

# El diagnóstico clínico laboratorial aplicando técnicas moleculares

## *Making a clinical laboratory diagnosis using molecular techniques*

Prof. Graciela Russomando, PhD<sup>(1)</sup>

El diagnóstico molecular se refiere al área de laboratorio clínico de la medicina en el que se aplica la detección y el análisis de ácidos nucleicos para diagnosticar y predecir el pronóstico, guiar la terapéutica y evaluar la susceptibilidad a la enfermedad. Los avances en el diagnóstico molecular son el reflejo del creciente conocimiento en el campo de la biología molecular.

El diagnóstico molecular se está convirtiendo en una modalidad de análisis estándar en muchos laboratorios de diagnóstico clínico en todo el mundo y sus ventajas han sido ampliamente publicitadas en los últimos 20 años. En la actualidad existe una variedad de paquetes comerciales en el área de las enfermedades infecciosas y no infecciosas, lo que ha estimulado a los laboratorios a incluir las técnicas de biología molecular para el diagnóstico clínico. En nuestro país y en la región, en los últimos 5 años también se ha sentido un aumento de la presión en los laboratorios clínicos para aplicar las técnicas moleculares en una amplia variedad de enfermedades infecciosas, genéticas, oncológicas y neurológicas.

Las áreas donde mayormente se aplican los estudios moleculares genéticos en el campo de la medicina laboratorial pueden enumerarse de la siguiente manera:

1. Diagnóstico de enfermedades infecciosas y evaluación cuantitativa de la carga viral por ejemplo en enfermedades infecciosas crónicas.

2. Diagnóstico avanzado en patologías prenatales.
3. Detección de mutaciones con capacidad de causar enfermedades.
4. Análisis de un locus con susceptibilidad genética.
5. Determinación de perfiles moleculares y clasificación de los tumores malignos, o la detección de enfermedad residual mínima en el cáncer.

Las pruebas moleculares brindan gran utilidad a los laboratorios clínicos en el campo de las enfermedades infecciosas. Estos métodos moleculares son aplicados para la detección de microorganismos no cultivables, detección de variantes genéticas, identificación de genes de resistencia a antibióticos o antivirales, y genes asociados a toxinas. Además, la capacidad de cuantificar organismos infecciosos supone una gran ventaja para evaluar la eficacia del tratamiento, la detección de organismos resistentes y para orientar hacia un cambio en la terapéutica. Es importante mencionar que las plataformas basadas en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real (qPCR) permiten obtener resultados cuantitativos más fiables, por tanto, la utilización de métodos moleculares en el análisis de enfermedades infecciosas está teniendo un gran impacto en el diagnóstico, tratamiento, evaluación y pronóstico de los pacientes que la padecen.

En microbiología clínica es fundamental identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso, para conocer sus implicancias patogénicas/patológicas, la evolución clínica, a los

1. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay. Miembro del Comité de Diagnóstico Molecular de la IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

<http://dx.doi.org/10.18004/ped.2016.abril.09-11>

fines de aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, de ahí que un pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica lo constituye la asignación de especie a un aislamiento microbiano y la detección de resistencia.

Dentro de la práctica de la rutina diaria, el laboratorio de microbiología dispone de técnicas fenotípicas que permiten lograr dicho objetivo. Sin embargo, pueden presentarse situaciones diversas como dificultades en el aislamiento, crecimiento lento o en medios de cultivo *in vitro* complejos, baja actividad en las pruebas bioquímicas, ausencia o baja efectividad de técnicas serológicas, etc. que confieren a las técnicas moleculares un rol protagónico.

En nuestro país se emplean métodos moleculares en el área de microbiología clínica, en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA) en lo relacionado a mecanismos de resistencia antimicrobiana, y en el Laboratorio Central de Salud Pública, MSP y BS, centro de referencia principalmente en casos de meningitis y neumonía.

Es de gran relevancia poner en conocimiento de la población pediátrica algunos estudios aplicados en el IICS-UNA en el área de infectología, algunas técnicas son “in house” y otras son con kits comerciales, citados a continuación.

Técnicas moleculares “in house” en bacteriología.  
***Pseudomonas aeruginosa***: Caracterización de la resistencia a carbapenemes mediante la detección de presencia y localización de genes codificantes de metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) y tipificación molecular de los aislamientos productores de MBLs PCR.  
***Klebsiella pneumoniae***: Caracterización de la resistencia a carbapenemes mediante la detección de presencia y localización de genes codificantes de carbapenemasas y tipificación molecular de los aislamientos productores de KPC por PCR.  
***Staphylococcus aureus***: Caracterización genotípica de la meticilino resistencia, características asociadas a aislamientos “hospitalarios” y “comunitarios”. Además de la identificación del tipo de SCCmec y la aplicación de métodos de tipificación para identificación de clones.

Técnicas moleculares en virología. Se emplean con

fines de diagnóstico y evaluación cuantitativa de la carga viral en enfermedades infecciosas crónicas. Hoy en día prevalece el empleo de kits comerciales que permiten la detección múltiple y simultánea de más de 20 patógenos virales en volúmenes pequeños de fluidos corporales y en forma sindrómica (aspirados nasofaríngeos en enfermedades respiratorias; líquido cefalorraquídeo en meningoencefalitis, encefalitis, meningitis, etc.). La detección múltiple es factible gracias a los equipos conocidos como termocicladores a tiempo real (qPCR) que no solo permiten la detección sino también la cuantificación de los agentes infecciosos presentes en las muestras biológicas sin necesidad de aislar o amplificar previamente. Esta metodología ha reducido sustancialmente la necesidad de contar con un gran volumen de muestra biológica, muchas veces difícil de obtener, ya que la detección simultánea permite el análisis en pequeños volúmenes desde 100-200uL de muestra con muy buena sensibilidad y especificidad. Esta modalidad es también empleada en algunos laboratorios clínicos en la práctica de la medicina privada en nuestro país.

Actualmente se puede hablar de la existencia de aproximadamente 106 analitos moleculares no infecciosos disponibles y aplicados de rutina en el laboratorio clínico, principalmente en países desarrollados, según datos del Comité Internacional de Diagnóstico Molecular<sup>(1)</sup>. Las técnicas moleculares aplicadas con mayor frecuencia son: amplificación de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación específica de secuencia y la secuenciación de regiones específicas de ácidos nucleicos. Los avances en el diagnóstico molecular permiten hoy en día detectar tumores a través de la detección de los ácidos nucleicos que circulan en un momento dado en el torrente sanguíneo, conocido como un “perfil en medio líquido” de la genética y epigenética de tumores y sus metástasis y en el diagnóstico prenatal no invasivo.

En una reciente encuesta, (aún no publicado) llevada a cabo en América Latina solicitando información sobre 106 analitos moleculares que se aplican de rutina principalmente en Europa, Japón y EEUU, se vio que tan solo un 20% de los mismos se emplean en los laboratorios clínicos. Existen pocos laboratorios públicos y privados involucrados y emplean mayormente técnicas “in house” y muy poco kits comerciales. En el IICS-UNA se realizan 6 de 91

estudios, todos ellos como técnicas “in house” y son: Factor II Gen (Protrombina): G20210A Polimorfismo, Factor V Gen: Mutación Leiden G1691A (Arg506Gln) (rs6025), Deficiencia de Metileno tetrahidrofolato Reductasa (MTHFR), Enfermedad Mínima Residual, Oncología Hematológica Molecular y Genética Molecular de Trombofilia. Desde este año en Paraguay, en el sector privado, se desarrollan estudios relacionados a analitos moleculares en oncología de tumores sólidos.

Si bien varios métodos básicos están disponibles como sistemas de kits para asegurar la robustez y para justificar la compatibilidad con las plataformas de hardware existentes en el mercado, se ha demostrado que los resultados en las pruebas de control de calidad de los laboratorios familiarizados con materiales desechables y equipos conocidos como “black box” o “cajas negras” resultan muchas veces significativamente peores que en los laboratorios que ajustan sus métodos siguiendo una literatura primaria<sup>(2)</sup>. Las técnicas “in house” deben ser consideradas, por los elevados costos de los kits comerciales, principalmente en países en vías de desarrollo. Las inversiones en hardware y

consumibles son el factor de costo mayor que limitan el acceso a las pruebas moleculares en nuestros laboratorios de diagnóstico clínico.

Es importante tener en cuenta que algunos métodos moleculares no están exentos de problemas tanto en su ejecución como en su interpretación, por lo que debieran estar reservados para aquellos laboratorios con personal familiarizado con estas técnicas y que tengan la infraestructura necesaria para su realización.

En la presente publicación de la revista PEDIATRIA, se presenta el resultado de una interesante investigación en el artículo cuyo título es “*Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados Escherichia coli obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social*” de los autores *Canata M y colaboradores*<sup>(3)</sup>, cuyo objetivo fue detectar por PCR múltiple, los genes codificantes de factores de virulencia en aislados *Escherichia coli*; demostrando así y resaltando la importancia del empleo de técnicas moleculares para el diagnóstico clínico laboratorial.

---

## REFERENCIAS

1. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratorial Medicine. Molecular diagnostics Committee (C-MD) [Internet]. Milano, Italy: IFCC [cited 2016 Apr 18]. Available from: <http://www.ifcc.org/ifcc-scientific-division/sd-committees/c-md/>
2. Lianidou E, Ahmad-Nejad P, Ferreira-Gonzalez A, Izuhara K, Cremonesi L, Schroeder ME, Richter K, Ferrari M, Neumaier M. Advancing the education in molecular diagnostics: The IFCC-Initiative Clinical Molecular Biology Curriculum (C-CMBC); a ten-year experience. Clin Chim Acta. 2014;436:5-8.
3. Canata MG, Navarro R, Velázquez G, Rivelli S, Rodríguez F, Céspedes A, Espínola C, Canese J, Guillén R. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. Pediatr (Asunción). 2016;43(1):13-17.