

## Aplicaciones de la biología molecular en el programa nacional de tuberculosis de Chile: ¿Lujo o necesidad?

PABLO MARCONE E.\*

### Applications of the molecular biology in the national program of tuberculosis of Chile: Luxury or need?

Las políticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que para superar el umbral de la etapa de eliminación de la tuberculosis (20 casos anuales por 100.000 habitantes), es necesario ampliar la cobertura en la localización de casos y mejorar la eficiencia del tratamiento. Se excluyen dentro de esta estrategia las técnicas de biología molecular, por su escaso impacto en la disminución del número de enfermos bacilíferos, que son las fuentes de transmisión, y por su alto costo.

El Programa Nacional de Control de la Tuberculosis de Chile (PCT), en concordancia con las políticas de la OMS, ha logrado reducir recientemente la tasa de incidencia de la tuberculosis a 16,5 casos/100.000 habitantes (hbtes), una de las más bajas de Sudamérica.

En la situación actual de Chile un 23,5% de la población vive en zonas donde la incidencia es menor a 10 casos/100.000 hbtes y el 50% en zonas con tasas entre 10 y 19 casos /100.000 hbtes. Sin duda que en este contexto no deben descuidarse las estrategias actuales, con las cuales las más beneficiadas serán las zonas con mayores tasas, que actualmente comprenden un segmento minoritario de la población<sup>1</sup>.

Para lograr nuevas reducciones en la tasa de tuberculosis es necesario implementar nuevas estrategias que permitan caracterizar la transmisión del bacilo en nuestro medio, detectar precozmente la resistencia bacteriana, evitar el desarrollo de la enfermedad en los portadores de infecciones latentes y mejorar el diagnóstico, reduciendo los tratamientos empíricos mediante la obtención de confirmaciones bacteriológicas más oportunas.

En este sentido, una mirada crítica de los resultados obtenidos con las nuevas técnicas de laboratorio incorporadas por los países que se asemejan a Chile en su epidemiología, podría orientarnos a su aplicación racional en nuestro país.

Por el mayor costo que implica implementar estos nuevos procedimientos, basados en el estudio molecular de los genes del bacilo tuberculoso, es inevitable preguntarse sobre el costo-beneficio de estos métodos o, simplemente preguntarse: ¿la aplicación de técnicas de biología molecular es un lujo o una necesidad?

Con el objeto de evaluar el beneficio que podrían aportar éstas técnicas en nuestro país, se hace una revisión de la literatura orientada a cuatro áreas del accionar médico en tuberculosis: diagnóstico, prevención secundaria, tratamiento y epidemiología.

#### Diagnóstico

Si consideramos al cultivo de Koch como el "gold standard" en la confirmación bacteriológica de la tuberculosis, cualquier método diagnóstico debe ser comparado con éste, que como sabemos demora en ser informado entre 30 y 60 días en medios sólidos y 15 a 30 días en medios líquidos. Goessens<sup>2</sup> estudió 824 muestras provenientes de esputo, lavado bronco-alveolar, aspirado bronquial y traqueal. Todas fueron cultivadas en medio líquido y sometidas a estudio con dos métodos basados en técnicas moleculares disponibles en el comercio: BDProbeTec ET (Becton Dickinson) que emplea "strand dis-

\* Médico, Servicio Médico-Quirúrgico, Instituto Nacional del Tórax. Encargado de Tuberculosis, Servicio de Salud Metropolitano Oriente.

placement amplification” y COBAS AMPLICOR MTB (Roche) que usa la técnica de reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Los resultados obtenidos en este estudio se describen en la Tabla 1, donde se estima la sensibilidad y especificidad de cada método.

En la segunda columna se aprecia que de 109 muestras positivas en el cultivo, la baciloscopía logra detectar 67, siendo menos sensible que COBAS AMPLICOR (85) y éste a su vez menos sensible que BDProbeTec (94). La baciloscopía fue positiva en 17 casos con cultivos negativos, probablemente debido a bacilos muertos, los que fueron detectados por uno de los dos métodos moleculares en 11 casos y por ambos en 6. Estos casos correspondían a pacientes con sospecha clínica de tuberculosis que recibieron tratamiento por al menos 6 meses o habían sido tratados hace menos de 6 meses. De esto se desprende que los métodos moleculares son tan sensibles como la baciloscopía en detectar bacilos no viables (escapes bacilares) y que las muestras de esputo pueden ser positivas más de 12 meses después de iniciado un tratamiento y más de 6 meses después de la

conversión de una baciloscopía positiva a negativa<sup>3</sup>. De ahí la necesidad de proceder a una cuidadosa interpretación de los resultados.

Las baciloscopías positivas con cultivo positivo fueron detectadas en su totalidad por BDProbeTec ET (67/67) y en un 95,5% por COBAS AMPLICOR MTB (64/67). En los casos con baciloscopía negativa y cultivo positivo, BDProbeTec ET detectó 27/42 (64,3%) y COBAS AMPLICOR MTB detectó 21/42 (50%). Esto demuestra la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares en este estudio, similar a lo publicado por Ichiyama y cols<sup>4</sup>, que informa cifras de sensibilidad de 89,5% y 94,7% para COBAS AMPLICOR MTB y BDProbeTec ET, respectivamente. Pero esta afirmación ha sido muy controvertida. La limitación de los métodos moleculares en detectar casos con baciloscopías negativas fue señalada por Piersimoni<sup>5</sup>.

Por lo mencionado, los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC)<sup>6</sup> recomiendan para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar activa emplear los criterios descritos en la Tabla 2. Pero, los autores recalcan que siempre debe imperar el criterio clínico.

**Tabla 1. Resultados de las Baciloscopías, Amplicor y BDProbeTec ET en muestras respiratorias correlacionadas con el resultado de los cultivos<sup>2</sup>**

Pruebas	Cultivo de Koch (n)		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
	Positivo (n = 109)	Negativo (n = 715)		
Baciloscopía				
Positiva	67	17	61,5	97,7
Negativa	42	698		
Amplicor				
Positivo	85	11	78	98,5
Negativo	24	704		
BDProbeTec ET				
Positivo	94	12	86,2	98,3
Negativo	15	703		

**Tabla 2. Recomendación del CDC para el empleo de técnicas moleculares en muestras respiratorias en el diagnóstico de tuberculosis<sup>6</sup>**

BK	PCR	Conducta	Diagnóstico de Tuberculosis
(+)	(+)		Confirmado
(+)	(-)	Descartar inhibidores PCR	Si PCR sigue (-): Probable MNT
(-)	(+)	Repetir muestra	Si BK (-) y PCR (+): Probable TBC
(-)	(-)	Repetir muestra	Si BK (-) y PCR (-): Improbable TBC

MNT: Micobacterias no tuberculosas. BK: baciloscopía, PCR: técnica de biología molecular.

El uso juicioso en los centros de referencia de las técnicas moleculares, puede disminuir el número de tratamientos empíricos sin confirmación bacteriológica, evitando los riesgos innecesarios de toxicidad por drogas y permite tratar oportunamente las tuberculosis paucibacilares, que serán en su mayoría confirmadas posteriormente por el cultivo.

### Profilaxis secundaria

El control de la tuberculosis depende de la interrupción de la cadena de contagio. El PNT está diseñado para detectar casos nuevos bacilíferos, pero existe una condición previa susceptible de intervención: la infección tuberculosa latente (ITBL), sobre los infectados que no han desarrollado la enfermedad.

Las personas infectadas con el *Mycobacterium tuberculosis* representan un peligro potencial de nuevos casos de tuberculosis. Actualmente, en los países con baja prevalencia, como EE.UU., la estrategia para la eliminación de la enfermedad consiste en detectar a las personas infectadas con alto riesgo de reactivación<sup>7</sup>. Esta condición epidemiológica es aplicable a un 75% de la población chilena que vive en un entorno con tasas de incidencia menores a 20 casos por 100.000 habitantes<sup>1</sup>.

No existe un "gold standard" para el diagnóstico de ITBL, más aún en pacientes que han sido vacunados con la BCG. Teóricamente, para evaluar un nuevo examen diagnóstico habría que aplicar la reacción de tuberculina (PPD) y el nuevo test a estudiar en una misma población y esperar la evolución natural para determinar cuáles son los casos que desarrollarán la enfermedad, midiendo así la sensibilidad y especificidad de cada test. Esto obviamente no sería ético.

Actualmente disponemos de dos nuevos métodos de los cuales ya se dispone de kits comerciales: El QuantiFERON-TB y el ELISPOT. Ambos se basan en la detección de interferón gama (IFN- $\gamma$ ), que es la citoquina esencial en el desarrollo de la inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*.

El IFN- $\gamma$  es producido por el linfocito Th1 después de su estimulación con proteínas muy específicas del *Mycobacterium tuberculosis*: Early Secretory Antigen Target-6 (ESAT-6) y Culture Filtrate Protein 10 (CFP10). Estos antígenos no están presentes en el bacilo de Calmette Guérin (BCG), ni en la mayoría de las *Mycobacterias* ambientales, lo que explica la especificidad del examen, que además tiene la ven-

taja de no ser operador dependiente, ya que basta tomar una muestra de sangre y añadirle los antígenos específicos, midiendo el IFN- $\gamma$  producido<sup>8</sup>.

Shams<sup>9</sup>, estudió en forma prospectiva 413 contactos de pacientes tuberculosos, midiendo en cada uno de ellos el riesgo epidemiológico de estar infectado. Tabla 3.

Según el puntaje obtenido los contactos se distribuyen en 4 cuartiles. Un resultado positivo del ELISPOT se asocia más estrechamente que un resultado positivo del PPD en los 2 cuartiles con mayor probabilidad de estar infectado (odds ratio 2,3), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. En forma global un 50% tiene PPD positivo *versus* un 39% para el ELISPOT.

Al analizar el subgrupo de contactos (228) nacidos fuera de EEUU, de los cuales el 88% estaban vacunados con BCG, es decir en una proporción equivalente a nuestra población, el ELISPOT fue positivo en el 46% y se asoció significativamente al grupo de mayor riesgo de estar infectado; en cambio, el PPD fue positivo en el 67% de los casos (menos específico), lo que implica un menor poder discriminativo de este examen en este subgrupo de vacunados (Tabla 4). El alto porcentaje de PPD positivo y la falta de asociación con el riesgo de contacto hace suponer que algunos de estos individuos tiene una ITBL preexistente, tal vez adquirida en

Tabla 3. Variables y peso asignado en el cálculo del puntaje a los contactos<sup>9</sup>

Variable	Peso
En relación con el paciente tuberculoso	
Pareja sexual de su domicilio	3
Otro miembro de su domicilio	2
Contacto no domiciliario	1
Contagiosidad del paciente con tuberculosis	
Baciloscopia de expectoración positiva	4
Baciloscopia de expectoración negativa	1
Tipo de exposición al paciente con tuberculosis	
A menos de 1 metro de distancia	4
Comparten automóvil	3,5
Sala de hospital, juego o de estar.	
Misma celda (prisión)	3
Comparten habitación en residencia privada	2,5
Bar, restorán, cafetería, colegio u oficina	2
Fábrica, iglesia, cine, teatro, tienda de comercio	1,5
Diferentes habitaciones en un mismo edificio	1
Exteriores	0,25

**Tabla 4. Odds ratio e intervalos de confianza de 95% para la reacción de tuberculina (PPD) o ELISPOT positivo en 228 pacientes nacidos fuera del país<sup>9</sup>**

Prueba	Cuartil según puntaje contacto	Nº positivos (%)	Nº negativos (%)	OR (95%IC)	Valor p
PPD	Primero	32 (21)	23 (31)	1	0,23
	Segundo	41 (27)	18 (24)	1,6 (0,8-3,5)	
	Tercero	40 (26)	16 (21)	1,8 (0,8-4,0)	
	Cuarto	40 (26)	18 (24)	1,6 (0,7-3,5)	
ELISPOT	Primero	21 (20)	34 (28)	1	0,06
	Segundo	23 (22)	36 (30)	1,0 (0,5-2,2)	
	Tercero	33 (31)	23 (19)	2,3 (1,1-5,0)	
	Cuarto	29 (27)	19 (23)	1,5 (0,7-3,1)	

el país de origen.

Seis de los contactos desarrolló una tuberculosis durante el estudio, cinco de ellos tenían ELISPOT positivo y sólo cuatro PPD positivo.

En el estudio de un brote de tuberculosis en un colegio en Inglaterra (con tasas de tuberculosis más parecidas a las chilenas que las de EEUU), con un grupo de contactos (n: 459) más circunscrito y fácil de identificar (compañeros de clase), se reportan similares hallazgos usando ambos procedimientos, pero en el análisis estadístico esta diferencia es significativa<sup>10</sup>. De ahí que este tipo de técnicas serían de gran utilidad en nuestro medio que tiene un 98% de población vacunada y tasas de incidencia en descenso, en especial en los grupos de mayor riesgo, tales como los que tienen indicación de tratamientos corticoidales o inmunosupresores prolongados.

A esto se agregan las ventajas de que basta obtener una sola muestra de sangre, no requieren de una segunda visita para leer el PPD y no son operador dependientes.

### Tratamiento

Las técnicas de biología molecular pueden ser de gran ayuda para el diagnóstico precoz de la resistencia a Rifampicina. En Chile, la resistencia primaria a drogas tiene escasa significación clínica y la Multi-Drogo-Resistencia (MDR), es decir la resistencia simultánea a Rifampicina e Isoniacida, alcanza a menos del 1% de los pacientes antes tratados, produciendo entre 8 y 12 casos anuales. Si bien es poco significativa en relación al número de casos anuales, estos

pacientes consumen muchos recursos médicos, incluyendo días-cama de hospitales regionales y de referencia.

En nuestro país más del 90% de los casos de resistencia a Rifampicina están asociados a resistencia a Isoniacida, de manera que determinando aquella se presume con alta probabilidad una MDR<sup>11</sup>. Por otra parte, en el estudio de sensibilidad a drogas el resultado de resistencia a Rifampicina es el más relevante, ya que implica siempre una terapia más prolongada y un mayor riesgo de fracaso.

La Rifampicina actúa sobre la RNA polimerasa de la micobacteria, matando al bacilo interfiriendo en el proceso de transcripción<sup>12</sup>. La RNA polimerasa tiene 4 subunidades, la subunidad  $\beta$  es codificada por el gen *rpoB*, un gen altamente conservado entre las especies bacterianas. Determinadas mutaciones en este gen confieren cambios en la conformación de la subunidad  $\beta$  impidiendo que la Rifampicina reconozca su sitio de acción, generándose así resistencia a la acción de ésta. La mayoría de las mutaciones ocurren en una región muy restringida de 81 pares de bases y suelen deberse a cambios de nucleótidos simples, que determinan sustitución de un aminoácido por otro. Una alteración en esta región, determina más del 95% de los casos de resistencia a Rifampicina<sup>13</sup>.

Existen exámenes comerciales, como el Inno-Lipa RifTB (Innogenetics, Belgium) que usando partidores específicos amplifican la región señalada del gen *rpoB* y luego, por sondas específicas, detectan las mutaciones más frecuentes<sup>14</sup>.

El disponer de éstas técnicas, en centros de referencia clínicos, donde se manejan la mayoría de estos pacientes, tales como el Instituto

Nacional del Tórax (INT), permitiría el diagnóstico precoz de resistencia a la Rifampicina. El manejo más oportuno de la TBC MDR disminuiría los fracasos de tratamiento, evitando la diseminación de esta forma clínica tan ominosa.

En una jornada destinada al análisis de la tuberculosis MDR en Chile, realizada en el INT en diciembre del 2005, nuestro invitado el Dr. José A. Caminero, médico de referencia en tuberculosis para América Latina de la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), quien además es un clínico experto en MDR, señaló que la medida más eficiente que puede tomar nuestro país en este tema, es el empleo de comprimidos con combinación de fármacos. Acción que por lo demás, tiene una relación costo/beneficio evidente.

### Epidemiología molecular

Los países más desarrollados se encuentran abocados a la tarea de desarrollar nuevas tecnologías para mejorar la vigilancia epidemiológica a nivel local y mundial. La aparición de cepas muy agresivas como la Beijing, el desarrollo de tuberculosis MDR y la creciente migración desde países de alta prevalencia a países de baja prevalencia, ha cambiado el clásico enfoque epidemiológico de la tuberculosis. Conceptos tan clásicos como que la reactivación de la enfermedad en un paciente anciano siempre se debía a una infección latente previa, que sólo los contactos domiciliarios o íntimos eran capaces de infectarse, que las infecciones eran siempre producidas por una única cepa, y muchos otros dogmas de la epidemiología clásica, han sido derribados o están en tela de juicio, gracias a las nuevas herramientas que ha aportado la epidemiología molecular.

Fueron los holandeses<sup>15</sup> quienes propusieron estandarizar la metodología para identificar la cepa de cada bacilo en particular, basado en el clivaje (corte) del DNA bacteriano en una secuencia de inserción (IS). La IS corresponde a un patrón de secuencias de pares de bases (nucleótidos), que está inserto varias veces en el DNA del bacilo. Las IS son muy conservadas en los microorganismos, esto quiere decir que son segmentos de DNA que no mutan al replicarse la bacteria. La secuencia de inserción más empleada para comparar los genotipos (genotipado) entre diferentes cepas, es la denominada IS6110. Cada uno de estos segmentos (IS6110) se distribuye en diferentes partes y en

diferente número en el DNA de los bacilos.

El DNA es cortado por una enzima, llamada enzima de restricción (ejemplo PvuII), la que sólo corta el DNA al reconocer una determinada secuencia específica de pares de bases, una de las cuales está presente en la IS6110 y también en otras partes (al azar) del DNA. Después de la incubación del DNA bacilar con la enzima se obtiene el DNA fragmentado en tantos cortes como sitios de clivaje haya reconocido la enzima. Cada trozo será de diferente extensión y serán muy cortos si dos sitios de clivaje se encuentran muy cerca o muy largos si se encuentran muy alejados (ver lado izquierdo de la Figura 1). De esta manera cada bacteria se diferencia de las otras por el número de fragmentos y el largo de éstos.

Luego, todos los fragmentos pertenecientes al DNA de un bacilo son depositados en un mismo carril en un gel de agarosa. Al aplicar un campo eléctrico éstos se desplazan dentro del gel, más rápido los fragmentos de DNA más cortos y de bajo tamaño molecular, y más lentos los largos y de gran tamaño. Siempre se hace correr en paralelo, a igual tiempo y condiciones, en el mismo gel, varias secuencias de DNA marcados con fluorescencia, con diversos tamaños moleculares conocidos y una cepa tuberculosa de referencia (ejemplo Mt14323). El carril del tamaño o peso molecular se utiliza para comparar con otros geles en modelos computacionales y el carril de la cepa de referencia sirve de control interno para evaluar si el procedimiento ha sido correcto (ver lado derecho de la Figura 1).

Una vez ocurrida la migración de los fragmentos de la cepa a estudiar, éstos deben ser "teñidos" o marcados para poder ser visualizados. Una sonda genética de 245 pares de bases se marca con peroxidasa y esta se une a una determinada parte del IS6110, permitiendo al ser revelado el gel en una placa autorradiográfica ver en el carril de la cepa estudiada sólo aquellos fragmentos que poseen la sonda con peroxidasa unida al fragmento de IS6110; no se visualiza el resto de los fragmentos de DNA. De tal manera que cada carril o línea dentro del gel corresponde a una determinada cepa, que se identificará por el número de bandas (número de fragmentos con IS6110 marcado) y por el peso o tamaño molecular de cada una de ellas (largo de éstas).

Cada bacilo al ser sometido a esta técnica (genotipado) genera una cantidad variable de fragmentos marcados y cada uno de ellos es de diferente largo (o peso), es decir entre las cepas

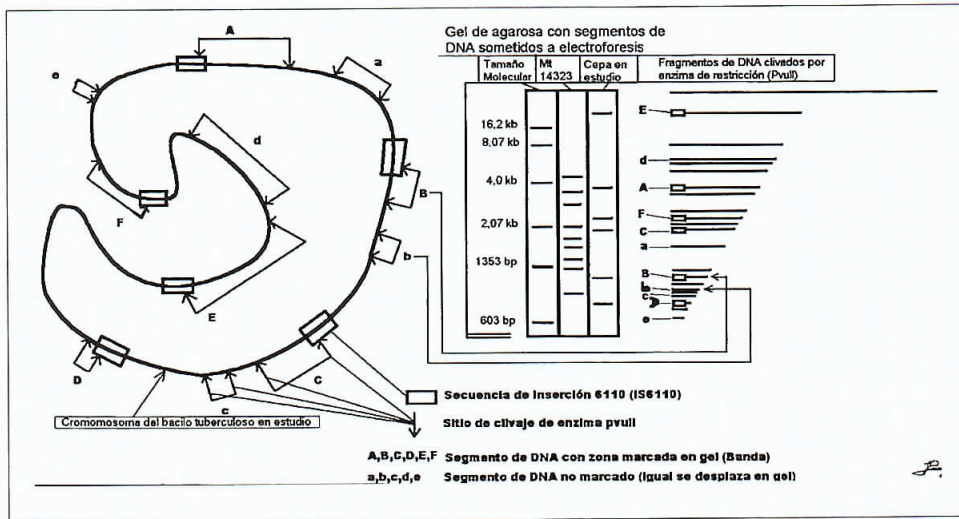


Figura 1. Diagrama de análisis de diferencias de longitud de fragmentos de DNA cortados por enzimas de restricción en cepas de *M. tuberculosis*.

hay un polimorfismo en largo y número de segmentos de DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism o RFLP). A la disposición de bandas en el gel de cada bacilo se la conoce como “huella dactilar” o *fingerprinting*. Si dos o más bacilos comparten el mismo patrón se habla de agrupación o “cluster” y es razonable asumir que se trata de la misma cepa. Esto se esquematiza en la Figura 1.

El impacto epidemiológico que se obtiene al aplicar esta técnica en una población determinada se traduce en que los casos agrupados en “cluster” corresponden muy probablemente a personas contagiadas entre sí. El resultado de la epidemiología molecular debe ser siempre evaluado a la luz de la epidemiología clásica, que puede determinar las condiciones y naturaleza del contagio. El genotipado de muchas cepas sin un sustento epidemiológico no tiene ninguna aplicación.

Un buen ejemplo de la utilidad de éstas técnicas en el contexto de una sólida epidemiología se aprecia en la descripción hecha por Caminero<sup>16</sup> de la rápida diseminación de la cepa Beijing en la Isla de Gran Canarias, donde se identificó en forma retrospectiva la influencia del caso índice introducido en 1993 en la isla y su progresión, en el porcentaje del total de casos: 10 pacientes en 1993 (5,5%), 12 en 1994 (8,1%), 18 en 1995 (16,4%), y 35 en 1996 (27,1%).

Otra aplicación no menos importante se refiere a la detección de contaminaciones cruzadas en el laboratorio. Se estima que un 3% de los cultivos son falsos positivos debido a conta-

minación cruzada<sup>17</sup>, lo que se comprueba al encontrar similar *fingerprinting* en muestras de diferentes personas manipuladas simultáneamente en el laboratorio. El clínico puede enfrentarse al hallazgo de un cultivo positivo en un paciente asintomático, iniciando un tratamiento largo y potencialmente peligroso, que puede suspenderse si se confirma que corresponde a la misma cepa de un tuberculoso con quien no hay evidencia de contacto epidemiológico.

En el caso de un segundo episodio de tuberculosis es muy útil evaluar si es con la misma cepa (recaída) o se trata de un contagio con una nueva cepa, por reinfección exógena. Esto es fácilmente detectable con técnicas de genotipado. Naturalmente que en el primer caso se debe determinar si la causa depende del paciente (ingesta irregular, malabsorción, inmunodeficiencia, resistencia bacteriana). En cambio, la segunda alternativa obliga a un estudio ambiental detallado (contactos) ya que se plantea un problema de salud pública (contagio).

En Chile, el genotipado de cepas provenientes de pacientes en grupos de riesgo: VIH positivos, extranjeros procedentes de países de mayor prevalencia, encarcelados, residentes en asilos de ancianos, enfermos antes tratados, o bien el estudio de brotes, nos permitiría (basados en nuestros sólidos datos epidemiológicos convencionales) conocer las vías de contagio y desarrollar mecanismos más eficientes para el control epidemiológico de la enfermedad.

Recientemente el Dr. Farga, considerando los logros actuales del Programa de Control de la

Tuberculosis, ha propuesto nuevas estrategias y técnicas que deberíamos aplicar en Chile para acercarnos a la eliminación de la TBC<sup>18</sup>. El presente trabajo desarrolla algunos de los tópicos allí citados, que a mi juicio son posibles de implementar. El uso de técnicas moleculares mejorará el control epidemiológico y el manejo de los pacientes. Nuestro país tiene el desarrollo tecnológico adecuado para implementarlas, de hecho muchas de ellas ya se han desarrollado para el estudio de otros gérmenes o virus.

Es importante que su implementación se realice y/o controle en el nivel central, tal como hoy se hace el estudio de sensibilidad a drogas anti-tuberculosas o la tipificación de especies en el Instituto de Salud Pública. Esto asegurará el correcto diagnóstico de la situación epidemiológica nacional y el uso racional de este recurso.

En este sentido, la aplicación de la biología molecular en el Programa Nacional de Tuberculosis no es un lujo sino una necesidad.

## Bibliografía

- 1.- Informe 2005 del Programa de Control y Eliminación de la Tuberculosis. Ministerio de Salud, Chile.
- 2.- GOESSENS W H, DE MAN P, KOELEMAN J G, LUIJENDIJK A, TE WITT R, ENDTZ H P, et al. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2563-6.
- 3.- THOMSEN V O, KOK-JENSEN A, BUSER M, PHILIPPI-SCHULZ S, BURKARDT H J. Monitoring treatment of patients with pulmonary tuberculosis: can PCR be applied? *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3601-7.
- 4.- ICHIYAMA S, ITO Y, SUGIURA F, IINUMA Y, YAMORI S, SHIMOJIMA M, et al. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3082-5.
- 5.- PIERSIMONI C, SCARPARO C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5355-65.
- 6.- Centers for Disease Control and Prevention Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49: 593-4.
- 7.- HORSBURGH C R Jr. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med* 2004; 350: 2060-7.
- 8.- STREETON J A, DESEM N, JONES S L. Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 443-50.
- 9.- SHAMS H, WEIS SE, KLUCAR P, LALVANI A, MOONAN P K, POGODA J M, et al. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1161-8.
- 10.- EWER K, DEEKS J, ALVAREZ L, BRYANT G, WALLER S, ANDERSEN P, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003; 361: 1168-73.
- 11.- VARELDZIS B P, GROSSET J, DE KANTOR I, CROFTON J, LASZLO A, FELTEN M, et al. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. *Tuber Lung Dis* 1994; 75: 1-7.
- 12.- OVCHINNIKOV Y A, et al. Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase nucleotide substitution in the  $\beta$ -subunit gene of rifampicin resistant *rpoB255* mutant. *Mol Gen Genet* 1993; 84: 536-8.
- 13.- TELENTI A, IMBODEN P, MARCHESI F, LOWRIE D, COLE S, COLSTON M J, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341: 647-50.
- 14.- GOYAL M, SHAW R J, BANERJEE D K, COKER R J, ROBERTSON B D, YOUNG D B. Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 1997; 10: 1120-4.
- 15.- VAN EMBDEN J D, CAVE M D, CRAWFORD J T, DALE J W, EISENACH K D, GICQUEL B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-9.
- 16.- CAMINERO J A, PENA M J, CAMPOS-HERRERO M I, RODRÍGUEZ J C, GARCÍA I, CABRERA P, et al. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1165-70.
- 17.- BURMAN W J, REVES R R. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1390-5.
- 18.- FARGA V. Hacia la erradicación de la Tuberculosis. *Rev Chil Enf Respir* 2006; 22: 55-67.

## Comentario del Editor

En este artículo el Dr. Pablo Marcone argumenta en forma persuasiva sobre la necesidad de introducir las modernas técnicas de la biología molecular para perfeccionar las acciones del Programa de Control de la Tuberculosis en Chile.

En mi opinión, en una escala de prioridades, debería favorecerse primero la implementación de las técnicas de la llamada **Epidemiología Molecular**, que mediante la medición de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimorfa (RFLP según sus siglas en inglés), permiten identificar las distintas cepas micobacterianas. En el estado actual en que está nuestro Programa se hace necesario conocer mejor los variables genotipos de nuestro enemigo, el *M. tuberculosis* y sus mecanismos de transmisión.

En segundo lugar, por su sencillez, cabría introducir las técnicas de la biología molecular para el diagnóstico de la **resistencia a la Rifampicina**. Aunque su principal indicación es más bien clínica, sería de gran ayuda en el manejo de los enfermos sospechosos de tener algún grado de resistencia bacteriana, especialmente los "antes tratados" y los contactos de casos con tuberculosis multirresistente.

Las técnicas para el **diagnóstico de los infectados** con el bacilo de Koch de alto riesgo de desarrollar la enfermedad, con el objeto de someterlos a quimioprofilaxis, tienen muchas ventajas frente a la Reacción de Tuberculina o PPD. Su implementación en nuestro medio dependerá de su perfeccionamiento y de la disminución de

sus costos a medida que su aplicación se haga más universal.

Por fin, los avances en el **diagnóstico de la tuberculosis** basados en las técnicas de PCR y sus derivados, aunque son fascinantes, aun no demuestran su total potencialidad en los casos en que serían más necesarios, es decir en los pacientes con baciloscopías negativas (niños, formas extrapulmonares y tuberculosis menos avanzadas). Sin embargo, dado su gran potencial, es inevitable que su aplicación en amplia escala se vaya haciendo, más pronto que tarde, inevitable.

En mi opinión, las técnicas de la epidemiología molecular deberían centralizarse en el Instituto de Salud Pública. Las modernas técnicas de medición de la resistencia a la Rifampicina y de diagnóstico de la infección tuberculosa, deberían irse aplicando, con el apoyo y coordinación del Instituto de Salud Pública, en los principales hospitales de Santiago y provincias. Por fin, las técnicas de biología molecular para el diagnóstico de la tuberculosis, tarde o temprano, en forma natural, invadirán todos los laboratorios de los principales hospitales de Chile.

No cabe duda que aparte de su utilidad presente, dados sus grandes potenciales, todas las técnicas de la biología molecular se irán implementando progresivamente en nuestro medio. Sólo así estaremos en condiciones de aprovechar oportunamente sus ventajas, con criterio de salud pública, a medida que se sigan perfeccionando y se hagan más accesibles.

---

Correspondencia a:  
Pablo Marcone E.  
J. M. Infante N° 717. Piso 3.  
E-mail: pablomarcl@yahoo.com