

# LA TÉCNICA DE PCR: ¿EN QUÉ FASE DE DESARROLLO TÉCNICO SE ENCUENTRA?

## *PCR TECHNOLOGY: IN WHICH STAGE OF TECHNICAL DEVELOPMENT IS?*

Vicente Catalán Cuenca

Applus+ LABAQUA

### RESUMEN

Debido a las limitaciones de los métodos que habitualmente se emplean en el estudio de *Legionella*, los métodos diagnósticos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han convertido en la mejor alternativa a los métodos convencionales, debido principalmente a su rapidez, sensibilidad y especificidad. Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas de la PCR, su implementación en laboratorios diagnósticos está siendo lenta, debido por un lado a la falta de normalización de éstos métodos, pero también a la carencia de legislaciones que los incorporen, y a la dificultad técnica de su implementación. Sin embargo, su progresiva incorporación en los laboratorios, bien mediante la validación de métodos propios o usando kits comerciales, favorecerá la realización de trabajos de normalización y facilitará el uso de técnicas futuras más automatizadas.

### INTRODUCCIÓN

Los métodos de análisis que habitualmente se emplean para el estudio de *Legionella* están basados fundamentalmente en caracteres fenotípicos e incluyen desde el aislamiento en medios de cultivo selectivos, hasta diversos métodos inmunológicos, como la detección de antígeno en orina por enzimoimmunoanálisis o por inmunocromatografía.

A pesar de las múltiples ventajas que presentan estos métodos, tienen también importantes inconvenientes y limitaciones. En el caso del aislamiento en cultivo, el tiempo para la obtención de resultados es largo, llegando incluso en algunos casos a semanas; además es difícil aislar *Legionella* en muestras con abundante microbiota, y no es posible detectar células viables no cultivables. En el caso de otros métodos, los niveles de sensibilidad y especificidad son bajos, y la interpretación de los resultados puede llegar a ser difícil o ambigua.

Para solventar estos inconvenientes, en los últimos años, estos métodos están siendo complementados e incluso en algunos casos, desplazados o sustituidos progresivamente por métodos basados en caracteres genotípicos.

### SUMMARY

Due to the limitations of the methods commonly used for the study of *Legionella*, molecular diagnostic methods such as the polymerase chain reaction (PCR) have become the best alternative to conventional ones, mainly due to their rapidness, sensitivity and specificity. Nevertheless, despite the multiple advantages of PCR, their implementation in diagnostic laboratories is being slow, due to, on one hand to the lack of standarization of these methods, but also due to the lack of legislations that include them and to the technical difficulty of their implementation. Nevertheless, their progressive incorporation to laboratories, by means of the validation of "in house" methods or using available commercial kits, will favour the performance of normalization works and will facilitate the use of more automated future technologies.

sivamente por métodos basados en caracteres genotípicos.

De todas las técnicas de biología molecular, las basadas en amplificación de secuencias específicas de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han revolucionado múltiples áreas de la ciencia relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos, incluida la del diagnóstico microbiológico y se han convertido en una alternativa válida a muchos métodos basados en caracteres fenotípicos ya que se caracterizan por ser técnicas extremadamente rápidas, sensibles y específicas.

### PCR clásica o convencional

La reacción de PCR es un proceso enzimático simple y muy versátil, que consiste básicamente en incrementar exponencialmente el número de copias de un fragmento DNA diana específico a partir de una o unas pocas moléculas que actúan como DNA molde, empleando para ello dos oligonucleótidos cebadores de secuencia específica homóloga al fragmento a amplificar y una enzima DNA po-

limerasa termoestable. Los amplicones obtenidos por PCR convencional son detectados generalmente por electroforesis en gel de agarosa, tinción con bromuro de etidio y transiluminación con luz ultravioleta.

Se trata de una metodología cualitativa, que informa de la presencia o ausencia del microorganismo, pero no de su concentración en la muestra ni del estado de viabilidad de las células detectadas, dado que la molécula investigada es DNA y se ha descrito ampliamente la persistencia del DNA después de la muerte celular (Yañez *et al.*, 2005; Josephson *et al.*, 1993).

### PCR cuantitativa a tiempo-real

Más recientemente, la tecnología de PCR a “tiempo real” basada, en la detección fluorescente, está ganando terreno a la PCR convencional ya que además de detectar la presencia del microorganismo, permite cuantificar su concentración.

Básicamente existen dos sistemas de detección fluorescente, por un lado, el uso de agentes intercalantes, como el SYBR Green, que son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble cadena. Y las sondas específicas, que son oligonucleótidos específicos de secuencia homóloga al fragmento amplificado y que están marcados con una molécula de fluorocromo que emite fluorescencia al hibridarse con el fragmento diana.

La cuantificación del DNA de las muestras se realiza con una recta de calibrado construida con los valores Ct (ciclo del proceso de amplificación en el que se supera un umbral establecido de fluorescencia o valor “threshold”) y el logaritmo de la cantidad de DNA de una serie de controles de concentraciones conocidas de DNA.

Mediante esta tecnología, los procesos de amplificación y detección se producen de forma simultánea en el mismo vial, sin necesidad de ningún proceso posterior por lo que se reduce tanto el tiempo de reacción como la posibilidad de contaminaciones.

### Detección por PCR de células viables

A pesar de que la PCR a tiempo real ha solventado el problema de la cuantificación, persiste el inconveniente de poder discriminar entre células viables y no viables. Este problema se ha abordado desde distintas perspectivas; por un lado tenemos la estrategia del precultivo, enriquecimiento previo al análisis de detección, que permite incrementar el número de células viables presentes en la muestra. Otra estrategia se basa en el empleo como molécula diana para la reacción PCR, del RNA mensajero o el RNA ribosomal (Coutard *et al.*, 2005). Para ello se emplean técnicas como la transcripción inversa acoplada a una reacción de PCR (RT-PCR), que permite investigar la presencia de células viables transcripcionalmente activas. Más recientemente, se ha descrito la técnica NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) que ha demostrado tener importantes ventajas en términos de sensibilidad y especificidad, sobre la técnica de RT-PCR (Cook, 2003). Se fundamenta en una amplificación basada en la transcrip-

ción donde participan tres enzimas AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus-Reverse transcriptase), RNasa H y T7 RNA polimerasa, en condiciones isotérmicas.

Una última aproximación a la detección de células viables es el empleo de moléculas como la monoazida de etidio que bloquean tanto el DNA libre como el DNA de las células muertas, permitiendo la amplificación por PCR exclusivamente del DNA procedente de células integras (Nogva *et al.*, 2003).

### Interpretación de resultados obtenidos por PCR

Es frecuente intentar comparar los resultados obtenidos por aislamiento en cultivo y por PCR. Sin embargo, hay que tener en cuenta que mientras que por cultivo detectamos unidades formadoras de colonia (ufc), por PCR detectamos fragmentos de ácidos nucleicos de secuencia específica, y en muchas ocasiones los resultados no son comparables. Diferentes estudios realizados, han demostrado que cuando se trata de cultivos de *Legionella*, donde la mayoría de la población es viable y cultivable, los resultados obtenidos por cultivo y PCR son totalmente coincidentes. Sin embargo, cuando comparamos los resultados de PCR y cultivo mediante el análisis de muestras reales, la PCR siempre proporciona resultados superiores al cultivo, dado que nos encontramos con poblaciones en diferentes estados metabólicos, y en consecuencia el cultivo subestima el número total de células presentes.

Por PCR convencional, la molécula diana es DNA y en consecuencia se trata de una técnica cualitativa que nos informa de la presencia o ausencia de células totales del microorganismo investigado, no discriminando entre células vivas o muertas, dado que el DNA puede perdurar después de la muerte celular. La PCR a “tiempo real” emplea igualmente DNA como molécula diana, por lo que informa también de células totales (vivas y muertas), pero en este caso proporciona el número de células, ya que se trata de un método cuantitativo.

Por último, las técnicas RT-PCR y NASBA, emplean RNA como molécula diana y en consecuencia la detección de esta molécula se puede asemejar a existencia de actividad metabólica, es decir de células viables, aunque no son cuantitativas, ya que el grado de transcripción dependerá del estado metabólico de la célula.

Si se demuestra eficaz el empleo de agentes intercalantes como la monoazida de etidio, se podrá en un futuro cuantificar el número de células viables presentes en la muestra.

En consecuencia, la PCR es un método diagnóstico extremadamente potente, pero cuyos resultados hay que interpretar correctamente para poder tomar las medidas apropiadas en cada situación.

### Futuro de la técnica PCR

En cualquier caso, las técnicas de PCR han demostrado tener un gran potencial de desarrollo y en base a ello, el futuro de las tecnologías aplicadas al diagnóstico

microbiológico está orientado al análisis simultáneo de un gran número de patógenos. En los últimos años, la tendencia es a miniaturizar los métodos biológicos, especialmente mediante la tecnología de los microchips de DNA. Estos dispositivos vislumbran importantes ventajas sobre los métodos convencionales, como mayor rapidez en la obtención de resultados, menor consumo de reactivos y muestra, así como, alta reproducibilidad debido a la automatización. Sin embargo, estas tecnologías no están exentas de inconvenientes, ya que presentan un coste económico elevado y un límite de detección más alto de lo deseable.

Siguiendo esta línea de desarrollo, que conjuga la microbiología con la biología molecular, la biotecnología y la nanotecnología se está comenzado a trabajar en el desarrollo de plataformas automatizadas que integren las ventajas de la PCR cuantitativa y el análisis microarrays, basadas en microchips con tecnología de microcanales (microfluidics) para la identificación múltiple y simultánea de patógenos (Joseph *et al.*, 2006).

### Preparación de muestras

Un problema ampliamente conocido de los métodos moleculares basados en la amplificación enzimática del DNA, es la presencia de inhibidores que dificultan o bloquean la reacción PCR, especialmente los que afectan a las DNA polimerasas (Abu Al-Soud y Radson, 2004). Se han descrito múltiples sustancias inhibitoras presentes en las matrices de distintos tipos de muestras, sin embargo, el mecanismo de acción de muchas de ellas aún no se conoce. Entre las sustancias inhibitoras más comunes destacan, la hemoglobina, sales biliares, urea y heparina, en muestras clínicas; compuestos orgánicos y fenólicos, proteasas de la leche, grasas, etc. en muestras de alimentos y ácidos húmicos y fúlvicos, compuestos fenólicos, metales pesados, etc. en muestras ambientales. Los restos o trazas de reactivos utilizados para el aislamiento del DNA, así como contaminantes de laboratorio, como por ejemplo el polvo de los guantes, también pueden afectar negativamente a las reacciones de amplificación. La preparación de la muestra y el proceso de eliminación de inhibidores es un paso crucial para obtener una reacción de calidad, pero la mayoría de los métodos empleados son procesos largos, caros y laboriosos (Miller *et al.*, 1999; Rossen *et al.*, 1992), por lo que el desarrollo de métodos automatizados y que sean eficaces es una de las áreas de desarrollo más importante para que la implantación de los métodos PCR tenga éxito.

### Diseño y validación de los sistemas de amplificación por PCR

A pesar de las múltiples ventajas que presentan los métodos moleculares de diagnóstico, la realidad es que a diferencia de lo que ha ocurrido en los laboratorios de investigación, donde se ha convertido en una herramienta imprescindible, en los laboratorios diagnósticos su implementación está siendo más lenta de lo esperado y deseable. Las razones son múltiples, pero una de las causas que ha perjudicado la extensión de los métodos moleculares entre los laboratorios diagnósticos, es la falta de legislaciones que reconozcan métodos de PCR como méto-

dos oficialmente aprobados, pese al reconocimiento generalizado de que se tratan de métodos extremadamente potentes. Esto puede ser debido a que los métodos diagnósticos por PCR se han venido empleando como herramientas científicas más que como técnicas analíticas, por lo que existe una carencia de métodos de PCR normalizados. Este inconveniente se está solventando progresivamente, existiendo cada vez mayor número de estudios intercolaborativos que tienden a normalizar métodos PCR, lo que redundará en un futuro cercano en su progresiva incorporación a las legislaciones vigentes, a medida que estos métodos se conozcan con mayor profundidad. Este es el caso del proyecto Francés de Norma XP T90-471 "Calidad del agua. Detección y cuantificación de Legionella y *L. pneumophila* por concentración y amplificación génica mediante la PCR" que está elaborando AFNOR.

Otra de las razones que dificultan la implementación de estos métodos de diagnóstico basados en PCR, es que requieren un importante esfuerzo económico y de trabajo en las fases de diseño, desarrollo y validación del método que en muchos casos, hacen extremadamente difícil su implementación en laboratorios diagnósticos orientados a proporcionar a sus usuarios un servicio analítico de calidad, pero empleando en la mayoría de los casos métodos normalizados u oficialmente aprobados.

Está claro que cada vez más casas comerciales están ofertando nuevos diseños de métodos de PCR en formato kit que pretenden evitar a los laboratorios las costosas fases de diseño, desarrollo y validación. Sin embargo, este desarrollo tecnológico debe ir avalado por una amplia experiencia en este campo, así como por un importante respaldo científico. También se debe aportar un apoyo técnico adecuado a las necesidades de cada laboratorio, con el fin de proporcionar la seguridad y garantía de una correcta utilización de estos kits.

Es en consecuencia importante señalar que requisitos mínimos se les debe exigir tanto a los kits comerciales como a los métodos desarrollados por el propio laboratorio, para que garanticen un máximo rendimiento. En este sentido, se debe tratar de una metodología de fácil aplicación, un tiempo de realización optimizado al mínimo, una interpretación clara y objetiva de los resultados, y disponer de controles internos de reacción para verificar la calidad de la reacción y prevenir la aparición de falsos negativos. Por último, es extremadamente importante, contar con una exhaustiva y correcta validación del método que permita conocer sus principales características, así como sus limitaciones.

Un requisito indispensable para el uso de técnicas basadas en la biología molecular en el análisis microbiológico es conocer total o parcialmente el genoma del microorganismo en cuestión, con el fin de poder diseñar cebadores o sondas que permitan identificar regiones específicas para cada organismo. La selección del fragmento de DNA a utilizar para la detección debe basarse en un gen que confiera una característica lo más específica posible al microorganismo a detectar. Para verificar este punto se suelen realizar alineamientos de todas las secuencias de nucleótidos disponibles en las bases de datos de secuencias como el GenBank y EBI (European Bioinformatics Institute) del EMBL (European Molecular Biology Laboratory) y, a continuación, se utilizan progra-

mas informáticos específicos para el diseño de cebadores, que seleccionan las secuencias con una compatibilidad máxima a unos determinados parámetros de reacción teóricos.

Es imprescindible, una vez optimizadas las condiciones de amplificación, verificar experimentalmente que los cebadores funcionan en diferentes aislados y cepas de la especie a investigar, así como la no detección de especies taxonómicamente relacionadas, de tal modo que se compruebe que el diseño es apropiado en términos de sensibilidad, especificidad, selectividad, falsos positivos y falsos negativos. También es fundamental disponer de un control interno de reacción, que nos permita discernir la ausencia de microorganismo diana de una reacción inhibida, así como de un incorrecto funcionamiento del termociclador o de una baja actividad de la enzima (Hoofar *et al.*, 2004).

Hasta aquí sería suficiente para poder caracterizar un método molecular empleado como sistema de identificación. En el caso de disponer de un método cualitativo, es importante conocer también el límite de detección del método y los valores de repetibilidad y reproducibilidad cualitativa (conformidad y concordancia), así como el efecto matriz. Por último, en el caso de métodos cuantitativos es importantísimo conocer además los valores de exactitud, y precisión (repetibilidad y reproducibilidad), así como la incertidumbre, linealidad y límite de cuantificación.

Cabe resaltar, que es frecuente intentar calcular la exactitud de un método PCR por comparación con el método de aislamiento en cultivo. Este procedimiento puede ser eficaz cuando se trata de cultivos de laboratorio donde la mayoría de las células están vivas, pero no es eficaz en el caso de muestras reales donde el estado de viabilidad de la población celular es muy diverso y no es posible encontrar una correlación entre unidades formadoras de colonia (ufc) y el número de copias de genoma. En consecuencia, siempre será más exacto poder calcular el parámetro exactitud en términos de número de copias de genoma, empleando para ello materiales de referencia de DNA conteniendo una concentración conocida.

## Conclusiones

La incidencia que tiene *Legionella* sobre la salud pública, así como la alarma social que la frecuente aparición de brotes genera y su repercusión en diferentes sectores productivos como el industrial o el turismo, hace que el estudio microbiológico de muestras tanto clínicas como ambientales sea un área de gran importancia.

Por ello, los laboratorios de diagnóstico microbiológico debemos disponer de herramientas analíticas que sean rápidas y fiables y que mejoren drásticamente los métodos que tradicionalmente se vienen empleando en el estudio de *Legionella*. En este sentido la implementación de métodos moleculares, basados actualmente en méto-

dos de PCR, es un camino inexorable que los laboratorios de microbiología tendremos que andar para poder estar preparados y llegar en buena disposición a la incorporación de las futuras tecnologías moleculares que se prevean, y que se pueden identificar como "lab on a chip", es decir el uso de microchips que permitan la detección simultánea y automatizada de diferentes microorganismos patógenos, incluida por supuesto *Legionella*.

En el camino, la implementación de métodos PCR en los laboratorios, ya sean de desarrollo propio o en formato kit comercial, es un proceso crucial que va a facilitar la normalización de dichos métodos, por lo que deberán estar correctamente diseñados y validados de modo que cumplan correctamente con el fin para el que han sido desarrollados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abu Al-Soud, W. and Radsrom P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10): 3748-3753
- Cook N. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. 2003. *J. Microbiol Methods.* 53(2):165-74.
- Coutard, F., Pommepuy, M., Loaec, S., Hervio-Heath, D. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. 2005. *J. Appl. Microbiol.* 98(4): 951-961. 2005.
- Hoofar, J., Malorny, B., Abdulmawjoed, A., Cook, N., Wagner, M. and Fach, P. 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42 : 1863-1868.
- Joseph, C., Mastali, L., M., Gau, V., Suchard, M.A., Møller, A.K., Bruckner, D.A., Babbitt, J.T., Li, Y., Gornbein, J., Landaw, E.M., McCabe, E.R.B., Churchill, B.M. and Haake, D.A. Use of Electrochemical DNA Biosensors for Rapid Molecular Identification of Uropathogens in Clinical Urine Specimens. 2006. *J. Clin. Microbiol.* 44 (2): 561-570.
- Josephson, K.L., Gerba, C.P. and Pepper, I.L.. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(10): 3513-3515.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen E.L., and Ghiorse W.C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65; 4715-4724.
- Nogva, H.K., Dromtorp S.M., Nissen, H., Rudi, K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques.* 34(4): 804-813. 2003.
- Yáñez, M.A., Carrasco-Serrano, M.C., Barberá V.M., and Catalán, V. Quantitative Detection of *Legionella pneumophila* in Water Samples by Immunomagnetic Purification and Real-Time PCR Amplification of dotA Gene. 2005b. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3433-3441.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom K., and Rasmussen, O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. 1992. *Int. J. Food. Microbiol.* 17: 37-45.