polimorfismo de las proteínas del sistema HLA no da cuenta de todo el polimorfismo que existe en el genoma (22, 23). Así, por ejemplo, para las 18 especificidades serológicas HLA-DR codificadas por el gen de la cadena β DRB1, se han identificado mediante técnicas de biología molecular 60 alelos diferentes (22). Este sistema utiliza unas letras que designan el gen, seguidas de 4 números, de los que los dos primeros corresponden a la especificidad definida por métodos serológicos o celulares, mientras que los dos últimos corresponden al alelo definido por métodos moleculares; así, por ejemplo, DRB1 *0406 es la nomenclatura de uno de los alelos de la especificidad serológica 4 de HLA-DR (DR4), mientras que DRB1 *0410 es la nomenclatura de otro de los alelos comprendido en la misma especificidad serológica.

La técnica molecular más empleada en el momento actual para la genotipificación de los alelos del sistema HLA de clase II es la técnica de PCR-SSO. Esta técnica tiene tres pasos: 1) amplificación por PCR de la zona polimórfica del DNA; 2) fijación en membranas de nylon del DNA amplificado, y 3) hibridación con nucleótidos específicos de secuencia (SSO, "Sequence Specific Oligonucleotides") de todos los alelos a estudio (23).

La genotipificación de los alelos del sistema HLA de clase II tiene sobre el tipaje HLA convencional las siguientes ventajas prácticas:

a) Al tener una mayor resolución, permite la consecución de mayores grados de homología HLA clase II entre el donante y el receptor. Esto es muy importante en los casos, como el trasplante de médula ósea, en que la identidad HLA de clase II es esencial para el éxito del trasplante.

b) Mayor especificidad

c) Para el tipaje convencional hay que utilizar células vivas que expresen moléculas HLA de clase II, material que, a veces, puede ser difícil de obtener. Esta restricción no existe en la genotipificación, ya que todas las células del organismo tienen la misma dotación genética que se puede extraer sin necesidad de que las células estén vivas.

d) Los reactivos que se usan en la genotipificación son sintéticos, y por tanto, más fáciles de obtener y de estandarizar que los antisueros y las células homocigotas para tipaje convencional convencional. Esto se traduce en una mayor reproducibilidad de los resultados.

Aplicaciones diagnósticas de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa que estarán disponibles en el laboratorio inmunogen en un futuro próximo

El laboratorio Inmunogen dispondrá próximamente de técnicas de PCR aplicables al diagnóstico y valoración de otras enfermedades infecciosas, al diagnóstico del cáncer, y al diagnóstico de diversas enfermedades genéticas.

Enfermedades infecciosas

Para el diagnóstico y valoración de otras enfermedades infecciosas, tales

como infección por virus herpes humano 6, virus varicela-zóster, agentes causantes de periodontitis, etc, la técnica de la PCR tiene sobre los métodos serológicos ventajas similares a las que se han ido especificando en el apartado previo.

Diagnóstico del cáncer

En el diagnóstico del cáncer, y muy especialmente en el campo de la Onco-Hematología, la técnica de PCR basa su aplicabilidad en:

a) su capacidad para detectar marcadores genéticos específicos de tumores que escapan a la resolución de técnicas citogenéticas convencionales (24, 25).

b) la mayor facilidad y rapidez con que puede detectar dichos marcadores genéticos, con respecto a otras técnicas de biología molecular tales como el "Southern blot" (26).

c) su gran sensibilidad, lo que la convierte en la técnica de elección para la detección de enfermedad mínima residual (27).

Diagnóstico de enfermedades genéticas

La técnica de PCR puede ser también utilizada para identificar alteraciones genéticas, tales como deleciones y mutaciones, que son causa de diferentes enfermedades hereditarias (distrofia muscular de Duchenne/Becker, fibrosis quística, deficiencia de alfa-1 antitripsina, hemofilias, etc.) (28). Las aplicaciones de la técnica de PCR en este campo son el diagnóstico de pacientes, la detección de portadores, el diagnóstico prenatal y el "screening" neonatal.

Bibliografía

1. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 11:73, 1991.
2. Monjardino J, Velosa J, Thomas HC, et al. Serum HBV DNA detected by PCR in dot blot negative HBV chronic carriers with acute liver disease. *J Hepatology* 13:44, 1991.
3. Krogsgaard K. Hepatitis B virus DNA in serum: applied molecular biology in the evaluation of hepatitis B infection. *Liver* 8:257, 1988.
4. Hu K-Q, Vierling JM. Molecular diagnostic techniques for viral hepatitis. *Gastroenterology Clinics North America* 23:479, 1994.
5. Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblat J, et al. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6441, 1990.
6. Kato N, Yokusuka O, Hosoda K, et al. Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: increase of the virus in advanced liver disease. *Hepatology* 18:16, 1993.
7. Lau Jyn, Davis GL, Kniffen J, et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 341:1501, 1993.
8. Chung RT, Dienstag JL, Kaplan LM. Precise quantitation of hepatitis C RNA using a competitive polymerase chain reaction: correlation of clinical course with levels of circulating RNA. *Hepatology* 14:65A, 1991.
9. Manak MM, Snider JV, Petersen D, et al. Use of PCR for detection of HIV-1 sequences in babies born to seropositive mothers. *Ann N Y Acad Sci* 693:255, 1993.
10. Borghi V, Lami G, Frigieri G, et al. Polymerase chain reaction in the early diagnosis of HIV-1 infection in high risk subjects. *Microbiologica* 16:181, 1993.
11. Kolesnitchenko V, Agius G, Zagury JF, et al. Polymerase chain reaction amplified HTLV-I, HIV-1 and HIV-2 DNA fragments in subjects with mixed retroviral infections. *J Med Microbiol* 38:328, 1993.
12. Piatak M, Saak MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259:1794, 1993.
13. Katzenstein DA, Winters M, Bubp J, et al. Quantitation of human immunodeficiency virus by culture and polymerase chain reaction in

response to didanosine after long-term therapy with zidovudine. *J Infect Dis* 169:416, 1994.

14. Eriksson B-M, Brytting M, Zkeyberg-Wirgart B, et al. Diagnosis of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage by polymerase chain reaction in comparison with virus isolation and detection of viral antigen. *Scand J Infect Dis* 25:421, 1993.

15. Cathomas G, Morris P, Pekle K, et al. Rapid diagnosis of cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients by bronchoalveolar lavage using the polymerase chain reaction, virus culture, and the direct immunostaining of alveolar cells. *Blood* 81:1909, 1993.

16. Einsele H, Ehninger G, Steidle M, et al. Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. *Lancet* 338:1170, 1991.

17. Forbes BA, Hicks Kes. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:1688, 1993.

18. Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM, et al. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 31:2048, 1993.

19. Schluger NW, Kinney D, Harkin TJ, et al. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest* 105:1116, 1994.

20. Cita sobre diagnostico de infección por *C. trachomatis*.

21. Martinez A, Nas R, La Cruz C, et al. Detección y tipado de papilomavirus humano por amplificación genómica en biopsias, frotis y orina. *Acta Ginecológica* LII:51, 1995.

22. Who Nomenclature Committee. Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Immunogenetics* 36:135, 1992.

23. Juan M, Gayá A, Vives J. Avances en la genotipificación de los antígenos HLA (Yokohama, 1991). *Inmunología* 11:44, 1992.

24. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, et al. Diagnoses of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5698, 1988.

25. Sidranski D, Eschenbach A, Tsai YC, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252:706, 1991.

26. Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, et al. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75:2220, 1990.

27. Campana D, Pui C-H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85:1416, 1995.

28. Reiss J, Cooper DN. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human genetic disease. *Hum Genet* 85:1, 1990.