

Hacia una mejor interpretación de la información generada por los marcadores moleculares en la tuberculosis

ALFREDO PONCE DE LEÓN,* MIDORI KATO MAEDA**

RESUMEN

La tuberculosis es considerada por la Organización Mundial de la Salud como uno de los problemas de salud más urgentes por resolver. Con la llegada de nuevos métodos de tipificación, sobre todo los que utilizan técnicas moleculares, se han abierto áreas de investigación que han establecido nuevos conceptos con respecto a la dinámica de la transmisión de la infección. En el presente artículo se describen los factores que deben considerarse en la interpretación de los hallazgos con las técnicas de tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*.

Palabras clave: tuberculosis, marcadores moleculares, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

Tuberculosis is considered by World Health Organization as one of the public health problems that need to be solved with more urgency. With the arrival of new methods, mainly those using molecular techniques, research areas have been opened, which have established new concepts about infection-transmission dynamic. This article describes factors must be considered in the interpretation of findings of type-techniques of *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: tuberculosis, molecular markers, *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculosis es considerada por la Organización Mundial de la Salud como uno de los problemas de salud pública más urgentes por resolver. Ha sido una de las enfermedades no controladas desde el punto de vista de la salud pública debido a las dificultades y costos que conllevan su diagnóstico y tratamiento. Por ello, con el advenimiento de nuevos métodos, en especial los que utilizan técnicas moleculares, se han abierto áreas de investigación que han establecido conceptos nuevos con respecto a la dinámica de la transmisión de la infección. Estos descubrimientos han despertado un gran interés en la comunidad científica por adquirir la tecnología creciente, con el afán de lograr identificar líneas de transmisión de la tuberculosis. Sin embargo, el entusiasmo por lo nuevo debe ir acompañado por un seguimiento profundo del pensamiento científico para

que la interpretación de los resultados sea veraz y permita auxiliar en el control de esta enfermedad.

El objetivo de esta revisión es describir los factores que deben considerarse en la interpretación de los hallazgos de las técnicas de tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A finales de la década de 1980, Zainuddin y Dale, al buscar plásmidos en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, encontraron un elemento dentro del genoma con características similares a las de un transposón, en número variable y que generaba patrones de DNA polimórfico.¹ Poco después diferentes investigadores en Estados Unidos y en Europa identificaron estos elementos como secuencias de inserción, y que por su diversidad dentro del genoma tenían un poder de discriminación suficiente para establecer parentesco entre los aislados.²⁻⁴ A partir de este momento, se generó una explosión de información relativa a la aplicación de estas técnicas para el reconocimiento de líneas de transmisión. Así, surgió la epidemiología molecular, una disciplina que combina la epidemiología conven-

* Investigador titular. Departamento de Infectología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

** Estudiante de posdoctorado. Universidad Stanford, San Francisco, California, USA.

Correspondencia: Dr. Alfredo Ponce de León. Laboratorio de Microbiología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, México, DF.

Recibido: enero, 1999. Aceptado: febrero, 1999.

cional con la biología molecular, y que permite identificar nichos de transmisión que a largo plazo pudieran modificar los programas de control de la enfermedad, entre otros objetivos.

En poco tiempo, el uso de la tipificación molecular se generalizó, lo que hacía suponer que se podía establecer una red mundial con objeto de identificar áreas comunes, factores de riesgo y establecer conceptos precisos acerca de la estructura poblacional de la tuberculosis en el mundo. Así, en 1993, van Emben y un grupo internacional de expertos sugirieron la técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) con base en la secuencia de inserción 6110 como estándar.⁵ El objetivo era que todos los interesados se apegaran a una metodología única para poder realizar comparaciones entre los diferentes laboratorios. Los estudios de estructura de la población micobacteriana no se hicieron esperar, en especial los trabajos del grupo holandés que demostraron hallazgos interesantes sobre la estructura poblacional.⁶⁻⁸ En estos estudios se encontró relación entre el polimorfismo y el origen geográfico de los individuos: ejemplo de ello fueron los diferentes polimorfismos obtenidos en Holanda, Túnez y Etiopía. En dicho estudio los aislamientos con polimorfismos similares entre tales países pertenecían a enfermos que habían viajado a Túnez y Etiopía y habían sido detectados en Holanda. Por otra parte, se sugería la posibilidad de que algunos aislamientos con patrones polimórficos compartidos pudieran ser más virulentos que otros por ser más frecuentes.

Por otra parte, la epidemiología molecular de la tuberculosis ha permitido reconocer la fuente de contagio de diversos grupos de población como núcleos familiares, vecindades, asilos, cárceles y hospitales; asimismo, se ha utilizado para confirmar o descartar contaminación cruzada dentro del laboratorio sirviendo como modelo para el control de calidad.⁹⁻¹¹ Sin lugar a dudas, el hallazgo más importante está relacionado con la dinámica de la transmisión de poblaciones abiertas.¹²⁻¹⁵ En estos estudios se observó que los episodios de transmisión reciente con progresión rápida a enfermedad eran más frecuentes de lo que previamente se consideraba y se detectaron diversos factores de riesgo inculcados en estos fenómenos. Además, se documentó el efecto que una sola cepa puede originar en una población susceptible. Otros estudios revelaron la utilidad de la técnica para establecer reinfecciones exógenas en brotes epidémicos asociados con enfermos portadores de HIV.¹⁶ Los resultados de estas investigacio-

nes fueron incontrovertibles, puesto que estaban apoyados en un contexto epidemiológico sólido, aunado a una interpretación de los resultados moleculares o huellas digitales muy estricto (aislamientos idénticos = mismo número y localización de las bandas).

Lo anterior ejemplifica los dos tipos de interpretación de los estudios de tipificación molecular de forma clara y definida, uno para establecer la diversidad de la estructura poblacional de *M. tuberculosis* y el segundo para establecer líneas de transmisión.

BASE TEÓRICA Y ORÍGENES DEL CONFLICTO

Debemos recordar en forma somera las bases teóricas que dan principio a la interpretación de los resultados de la tipificación. En primer lugar, la diversidad detectada por el análisis de los PLFR entre las cepas está condicionada por dos grandes elementos:

- a) El número y posición de los elementos genéticos (el marcador molecular utilizado) dentro del genoma. La IS6110 se encuentra en una cantidad entre 1 y 20 copias dentro del genoma micobacteriano, aunque existen algunos aislamientos que no contienen este elemento de inserción.¹⁷ La distribución de estos elementos no parece ser al azar; sin embargo, aún no se determinan los factores que promueven o generan la diversidad en las posiciones ocupadas por ellos. Lo cierto es que la mayor parte de las cepas estudiadas poseen alrededor de 8 a 10 elementos (Small PM, Ponce de León A, datos no publicados).
- b) La distribución de los sitios de restricción para la endonucleasa que se utiliza para digerir o "cortar" el DNA en el ensayo (*PvuII*, en el caso de la técnica estandarizada). *PvuII* digiere eficazmente el genoma, generando fragmentos de tamaño variable en los cuales se contiene el elemento de inserción. Por otra parte, el sitio de restricción de esta enzima está presente dentro de la secuencia de inserción IS6110, razón por la cual siempre generará polimorfismo al digerirse el DNA. La secuencia de reconocimiento de la enzima *PvuII* (sobre la cual se realiza la digestión) es corta (6 pares de bases) y sujeta a mutaciones que cambian por completo la posición de la copia de la secuencia de inserción. Así, se han descrito fenómenos mutagénicos dirigidos por y para esta enzima que parecen correlacionar con el origen geográfico de la cepa.¹⁸

Ahora bien, una vez que sabemos el origen de la diversidad, esto no nos habla de la repercusión teórica

y práctica que ésta conlleva. Esta repercusión depende de definiciones preconcebidas basadas en el conocimiento *a priori* de la capacidad de discernimiento de la prueba. Así, se han definido tres conceptos:

- a) En una población donde la prevalencia de tuberculosis es baja, los aislamientos clínicos que presentan un patrón de polimorfismo único (no compartido con ningún otro aislamiento dentro de la comunidad en estudio), representan un episodio de reactivación de una infección latente adquirida en el pasado lejano.
- b) En esta misma población, los aislamientos clínicos que presentan un patrón de polimorfismo *compartido* con cuando menos un aislamiento clínico más, tienen un *origen común* y por lo tanto,
- c) Los aislamientos con una fuente común son producto de una infección reciente con progresión rápida de la enfermedad y están involucrados en cadenas de transmisión de la infección.

Estos conceptos son válidos en la medida en que se seleccione un grupo de estudio que comprenda la mayoría, si no es que la totalidad de los casos de tuberculosis de la región. Además, se requiere estudiar durante tiempo suficiente para permitir que se desarrolle la mayor parte de los episodios de transmisión secundarios a infección reciente (ventana epidemiológica).

Es aquí donde empieza a surgir el conflicto. Conforme se expandió el uso de la técnica internacionalmente aceptada, se comenzó a observar que aislamientos clínicos idénticos no tenían ninguna conexión epidemiológica convincente. De hecho, en el mejor de los casos, la técnica era capaz de demostrar una minoría de estos lazos y realmente podía detectar aquellos insospechados mediante las técnicas de investigación epidemiológicas convencionales.⁹ Esto, desde luego, es y seguirá siendo controversial y demuestra que cuando se utiliza un método en forma empírica, retrospectiva y sin la selección adecuada de las preguntas por estudiar, la mayor parte de las ocasiones no se podrán obtener conclusiones válidas.¹⁹⁻²³

Por otra parte, se han detectado cada vez más aislamientos clínicos que poseen un número limitado de copias de la secuencia de inserción (menos de cinco copias), lo que hace fácil encontrar polimorfismos compartidos sin líneas epidemiológicas convincentes. Sin embargo, se ha argumentado que el número reducido no proporciona suficiente información como para considerar parentesco entre los aislamientos, por lo que diversos grupos de investigadores propusieron que se

debían buscar nuevos marcadores moleculares, considerando que el origen clonal de los aislamientos no podía ser rebatido si dos marcadores moleculares independientes eran idénticos por ambos métodos.^{19,20} Así, Ross en Australia identificó un elemento de DNA repetitivo y polimórfico que logró introducir a un plásmido que fue denominado pTBN12, el cual contiene una serie de secuencias repetitivas ricas en guanidina y citosina, sin función y dispersos en el genoma micobacteriano.²⁴ Esta secuencia se estudió a fondo demostrándose que en realidad correspondía a secuencias repetitivas de DNA (PGRS) producidas por errores en la transcripción del mismo, localizadas en 26 loci y altamente polimórficas.²⁵

Se han introducido otros marcadores con el fin de poder discriminar aún más los aislamientos, especialmente aquellos con un número limitado de IS6110, logrando obtener resultados diversos, sin una comparación abierta entre los diferentes marcadores, y en general produciendo más desconcierto que respuestas.^{21,26-28} Sin embargo, todos estos estudios consistentemente demostraban que los conglomerados formados por el agrupamiento de los aislamientos con la IS6110 eran ratificados por los demás marcadores, a excepción de los aislamientos con un número limitado de la secuencia de inserción (generalmente los aislamientos con tan sólo dos copias del elemento de inserción). Una explicación fue propuesta por van Soolingen en 1993, quien identificó que existían distintos “relojes moleculares” entre los elementos utilizados al comparar una serie de 63 cepas con las diversas secuencias de inserción.²⁹ En este estudio, se observó que la IS6110 es más rápida que la IS1081, PGRS y que las secuencias de repetición directa (DR), por lo que esta velocidad “de cambio” le confiere mayor poder de discriminación, es decir, la habilidad para distinguir y agrupar aislados emparentados entre sí de los no relacionados. En otro estudio con base poblacional se observó, además, que es menos estable, lo que significa que su utilización para la detección de brotes es por demás adecuada por la velocidad con la que estos casos se presentan.³⁰

De esta manera se sugiere que IS6110 es capaz de detectar el origen común de las cepas que han evolucionado más recientemente, por lo que su utilidad para descubrir líneas de transmisión pudiera ser incluso superior que las formas convencionales para el estudio de brotes, sobre todo para aislamientos con un número mayor de copias de IS6110.²² Por otra parte, también se logró demostrar el bajo poder de discriminación que

pTBN12 o PGRS tiene para aislamientos con un número de copias de IS6110, quedando restringido su uso para discriminar aislamientos con un número limitado de copias de IS6110.²⁹⁻³¹

CONCLUSIONES

En esta breve reseña hemos intentado describir algunas de las razones que han generado discrepancias entre los diversos investigadores, así como los hallazgos de fondo que han conllevado a las mismas. Lo que parece bastante claro es que el uso e interpretación de estos marcadores dependen fundamentalmente del sitio y las preguntas sobre las que gira la aplicación de la técnica. La secuencia de inserción no es útil para definir todos los episodios de transmisión ni podría ser útil para la comparación de aislamientos clínicos de regiones diversas ni en tiempos distintos. En estas circunstancias otros marcadores menos rápidos (PGRS, DR) podrían ser incluso superiores. Sin embargo, para el escrutinio de episodios relacionados con brotes, la secuencia de inserción 6110 no es sólo una herramienta adecuada, sino podría ser incluso superior a los métodos convencionales de estudio de brotes.

REFERENCIAS

1. Zainiddin ZGF, Dale JW. Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. J Gen Microbiol 1989;135:2347-55.
2. Eisenbach KD, Crawford JT, Bates JH. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1988;26:2240-5.
3. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD et al. IS6110, an IS-like element in *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res 1990;26:2240-5.
4. Ma Adam RA, Hermans PWM, van Soolingen D, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. Mol Microbiol 1990; 4:1607-13.
5. Consenso internacional.
6. Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J Clin Microbiol 1995;33:3234-8.
7. Borgdorff MW, Nagelkerke N, van Soolingen D, et al. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprint. Am J Epidemiol 1998;147:187-95.
8. Yang ZH, de Haas PE, van Soolingen D, et al. Restriction fragment length polymorphism *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992: evidence of

- tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. J Clin Microbiol 1994;32:3018-25.
9. Daley CL, Small PM, Lawrence M et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: an analysis using restriction fragment length polymorphisms. N Engl J Med 1992;326:231-5.
10. Dooley SW, Villarino ME, Lawrence M, et al. Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patients. JAMA 1992;267:2632-4.
11. Small PM, McClenny N, Singh SP, et al. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. J Clin Microbiol 1993;31:1677-82.
12. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al. Transmission of tuberculosis in New York city. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. N Engl J Med 1994;330: 1710-6.
13. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med 1994;330: 1703-9.
14. Moss AR, Alland D, Telzak E, et al. A city-wide outbreak of a multiple-drug resistance strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. Int J Tuberc Lung Dis 1997;1:115-21.
15. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistance tuberculosis: epidemiology and clinical outcome. JAMA 1996;276:1229-35.
16. Small PM, Schafer RW, Hopewell PC, et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistance *M. tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. N Engl J Med 1993;328:1137-44.
17. Agasino CB, Ponce de León A, Jasmer RM, Small PM. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain IS6110. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:518-20.
18. Van Soolingen D, de Haas PE, Blumenthal RM, et al. Host-mediated modification of PvuII restriction in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 1996;178:1,78-84.
19. Barnes PF, Yang Z, Preston Martin S, et al. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. JAMA 1997;278:1159-63.
20. Braden CR, Templeton GL, Cave MD, et al. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a estate with a large rural population. J Infect Dis 1997;175:1446-52.
21. Yang Z, Chaves F, Barnes PF, et al. Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996;34:3044-8.
22. Behr MA, Hopewell PC, Paz EA, et al. Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. Am Respir Crit Care Med 1998; 158:465-9.
23. Behr MA, Small PM. Molecular fingerprint of *Mycobacterium tuberculosis*: how can it help the clinician? Clin Infect Dis 1997;25:806-10.
24. Ross, et al. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *M. tuberculosis* and its use as an epidemiologic tool. J Clin Microbiol 1992;30:942-6.

25. Poulet et al. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) present in MTB. Arch Microbiol 1995;163:87-95.
26. Sahadevan, *et al.* Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of MTB from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India by use of a direct, repeat probe. J Clin Microbiol 1995;33:3037-9.
27. Torrea, *et al.* Chromosomal DNA fingerprint analysis using the IS6110 and the repetitive element DR as strain specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. J Clin Microbiol 1995;33:1899-904.
28. Torrea, *et al.* Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of MTB clinical isolates. J Clin Microbiol 1996;34:1043-9.
29. Van Soolingen, *et al.* Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of MTB. J Clin Microbiol 1993;31:1987-95.
30. Yeh RW, Ponce de León A, Agasino C, *et al.* Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. J Infect Dis 1998;177:1107-11.
31. Chaves F, *et al.* Usefulness of the secondary probe pTBN12 in DNA fingerprinting of MTB. J Clin Microbiol 1996;34:1138-43.

XXIV Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C.

VI Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia

Morelia, Michoacán

Del 30 de junio al 3 de julio de 1999

**Hotel Fiesta Inn
Centro de Convenciones**