

CRONICA

DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS RESPIRATORIOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL: ¡UNA REALIDAD EN NUESTRO HOSPITAL!

Dona Benadof^a, Pascale Clément^{a,b}

^a Laboratorio Clínico y Microbiología. Hospital Roberto del Río.

^b Departamento de Pediatría y Cirugía Infantil Norte. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Resumen

La técnica de la reacción de polimerasa en cadena (PCR) en tiempo real o qPCR está disponible en el Hospital Roberto del Río desde el 2015. Esta técnica rápida y muy sensible, mejora los tiempos de respuesta y facilita la toma de decisiones clínicas. Sin embargo, es importante conocer los distintos aspectos del método para hacer una correcta interpretación clínica de un resultado de PCR.

Palabras claves: reacción de polimerasa en cadena

Abstract

Real time polymerase chain reaction (PCR) is a rapid and sensitive technique. It improves answer time for clinical decisions. It is important to know it well for a better clinical understanding.

Key words: Real time polymerase chain reaction

Llevamos 34 años viviendo bajo el reinado de la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR). Esta técnica desarrollada por Kary Mullis, a quién le valió el Premio Nobel de Química en 1993, ha sido de gran utilidad en diversas áreas, desde la paleontología y la medicina forense hasta la biotecnología (1). El PCR permite amplificar una región específica del ADN blanco de manera que podamos detectar su presencia. En palabras simples, nos permite “fotocopiar” un cierto párrafo de interés desde el gran libro del ADN. Esto es muy interesante cuando el objetivo es detectar la presencia o ausencia de un párrafo solo presente en un cierto patógeno.

La técnica original de PCR desarrollada por Mullis ha sido mejorada a lo largo de los años. Actualmente es posible realizar PCR múltiple, es decir, amplificar más de un párrafo por reacción y de esta manera detectar la presencia de más de un patógeno, o tal vez alguna resistencia bacteriana de interés, en un solo tubo.

El año 1994 se dio un gran paso cuando Stephen Bustin dio a conocer una versión mejorada del PCR: PCR en tiempo real o también conocido como PCR cuantitativo (2). La gran mejora consistió en la introducción de fluoróforos a la reacción, lo que permite “observar” en tiempo real cómo aumenta el número de copias, siendo la fluorescencia indicadora de que la amplificación está ocurriendo. Además, el uso de sondas mejora la sensibilidad y la especificidad acortando también los tiempos al eliminar la etapa final de detección del producto de PCR. El aporte para el área diagnóstica fue la posibilidad de cuantificar el número de copias de amplificado, lo cual anteriormente se realizaba sólo de manera semi-cuantitativa en el PCR tradicional. Esta técnica, permitió la medición de, por ejemplo, cargas virales como indicador de evolución de enfermedad o respuesta a terapias (3).

Pero los avances no se detuvieron. El año 2006 apareció el PCR digital que tiene la gran ventaja de cuantificar directamente la muestra sin necesidad de una curva estándar. La gran innovación está en diluir la muestra al máximo, de manera de lograr dejar una sola copia de ADN por gota. De este modo, se realiza la amplificación simultáneamente en cada gota, para luego cuantificar en cuántas de ellas hubo emisión

de fluorescencia (amplificación). Se obtiene así, el número de copias del ADN de interés en la muestra (4). Sin embargo, esta tecnología no está disponible aún en nuestro medio.

En el Hospital de Niños Roberto del Río disponemos de PCR en tiempo real desde el 2015, tecnología, considerada como *gold standard* para el diagnóstico de muchos patógenos bacterianos y virales. Recientemente, hemos adquirido un equipo automatizado de extracción de material genético, lo que nos permitirá estandarizar el método según el tipo de muestra recibida. Este equipo, Qiacube® (Qiagen, Alemania), utiliza columnas de sílica y realiza la extracción en sólo 30 minutos para 12 muestras simultáneas, lo que optimiza aún más los tiempos de respuesta.

Al momento de montar la técnica del PCR en tiempo real en el Laboratorio de Biología Molecular, optamos por un termociclador tiempo real de química abierta, es decir, que puede utilizar kits de amplificación de diversas marcas y proveedores. El AriaMx® (Agilent, USA) es un equipo rápido, con 4 canales para medir la fluorescencia y de muy fácil utilización.

Actualmente trabajamos con kits comerciales de amplificación certificados y validados para uso clínico:

- *Enterococos* resistentes a vancomicina
- Adenovirus
- Panel de virus respiratorios (Para-Influenza, Coronavirus, Bocavirus, Adenovirus y Rhinovirus)
- Patógenos sexuales (*C. trachomatis*, *Ureaplasma sp.*, *M. hominis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*).
- *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*
- *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*
- Virus herpes simplex 1 y 2
- Citomegalovirus, virus Epstein Barr y virus Herpes VI
- Enterovirus
- Parvovirus B19

En relación al diagnóstico de virus respiratorios, generalmente la muestra es analizada mediante la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD). Esta es una técnica rápida, sensible y específica. Además, su bajo costo permite afrontar de buena manera la numerosa cantidad de muestras que llega durante la campaña de invierno. El kit de IFD Simulfluor® (Merck, Alemania) permite la detección simultánea de los virus influenza A y B, virus respiratorio sincicial, metapneumovirus y adenovirus. En este último caso se ha descrito una baja sensibilidad de la técnica, por lo que incorporamos la detección de adenovirus mediante PCR en caso de sospecha clínica. Si se obtiene un resultado negativo por IFD, y el cuadro clínico es compatible con etiología viral, se solicita que la muestra sea analizada ya sea por PCR para virus respiratorios o sólo para adenovirus. Durante la campaña de invierno del 2016 (mayo a septiembre) se analizaron 169 muestras para virus respiratorios y 230 para adenovirus, obteniendo un 40% y 20% de positividad, respectivamente.

Durante la Campaña de Invierno del 2016, se detectaron 46 muestras positivas a adenovirus, correspondientes a 31 casos. Este hecho abrió el debate de cuál es el significado clínico de un resultado de PCR positivo (5). Se conoce que la técnica es muy sensible, detectando pequeñas cantidades del virus, además de no distinguir entre una infección en curso versus una convalecencia. Por otro lado, los médicos tratantes al utilizar un panel múltiple de PCR se pueden ver expuestos a una alta tasa de positividad de dos o más virus. Esto plantea el desafío de la interpretación clínica del resultado: ¿Es una co-infección o es una co-positividad? (6). Diversas publicaciones han descartado una mayor gravedad en los casos de co-infección por 2 o más virus en infecciones respiratorias, sin embargo, se desconoce aún acerca del efecto de una co-infección por adenovirus. Seguiremos obteniendo valiosa información respecto de la utilidad de las distintas técnicas basadas en la biología

molecular en pacientes complejos como los nuestros.

FILMARRAY-PANEL RESPIRATORIO

El sistema Filmarray (Biofire-Biomérieux) es un panel diagnóstico completamente automatizado para la detección simultánea de 17 virus y 3 bacterias en el caso del panel respiratorio. Existen otros paneles disponibles para hemocultivos positivos, para patógenos gastrointestinales y para meningitis-encefalitis.

Entre sus cualidades destacan la utilización de reactivos liofilizados que no se necesitan refrigeración y un manejo simple de las muestras, sin necesidad de micropipetas, utilizando un sistema de aspiración al vacío incorporado. El equipo es pequeño, y es capaz de realizar el proceso completo: homogeneiza la muestra, lisa las células mecánica y químicamente, lava el ADN/ARN, para luego realizar la retrotranscripción (ARN a ADNc). Tras eso, el equipo utiliza partidores específicos para cada patógeno en celdas separadas. El análisis completo demora aproximadamente una hora y su costo es de alrededor \$100.000 por muestra.

El Filmarray respiratorio fue aprobado por la FDA en febrero del 2016. Se pueden procesar muestras tales como aspirado nasofaríngeo y lavado broncoalveolar. Detecta 17 virus y 3 bacterias: adenovirus, coronavirus HKU1, NL63, 229E y OC43, metapneumovirus, rinovirus/enterovirus, influenza A, A/H1, A/H3 y A/H1-2009, influenza B, parainfluenza 1, 2, 3, 4, virus respiratorio sincicial, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. Diversas publicaciones describen las ventajas de su implementación, coincidiendo la mayoría en que un resultado más temprano ahorra en el uso de antimicrobianos, días cama, otros exámenes y en aislamiento. En general, el FilmArray presenta una mejor sensibilidad que un PCR en tiempo real. Sin embargo, en el caso del adenovirus esta técnica tendría menor sensibilidad que el PCR en tiempo real (7). El uso de esta técnica también aumenta la

tasa de detección de co-infecciones, en las que la mayoría está presente rinovirus/enterovirus, como también adenovirus (8). Se ha reportado que el material genético de estos virus permanece presente por más tiempo que los otros virus dificultando la distinción entre una infección activa y una portación (9).

Referencias

1. Bartlett JM, Stirling D. "A short history of the polymerase chain reaction" (2003) *Methods Mol. Biol.* 226:3-6.
2. Bustin SA. "A-Z of Quantitative PCR" (2004) IUL Press, La Jolla, California.
3. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. (2006) *Nature Protocols* 1: 1559–1582
4. Sykes PJ, Neoh SH, Morley AA, et al. "Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution." (1992). *BioTechniques* 13 (3): 444–9.
5. Kalu SU, Loeffelholz M, Beck E, Patel JA, Revai K, Fan J, Henrickson KJ, Chonmaitree T. "Persistence of adenovirus nucleic acids in nasopharyngeal secretions: a diagnostic conundrum." (2010) *Pediatr. Infect. Dis. J* 8:746-50.
6. Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J, Lindh M. "PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections" (2011) *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* (8):615-26.
7. Song E, Wang H, Salamon D, Jaggi P,
8. Leber A. "Performance Characteristics of FilmArray Respiratory Panel v1.7 for Detection of Respiratory Adenovirus in a Large Cohort of Pediatric Nasopharyngeal Samples: One Test May Not Fit All" *J. Clin. Microbiol.* (2016) 54(6):1479-86.
9. Popowitch EB, O'Neill SS, Miller MB. "Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP Fast Multiplex Assays for Detection of Respiratory Viruses" (2013) *J. Clin. Microbiol.* 51(5): 1528–1533.

10. Loeffelholz MJ, Pong DL, Pyles RB, Xiong Y, Miller AL, Bufton KK, Chonmaitree T. "Comparison of the FilmArray Respiratory Panel and

Prodesse Real-Time PCR Assays for Detection of Respiratory Pathogens" (2011) J. Clin. Microbiol. 49(12): 4083–4088.