

Patología molecular

Aplicación de las técnicas de biología molecular al estudio de enfermedades relacionadas con agentes infecciosos

J. Palacios, I. Briones, P. Rubio, L. Pérez-Gallego, V. Sánchez y C. Gamallo

Departamento de Anatomía Patológica, Hospital La Paz, Madrid.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas es normalmente contemplado como una tarea compartida exclusivamente por el clínico y el microbiólogo. Sin embargo, existen diferentes situaciones en que la anatomía patológica proporciona una información fundamental en el diagnóstico y tratamiento de este tipo de afecciones. Así, existen circunstancias en que el papel del patólogo es más relevante:

- Cuando no se dispone de tejido en fresco para cultivo, las muestras fijadas son la única fuente que puede informarnos sobre la naturaleza del proceso.
- Algunos microorganismos patógenos, como *Pneumocystis carinii*, sólo pueden ser diagnosticados por métodos morfológicos.
- El estudio histopatológico es, en algunas ocasiones, el único medio que define el significado patológico de determinados agentes aislados en cultivo (1).

Las dos limitaciones más importantes de los métodos morfológicos convencionales para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas son su sensibilidad y especificidad relativamente bajas. Los factores que afectan a la

sensibilidad son la cantidad de tejido disponible y el tipo de técnica especial de tinción utilizada. En relación a la especificidad, con la excepción de algunos virus (citomegalovirus), hongos (*P. carinii*) y protozoos (*Toxoplasma gondii*), la identificación morfológica del microorganismo, en especial en el caso de bacterias, es imposible por métodos puramente morfológicos.

Las técnicas de análisis de ácidos nucleicos en el estudio de agentes infecciosos tienen la ventaja de identificar microorganismos sin tener que utilizar técnicas especiales y tediosas de aislamiento. Asimismo, son capaces de detectar organismos no viables, microorganismos que no pueden ser cultivados (2), y ponen de manifiesto cambios genéticos que pueden tener implicaciones patogenéticas y terapéuticas. El impacto de estas técnicas ha sido tal que se ha llegado a sugerir que la meta final en el ámbito de la microbiología es eliminar los cultivos rutinarios de bacterias, virus y hongos.

Las técnicas clásicas de detección de DNA se han aplicado extensamente en la detección y análisis de agentes infecciosos. La técnica de *Southern blot* ha sido considerada como el método de elección debido a su sensibilidad y especificidad. Sin embargo, sus limitacio-

ANEXO: primers y condiciones de amplificación.**Micobacteriosis**

Ante una lesión sospechosa de micobacteriosis realizamos, en primer lugar, una reacción de PCR con *primers* específicos para el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (secuencia de inserción IS6110), que amplifican un fragmento de 123 pb. En caso de que ésta fuese negativa, el caso se estudia mediante *nested-PCR* con *primers* frente al gen *hsp65*. Si el resultado es positivo, el producto amplificado se digiere con *Nar I*, que produce cuatro fragmentos de 150, 120, 70 y 43 pb en el caso de *M. tuberculosis* y tres fragmentos de 220, 120 y 43 pb en casos de *Mycobacterium avium/intracellulare*. Si se obtiene un patrón de restricción diferente, no disponemos de información para identificar la especie. Incluso cabe la posibilidad de haber amplificado alguna micobacteria saprofita sin significado patógeno.

Secuencia de los *primers* que amplifican un fragmento de 123 pb de la secuencia de inserción IS6110 del complejo *M. tuberculosis*:

IS6110-F: CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG
IS6110-R: CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG

Condiciones de amplificación: *primers*: 0,25 mM, dNTP: 0,2 mM, Cl₂Mg: 1,5 mM y 2 U de polimerasa para una reacción de 50 ml. Ciclo térmico: 94 °C 5 m; 40 ciclos de 94 °C 1 m 30 s, 65 °C 1 m 30 s, 72 °C 2 m; 72 °C 5 m.

Secuencia de los *primers* que amplifican un fragmento de 439 pb de la secuencia del gen *hsp65* de las micobacterias:

Primers externos:

hsp65 (439)-F: ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT
hsp65 (439)-R: CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT

Condiciones de amplificación: *primers*: 0,5 mM, dNTP: 0,2 mM, Cl₂Mg: 1,5 mM y 2 U de polimerasa para una reacción de 50 ml.

Primers internos, que generan un fragmento de 383 pb:

hsp65 (383)-F: GAG ATC GAG CTG GAG GAT CC
hsp65 (383)-R: AGC TGC AGC CCA AAG GTG TT

Condiciones de amplificación: *primers*: 1 mM, dNTP: 0,2 mM, Cl₂Mg: 1,5 mM y 2 U de polimerasa para una reacción de 50 ml. Ciclo térmico: 94 °C 5 m; 40 ciclos de 94 °C 1 m 30 s, 60 °C 1 m 30 s, 72 °C 2 m; 72 °C 5 m.

Helicobacter pylori

Secuencia de los *primers* que amplifica un fragmento de 389 pb del gen *cagA*:

cagA-F: GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G
cagA-R: CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A

Condiciones de amplificación: *primers*: 0,1mM, dNTP: 0,2 mM, Cl₂Mg: 1,5 mM y 2 U de polimerasa para una reacción de 50 ml. Ciclo térmico: 94 °C 5 m; 40 ciclos de 94 °C 1 m, 56 °C 1 m, 72 °C 1 m; 72 °C 5 m.

Virus del papiloma humano (HPV) anogenitales

Secuencia de los *primers* que amplifican una secuencia de la ORF L1 de HPV anogenitales:

MY11: GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG
MY09: CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC
M: A+C; R: A+G; W: A+T; Y: C+T.

Condiciones de amplificación: *primers*: 0,5 mM, dNTP: 0,2 mM, Cl₂Mg: 2 mM, 2 U de polimerasa para una reacción de 50 ml. Ciclo térmico: 94 °C 5 m; 40 ciclos de 94 °C 1 m, 55 °C 1 m 30 s, 73 °C 1 m 30 s; 72 °C 5 m.

El producto amplificado tiene un tamaño aproximado de 450 pb. La digestión con *Rsa I* genera los siguientes fragmentos, según el tipo viral: HPV 6: 159, 149, 73, 67; HPV 11: 216, 134, 73, 26; HPV 16: 309, 71, 70; HPV 18: 134, 125, 85, 73, 38; HPV 33: 236, 101, 73, 39; HPV 31 y HPV 51: 379, 373.

Virus de Epstein-Barr (VEB)

Secuencia de los *primers* que amplifican un fragmento del gen *EBNA-2* de 168 pb en casos de VEB tipo 1 o tipo A y de 184 pb en el tipo 2 o tipo B:

EBNA-2-F: AGG CTG CCC ACC CTG AGG AT
EBNA-2-R: GCC ACC TGG CAG CCC TAA AG

Condiciones de amplificación de *EBNA-2*: concentración de *primers*: 0,5 mM, dNTP: 0,2 mM, Cl₂Mg: 1,5 mM y 2 U de polimerasa para una reacción de 50 ml. Ciclo térmico: 94 °C 5 m; 40 ciclos de 94 °C 1 m, 56 °C 1 m, 72 °C 1 m; 72 °C 5 m.

Secuencia de los *primers* que amplifican un fragmento del gen *LMP-1* de 161 pb y de 131 pb cuando existe delección:

LMP-1-F: CGG AGG AGG TGG AAA ACA AA
LMP-1-R: GTG GGG GTC GTC ATC ATC TC

Condiciones de amplificación de *LMP-1*: *primers*: 1 mM, dNTP: 0,2 mM, Cl₂Mg: 1,5 mM y 2 U de polimerasa para una reacción de 50 ml. Ciclo térmico igual para *EBNA-2*.

incluidas en parafina es baja, por lo que se requiere la realización de un *nested*-PCR que amplifica una secuencia de 383 pares de bases. Aunque no contamos con información del patrón de restricción de esta secuencia en las distintas especies, Ghossein y cols. (5) han publicado el patrón característico con *Nar* I para *M. tuberculosis* y *Mycobacterium avium/intracellulare*, que son las dos micobacterias más comunes. No obstante, el conocimiento del patrón de restricción de otras micobacterias como *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* o *Mycobacterium abscessus*, sería de utilidad a la hora de valorar determinadas lesiones, como por ejemplo las cutáneas producidas por estas micobacterias no tuberculosas.

Un hecho a tener en cuenta cuando se amplifica esta secuencia del gen *hsp65* es que pueden obtenerse ampliaciones positivas sin significado clínico, dado que la muestra de la que partimos no es estéril (bloque de parafina) y la mayor parte de las micobacterias no tuberculosas pueden ser saprofitas en agua, suelo, etc.

Se ha sugerido que las características especiales de la pared de las micobacterias suponen una dificultad a la extracción del DNA bacteriano. Por ello se han propuesto distintos métodos para favorecer la extracción en muestras clínicas (10). En concreto, cuando se utiliza material fijado en formol e incluido en parafina, algunos protocolos prolongan la extracción con proteinasa K hasta 5 días, o someten el producto de esta digestión a choques térmicos pasando sucesivamente la muestra desde ebullición a congelación en nitrógeno líquido.

HELICOBACTER PYLORI

Diversos estudios epidemiológicos han relacionado la infección por *H. pylori* con un incremento en el riesgo de padecer cáncer gástrico. Además, este microorganismo es la principal causa de gastritis crónica, el paso inicial en el proceso de carcinogénesis gástrica (11). Dado que la infección por *H. pylori* es relativamente frecuente y que sólo un porcentaje bajo de pacientes desarrolla cáncer de estómago, existe un interés creciente en detectar los factores ambientales, endógenos del huésped o dependientes del microorganismo que puedan influir en la progresión de la infección hasta el desarrollo de la neoplasia. Entre estos últimos factores, los dependientes de la cepa de *H. pylori*, se están estudiando diferentes genes que están relacionados con su patogenicidad, en especial el gen *vacA* (12), que codifica la proteína va-

cuolizante, y el gen *cagA* (13) (asociado a citotoxina A), que codifica una proteína no citotóxica cuya producción se asocia frecuentemente a la de citotoxinas.

En relación al primer gen, existen diversos genotipos. habiéndose relacionado el *vacA* s1a con una mayor inflamación y riesgo de úlcera (12, 14). Con respecto al gen *cagA*, existen dos genotipos: *cagA*⁺ y *cagA*⁻. El genotipo *cagA*⁺, que generalmente se asocia al *vacA* s1a, ocurre en el 50% al 60% de los casos aislados y su presencia se ha relacionado, en algunas series, con una mayor incidencia de úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer gástrico (14). No obstante, parecen existir diferencias geográficas en cuanto a la frecuencia de los distintos genotipos y a su importancia en la patogenicidad, por lo que sería interesante determinar estos genotipos en nuestra población y establecer su relación con las distintas afecciones gástricas. Un abordaje relativamente fácil sería la tipificación de *H. pylori* en las biopsias gástricas mediante PCR, lo que permitiría la adecuada correlación entre la información morfológica y molecular. En este sentido, existen diferentes parejas de *primers* para la detección (15) y tipificación (12, 13) de *H. pylori* que funcionan adecuadamente en material fijado en formol e incluido en parafina (Fig. 1J).

LESIONES ANOGENITALES Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV)

La asociación entre la infección por determinados tipos de HPV y el desarrollo de carcinoma de cérvix y lesiones precursoras ha quedado establecida durante los últimos años mediante estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. Entre los aproximadamente 100 tipos de HPV descritos, más de 30 son capaces de producir lesiones anogenitales. Dada esta gran diversidad de tipos virales, es necesaria la utilización de métodos de detección y tipificación sensibles y discriminativos (16).

Para detectar un amplio número de tipos de HPV en una sola reacción de PCR se han utilizado diferentes *primers consenso*, generalmente degenerados, que reconocen secuencias conservadas del genoma viral. Los marcos de lectura abierta (ORF) más conservados entre los distintos tipos de HPV son E1 y L1 (Fig. 1E-I). La tipificación posterior se lleva a cabo por diferentes métodos como son la hibridación con sondas específicas de cada tipo, el análisis con enzimas de restricción y la secuenciación. El método de más fácil aplicación rutinaria es el análisis de restricción.

- Seminarios

Surgical pathology of the thyroid

Dra. V.A. LiVolsi

Tumores endocrinos

Dres. H. Galera, J. Prat y R. González-Cámpora

Soft tissue tumours

Dr. C.D.M. Fletcher

Tumours and tumour-like lesions of the digestive tract

Dr. M. Sobrinho-Simoes

Pseudomalignant lymphoid lesions

Dr. L.J. Medeiros

Tumores cutáneos

Dres. F. Contreras, J. Amérigo y J.J. Ríos

Patología linfoide

Dres. J. Forteza, M.A. Pirís y J.L. Villar

Gran seminario de patología quirúrgica oncológica
(70 casos)

Información general

- Secretaría:

Dres. J.L. Villar Rodríguez y J.R. Armas Padrón

Departamento de Anatomía Patológica

Hospital Universitario Virgen de la Macarena

Avda. Dr. Fedriani, s/n - 41009 Sevilla -

Tel.: (95) 455 74 51 (martes y jueves, de 12 a 14 h)

Fax: (95) 437 12 84

- Lugar de celebración: Hotel Alcora****

- Traducción simultánea: Inglés-Español

- La cuota de inscripción (50.000 pta) incluye: documentación, colección de preparaciones (140 casos), libro del Curso, certificado de asistencia, almuerzos de trabajo y *coffee-breaks*.

V Curso de Hematopatología

Tortosa, 13 y 14 de noviembre de 1998

(Teatre Auditori Felip Pedrell - Jardins de Salvador Videllet Blanquet, 1)

- Directores del Curso:

Dr. Tomás Álvaro Naranjo

Dr. Llorenç Font Ferré

- Colaboradores:

Dr. Ramón Bosch Príncipe

Dr. Enric Contreras Barbeta

Dr. Josep Gumà Padró

Dr. José Antonio Izuel

Dra. Montserrat Llobera

Dra. Salomé Martínez González

Dr. Emili Mayayo Artal

Dra. Carmen Padrol Martínez

Dra. Teresa Salvadó Usach

- Conferenciantes:

Dr. Tomás Álvaro

Dr. Elías Campo

Dr. Jesús Hernández

Dr. Armando López-Guillermo

Dra. Estel·la Matutes

Dr. Manuel Morente

Dr. Alberto Orfao

Dra. Silvia Sanjosé

- Secretaría científica:

Srta. Anna Carot Bladé. Servicio de Patología
Hospital Verge de la Cinta

c/ Esplanetes 44-58 - 43517 Tortosa (Tarragona) -

Tel.: (977) 51 91 04 - Fax: (977) 51 91 11 y 51 91 04

E-mail: htvcap@tinet.fut.es

Internet: <http://www.conganat.org/linfo.tortosa>

<http://www2.ulpgc.es/~conganat/linfo.tortosa>

proteína. La frecuencia de la delección varía según el tipo de afección y el área geográfica estudiada, habiéndose sugerido en algunos trabajos una relación entre ella y un curso clínico más agresivo de las neoplasias.

Dadas las variaciones geográficas comentadas en relación a las características del VEB y la afección producida, creemos de interés que se aborden este tipo de estudios moleculares en nuestros laboratorios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Watts JC. *Surgical pathology and the diagnosis of infectious disease*. Am J Clin Pathol 1994; 102: 711-712.
2. Von Herbay A, Ditton HJ, Maiwald M. *Diagnostic application of a polymerase chain reaction assay for the Whipple's disease bacterium to intestinal biopsies*. Gastroenterology 1996; 110: 1735-1743.
3. Richeldi L, Barnini S, Saltini C. *Molecular diagnosis of tuberculosis*. Eur Respir J 1995; 8(Suppl. 20): 689-700.
4. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. *Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1990; 161: 977-981.
5. Ghossein RA, Ross DG, Salomon RN, Rabson AR. *Rapid detection and species identification of Mycobacteria in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction*. Diagn Mol Pathol 1992; 1: 185-191.
6. Tötsch M, Böcker W, Brömmelkamp E, Fille M, Kreczy A, Öfner D y cols. *Diagnostic value of different PCR assays for the detection of Mycobacterial DNA in granulomatous lymphadenopathy*. J Pathol 1996; 178: 221-226.
7. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. *Rapid identification of Mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 Mycobacterial species*. J Clin Microbiol 1997; 35: 2969-2973.
8. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. *Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of Mycobacteria growing in liquid media*. J Clin Microbiol 1997; 35: 79-85.
9. Richter E, Schlüter C, Duchrow M y cols. *An improved method for the species-specific assessment of Mycobacteria in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues*. J Pathol 1995; 175: 85-92.
10. Cormican MG, Glennon M. *Detection and characterization of mycobacterial infections by polymerase chain reaction*. En: Latchman DS (Ed). PCR applications in pathology. Principles and practice. Oxford University Press, Oxford 1995; 94-107.
11. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 720-741.
12. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. *Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori*. J Biol Chem 1995; 270: 17.771-17.777.
13. Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. *Cloning and expression of high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: Evidence of linkage to cytotoxin production*. Infection Immunity 1993; 61: 1799-1809.
14. Peek RM, Moss SF, Tham KT y cols. *Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis*. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 863-867.
15. Scholte GHA, van Doorn LJ, Quint WGV, Lindeman J. *Polymerase chain reaction for the detection of Helicobacter pylori in formaldehyde-sublimated fixed, paraffin-embedded gastric biopsies*. Diagn Mol Pathol 1997; 6: 238-243.
16. Henk L, Smits HL, Schegget JT. *Detection and characterization of human papillomavirus infections in clinical specimens by the polymerase chain reaction*. En: Latchman DS (Ed). PCR applications in pathology. Principles and practice. Oxford University Press, Oxford 1995: 30-63.
17. Ting Y, Manos MM. *Detection and typing of genital human papillomavirus*. En: Innis A, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego 1990: 356-367.
18. Snijders PJ, Van Den Bruke AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. *The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes*. J Gen Virol 1990; 71: 173-181.
19. Tieben LM, Ter Schegget J, Minnaar RP y cols. *Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers*. J Virol Methods 1993; 42: 265-280.
20. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. *Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype*. Cancer Res 1998; 58: 829-833.
21. Ambinder RF, Mann RB. *Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens*. Am J Pathol 1994; 145: 239-252.
22. Hayashi K, Chen W, Chen Y y cols. *Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in United States and Brazilian Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue: High frequency of a 30-pb deletion*. Hum Pathol 1997; 28: 1408-1414.

	Hombres	Mujeres	Género desconocido
Conferenciantes	100% (6)	0%	
Moderadores de simposios o cursos largos	100% (9)	0%	
Coordinadores de cursos, seminarios o simposios	82,6% (19)	17,4% (4)	
Ponentes en cursos, seminarios o simposios	81,1% (176)	18,4% (40)	0,5% (1)
Moderadores de sesiones de comunicaciones orales	90% (18)	10% (2)	
Coordinadores de sesiones de discusión de carteles	81,8% (18)	18,2% (4)	
Primeros firmantes de comunicaciones orales	60% (54)	40% (36)	
Primeros firmantes de carteles	48,2% (212)	48,2% (212)	3,6% (16)

Sólo los Seminarios de Urología, Patología Pediátrica y Citopatología contaron con un porcentaje de mujeres cercano o superior al 50%, y hemos sido los primeros sorprendidos por las abrumadoras diferencias entre los distintos tipos de participación en el Congreso y por la igualdad en la distribución de los primeros autores de carteles. Incluso roza la significación estadística ($p=0.053$) la comparación entre primeros firmantes de comunicaciones orales y carteles.

¿Se pueden sacar conclusiones generales partiendo exclusivamente de los datos del Congreso de Málaga? Un poco de lluvia sobre mojado: según el Boletín Informativo número 21, gastan cromosoma Y el 66,6% de los moderadores y el 89,3% de los ponentes en los casos, simposios y seminarios celebrados a propósito de la Asamblea General Ordinaria de la SEAP del año en curso.

Dicho en locuela tecnopánfila: parecería que la mitad de los recursos humanos no ha sido priorizada ni contemplada como objetivo sobre el que actuar en la implementación de medidas conducentes a la optimización de la misma en cuanto a rendimiento social. Nada más lejos de nuestras intenciones que propugnar, sin embargo, optimización alguna. Sólo queremos, sin andar en cháncharras máncarras, echar una chafaldita sobre algo que nos parece chocante, y esto es lo que hay, señores (y señoras, pero menos).

Agustín Rey y Elena Redondo
*Servicio de Anatomía Patológica,
Hospital Ntra. Sra. del Pino,
Las Palmas de Gran Canaria.*

AGRADECIMIENTOS. Deseamos agradecer la ayuda de las muchas personas a las que hemos escrito preguntando por el género de quienes sólo conocíamos sus iniciales. Sin su colaboración no habiéramos podido hacer este recuento.