

## LA TUBERCULOSIS VISTA CON EL LENTE DE APROXIMACION DE LA BIOLOGIA MOLECULAR

LUCIA BARRERA

*Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires*

**Resumen** La secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* posibilitó un proceso de investigación sistemática y el progreso en el conocimiento de la biología del bacilo, aunque el origen de su virulencia y patogenicidad permanece todavía un tanto críptico. La ingeniería genética no ha logrado aún diseñar armas más efectivas o convenientes que las ya conocidas para el control de la tuberculosis. Ni las variedades del bacilo creadas por recombinación o mutación, ni sus antígenos o ADN, resultaron inmunógenos significativamente mejores que la vacuna BCG. Por el momento tampoco es productiva la búsqueda de nuevos blancos vulnerables del microorganismo ni de antibióticos más activos, apenas se está avanzando en el camino de mejorar la fórmula o vía de administración de las drogas convencionales. En cambio sí se han desarrollado herramientas ingeniosas y poderosas para optimizar el rastreo epidemiológico y el diagnóstico de la enfermedad. El hallazgo de marcadores moleculares de cepas del bacilo consolidó la investigación de la diseminación del microorganismo, y permitió descubrir que algunos de sus linajes se expanden y prevalecen en determinados nichos ecológicos. Los métodos moleculares resultaron certeros para caracterizar en forma inmediata bacilos detectados por baciloscopia o por cultivo y le dieron mayor alcance y precisión al diagnóstico rápido, determinante en el caso de pacientes inmunosuprimidos y con tuberculosis multirresistente. Para que tengan significado lógico y cierto, los resultados de los estudios moleculares deben ser respaldados por la microbiología, patología clínica y epidemiología tradicionales.

**Abstract** *Tuberculosis focused through the molecular biology zoom.* The sequence of *Mycobacterium tuberculosis* genome set up a process of systematic research and improved the understanding of the microorganism biology, albeit the clues of its virulence and pathogenicity still remain rather cryptic. Genetic engineering did not succeed in designing more effective or convenient tools to accomplish the control of tuberculosis. Neither the bacillus variants created by mutagenesis and recombination nor the microorganism subunits (antigens, DNA) proved to be significantly better than the BCG vaccine as immunogens. Likewise, the search for novel bacterial targets and more active antibiotics has been unfruitful thus far, even though some advance in drugs formula or delivery systems is in progress. Conversely, new and ingenious instruments have been developed to optimize the epidemiological tracing and diagnosis of the disease. The finding of strain molecular markers consolidated the investigation of tuberculosis spread and revealed the expansion and prevalence of certain lineages of the bacillus in some ecological niches. Molecular methods are specific to immediately characterize the bacilli detected by microscopy or culture which resulted in rapid diagnosis build-up. This improvement is decisive for immunodepressed patients and those affected by multidrug-resistant tuberculosis. To be meaningful and precise the results produced by molecular investigations must be properly backed up by conventional microbiology, pathology and epidemiology.

**Key words:** tuberculosis, molecular biology

### Conocimiento básico

La sinergia entre genética y bioinformática llevó a integrar y completar la secuencia de todo el genoma de una cepa de laboratorio (H37RV)<sup>1</sup> y de un aislamiento clínico de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>2-3</sup>. Al ser uno de los primeros veinte genomas de microorganismos conocidos, integró el hito que marcó el inicio de una nueva forma de investigación. Código en mano, los traductores e intérpretes contemporáneos, organizados en consorcios internacionales, hacen análisis comparativos, relacionan las secuencias en familias, predicen la función y expresi-

ón de cada gen en base a lo conocido de secuencias similares y construyen proteomas, e identifican las secuencias propias de cada genoma. Las bases de datos genéticos, públicas o accesibles por suscripción, y el software especialmente diseñado para la búsqueda y análisis de esos datos, catalizan la vertiginosa producción de conocimiento. Seguramente los resultados de este análisis teórico tienen escaso error, pero necesitan ser confirmados con experimentación biológica en el ambiente natural del microorganismo<sup>4</sup>.

Muy extenso, el cromosoma del bacilo está integrado por cerca de 4.4 millones de bases y 4 000 genes, con alto contenido de citosina-guanina (lo que se traduce en una composición peculiar de aminoácidos), rico en ADN repetitivo (particularmente en secuencias de inserción) y joven en términos de evolución o inusualmente inerte

(quizás por contar con un sistema muy fidedigno de replicación de ADN)<sup>2</sup>. Lo decodificado hasta el momento está de acuerdo con lo que se conocía del bacilo. El hallazgo de que una proporción relativamente alta de genes se transcribe con polaridad distinta a la de la replicación contribuye a explicar la lenta replicación del germen. La predominancia y diversidad de enzimas que actúan en la biosíntesis y biodegradación de todos los lípidos conocidos pone en evidencia la maquinaria que posibilita la síntesis y mantenimiento de la pared, que protege y distingue al microorganismo. Una gran ductilidad en el metabolismo y una gran capacidad para sintetizar proteínas dedicadas a la óxido-reducción, al transporte de oxígeno y al almacenamiento, justifican la resistencia del bacilo en el granuloma, en microaerobiosis, frente al stress oxidativo generado por células fagocíticas o ante la limitación de nutrientes<sup>1</sup>.

Las moléculas semánticas, particularmente el ARN ribosomal, parecen evidenciar que el bacilo de la tuberculosis tuvo ancestros de vida libre, y que su progenitor directo fue el bacilo que causa tuberculosis en el ganado bovino, del cual derivó cuando el hombre comenzó a convivir con el ganado y domesticarlo<sup>5</sup>. Adquirió características que lo adaptaron como parásito y patógeno del hombre. ¿Dónde y cómo guardó la información incorporada durante este aprendizaje? Siguiendo una corriente de investigación microbiológica, últimamente se ha puesto mucho interés en la identificación de las bases moleculares de la virulencia y latencia del bacilo. Esenciales para la patogenia y sobrevivencia del microorganismo, son investigadas con el afán de encontrar inmunógenos efectivos, reactivos inmunodiagnósticos y blancos para nuevos antibióticos. Para este fin se ha intentado modificar sus genes y examinar los efectos que esos cambios generan. Pero esta estrategia no resultó fácil: así como en el ambiente natural el bacilo es hermético y no intercambia material genético con otros microorganismos, en el experimental es refractario a ser manipulado genéticamente. Quizás se logren mayores avances con métodos no invasivos del germen. Por ejemplo, utilizando "chips" con una enorme cantidad de sondas (segmentos seleccionados de ADN) para capturar e identificar el ARN que el bacilo produce, y por lo tanto los genes que expresa durante los procesos patogénicos o en el pasaje al estado durmiente.

Se han identificado tres genes asociados a la virulencia: el *sigA* que al mutar atenúa al bacilo, el *mce* que le permite invadir a los macrófagos, y el *katG* que codifica una enzima capaz de desintegrar moléculas oxidativas producidas por el fagocito. Presumiblemente la pared tiene un rol decisivo en la patogénesis, pero al ser tan compleja no resulta sencillo identificar los genes críticos entre los que gobiernan su síntesis<sup>1</sup>. Probablemente la capacidad que tiene el bacilo de degradar gran variedad de lípidos le permite no sólo mantener su pared sino,

también, desintegrar membranas o vacuolas celulares de los fagocitos de su hospedador. Pareciera que la virulencia es multifactorial más que dependiente de una única instrucción genética.

Estos estudios se limitan a bacilos que pueden ser aislados a partir de muestras de pacientes con tuberculosis. Nada se sabe acerca de los que causan sólo infección o tuberculosis contenida, no recuperables por cultivo. Quizás tengan diferencias que marquen distintos grados de virulencia en la especie.

Parece ser mucho y sustancial lo que resta develar del proceso patogénico que desencadena el bacilo. Muy pocas piezas han sido descubiertas después de que la inmunología identificara la mayor parte de los antígenos del bacilo y de los mediadores, moduladores y efectores de la respuesta inmune. Aunque sí se están diferenciando *subsets* de esas piezas, detallando sus estructuras, armando el cronograma de reconocimiento e inmunodominancia de cada una de ellas y precisando los procesos de los que son responsables. Probablemente el progreso más notable se esté dando en el campo de la "sociología" celular. Se están conociendo los mediadores de la unión del microorganismo con las células del hombre, el maravilloso sistema "táctil" de comunicación y reconocimiento intercelular, y las moléculas cuya expresión está estimulada por la interacción. Además se están describiendo los mecanismos por los que pueden llegar a morir el microbio y las células del hospedador enfrentadas<sup>6</sup>. Y se está avanzando en el conocimiento de las secuencias genéticas que dan origen a esas moléculas.

Quedan por identificar los factores genéticos del hombre que lo hacen naturalmente susceptible o resistente a la enfermedad. A diferencia de lo que sucede en el modelo murino, donde un gen parece gobernar la resistencia, en el hombre todo es más difuso. Ninguno de los genes investigados resultaron ser determinantes categóricos<sup>7</sup>.

## Epidemiología

La bacteriología no puede demostrar con certeza si dos o más aislamientos clínicos del bacilo descienden de un mismo progenitor. La biología molecular avanzó decididamente sobre esta cuestión al descubrir que el número y ubicación en el cromosoma de ciertas secuencias de ADN, móviles y repetitivas, pueden conformar una "huella digital" propia de cada cepa<sup>8</sup>. Se discute todavía la cantidad y tipo de información genética que debe integrar esa huella para que sea un documento de identidad, pero se están produciendo definiciones claves. El hallazgo modificó totalmente la forma de rastrear la diseminación del bacilo y descubrió un velo que impedía ver cómo distintos linajes se movilizan y logran prevalecer en determinados nichos ecológicos.

Los elementos repetitivos del ADN parecen brindar plasticidad genética al microorganismo y serían, por lo tanto, valiosa fuente de información filogenética. Muchos están agrupados, lo que sugiere que prefieren determinadas zonas del cromosoma para insertarse. Se polemiza acerca de la dinámica con la que se transponen, multiplican o escinden<sup>9</sup>. Pero la disposición general que presentan en un determinado momento de la evolución parece mantenerse en sincronía con la escala de tiempo de los sucesos epidemiológicos que requieren ser investigados en el campo de la salud pública.

Entre esos elementos repetitivos está la denominada IS6110, secuencia de inserción que no tiene expresión o función conocida. Se encuentra en casi todos los aislamientos de *M. tuberculosis* y al parecer ya estaba presente cuando se originó la especie. Su distribución en el cromosoma resultó ser uno de los mejores marcadores hasta ahora conocidos para distinguir cepas del bacilo. Se ha estandarizado un protocolo de *fingerprinting* que revela la presencia y disposición de la IS6110 en el cromosoma, de manera que resulten comparables los resultados obtenidos internacionalmente. Excepcionalmente, se encuentran cepas con muy poca movilidad de esta secuencia y, por lo tanto con pocas repeticiones de ella. En estas circunstancias es necesario recurrir a marcadores secundarios, independientes. Aun así y aun cuando se están buscando alternativas más sencillas y rápidas, el *fingerprinting* de IS6110 se ha establecido como el método de referencia y es el más utilizado en investigaciones aplicadas para certificar la transmisión del bacilo entre convivientes o contactos. Las conclusiones fueron, en ocasiones, un tanto obvias y podrían haber surgido de la simple observación, deducción y aplicación de la epidemiología y microbiología convencionales. Pero en estos desafíos se estableció el valor epidemiológico del método.

Un ejemplo sobresaliente fue la demostración de cómo la emergencia de multirresistencia a drogas antituberculosas de esta década ha sido producto de la intervención del hombre. Para facilitar el manejo clínico de pacientes con tuberculosis multirresistente, se generalizó la práctica de internarlos en hospitales especializados de referencia, a veces sin condiciones adecuadas de contención de infección respiratoria. Comúnmente ubicados en grandes urbes donde prevalece la infección por el HIV, estos nosocomios concentran también la atención de pacientes afectados por el virus. Allí, los enfermos tuberculosos son involuntarios transmisores de bacilos multirresistentes y los receptores que enferman son, principalmente, los pacientes con SIDA que conviven en el mismo predio. Algunas cepas multirresistentes encontraron así un nicho ideal para diseminarse rápidamente y originaron dramáticos brotes<sup>10</sup> de los que nuestro país no está exento<sup>11, 12, 13</sup>. En estos hospitales, el *fingerprinting*, proveyó la prueba final de la transmisión

nosocomial e identificó los casos involucrados. Pero el fenómeno había sido expuesto y explicado mucho antes, fundamentalmente por el patrón de sensibilidad de los aislamientos del bacilo que se sucedían en cada institución.

Aunque menos impactante, es mayor la utilidad del *fingerprinting* cuando es aplicado para investigar la transmisión de bacilos sin particularidades fenotípicas, indistinguibles por métodos microbiológicos. Puede ser un ejemplo la investigación de fuentes y rutas de contaminaciones, normalmente producidas por el uso común de equipos o soluciones en las prácticas médicas o de laboratorio. La incongruencia entre los resultados del laboratorio y la evolución clínica de algún paciente puede hacer conjeturar que existió una contaminación aunque, sorprendentemente, detrás de un episodio pueden quedar expuestos varios más no sospechados. Así se ha conocido que el sobrediagnóstico por este error es más frecuente que lo esperado, y se ha resaltado la importancia de analizar críticamente los resultados del cultivo que es considerado el método de diagnóstico de máxima precisión<sup>14, 15</sup>.

El *fingerprinting* también permitió investigar vías de transmisión en comunidades abiertas. Las cepas que afectan personas que se mantienen relacionadas por compartir un background étnico-cultural<sup>16, 17, 18</sup> o generacional<sup>19</sup> tienen mayor grado de similitud que las de grupos no relacionados. Tal observación no hace más que corroborar que la tuberculosis se transmite más entre contactos. La escasa interrelación entre nativos e inmigrantes puede explicar por qué en San Francisco, Estados Unidos, se evidenció que es más probable que un inmigrante se contagie de un nativo que a la inversa<sup>17</sup>, invalidando el preconcepto de que, en países desarrollados, son los inmigrantes de países con alta prevalencia de tuberculosis la principal fuente de infección para toda la población. Parece no ser así, al menos cuando existe un buen programa de control.

Los genotipos de las cepas de bacilos son también más homogéneos en poblaciones humanas con alta prevalencia de la enfermedad, lo que sería evidencia de que se están transmitiendo activamente. Por el contrario, donde la situación está más controlada, la diversidad es mayor, lo que expondría que se están produciendo reactivaciones endógenas de infecciones causadas en el pasado por distintas cepas<sup>20, 21</sup>.

Las imágenes de las "huellas digitales" estandarizadas están siendo archivadas en bases de datos internacionales. Y a partir de ellas, la epidemiología molecular está comenzando a delinear vías y dinámica de dispersión del bacilo locales, regionales y globales<sup>20</sup>. En el mismo contexto, algunas cepas o familias de cepas prevalecieron por sobre otras con similares características. Así parece haber sucedido en brotes de corta duración o durante la propagación, extendida en el tiempo, en

comunidades con alta incidencia de tuberculosis. Quizás la asociación entre los genotipos epidemiológicos puede contribuir a la comprensión de las ventajas adaptativas que contribuyeron a la expansión y predominancia de algunos linajes del bacilo<sup>21, 22</sup>. Se ha aventurado que la vacunación con BCG podría haber sido un factor de selección<sup>23</sup>.

La tuberculosis fue modelo sobre el que se fundamentó la epidemiología convencional y hoy también es paradigma sobre el que está creciendo la epidemiología molecular. Este conocimiento puede contribuir a mejorar el control de la tuberculosis focalizando los problemas, pero las soluciones siguen dependiendo de las mismas armas tradicionales.

## Control

Sin armas para impedir la infección por el bacilo, o la evolución de esa infección a enfermedad, ni para esterilizar inmediatamente las lesiones que el bacilo origina, el control de la tuberculosis no puede ser alcanzado mediante el empeño intermitente de "campañas". Depende del esfuerzo sostenido que implica identificar y curar a los enfermos, asegurando la administración regular de una terapia prolongada a cada caso que se encuentre. Por la cronicidad de la enfermedad, ese esfuerzo debe ser mantenido por varias generaciones, hasta eliminar las fuentes a partir de las cuales se transmite el microorganismo en la comunidad. Un programa de esta naturaleza requiere no sólo de la asignación de recursos apropiada, sino también de organización y tenacidad comunitarias. Estas actitudes no están comúnmente instaladas en los países no desarrollados, donde se concentra la población más susceptible por desvalida. Y allí la tuberculosis persiste y prevalece. Estas falencias sociales también parecen ser crónicas y por eso existe la demanda de alguna nueva táctica de control más realista. Los ojos se dirigen expectantes hacia las promesas de cada avance tecnológico, ayer el de la inmunología, hoy el de la biología molecular: nuevas vacunas, nuevos reactivos de diagnóstico, nuevos antibióticos...

## Vacuna

Se puede llegar a la idea de que la prevención por vacunación sería la única intervención que lograría el control global de la tuberculosis. Pero no se cuenta con una vacuna útil para este fin. La BCG, capaz de evitar diseminación del bacilo a partir del pulmón, no previene eficazmente la tuberculosis pulmonar<sup>24, 25</sup>.

Para superar a la BCG no se pudo recurrir al uso de bacilos muertos porque no despiertan suficiente inmunidad celular: los antígenos secretados por el microorga-

nismo vivo son el blanco preferido de las células T. Por otra parte, ha sido difícil avanzar por la vía de obtener gérmenes atenuados dado el pobre conocimiento que se tiene de los factores que le otorgan o pueden quitarle virulencia al bacilo de la tuberculosis. Al comparar su genoma con el de su pariente muy semejante, BCG, se evidenciaron algunas deleciones que podrían contribuir a dilucidar el proceso de atenuación logrado durante el desarrollo de la vacuna<sup>26</sup>.

El avance técnico aplicado a la producción de moléculas, como la recombinación de segmentos codificantes en un huésped bacteriano, y el progreso en la evaluación de la función biológica e inmunológica de esas moléculas, alentaron la puesta en práctica de nuevas estrategias para el desarrollo de un mejor inmunógeno<sup>27, 28</sup>.

La aplicación de subunidades proteicas del agente etiológico purificadas y suplidas con adyuvantes, táctica que resultó exitosa para despertar respuesta humoral protectora contra varias infecciones bacterianas y virales, no fue efectiva para la tuberculosis.

La ingeniería genética se planteó el desafío de agregar o sobreexpresar información genética que codifica la producción de algunos antígenos seleccionados, aun cuando no están identificados con precisión los responsables de estimular la respuesta protectora. Así se recombinó o mutó a la BCG, y a otras micobacterias no virulentas, para que expresen genes auxótrofos de *M. tuberculosis* o de otras especies del género. Más aún, cuando se identificó la propiedad adyuvante del ADN, y en particular la potencialidad que tiene para disparar la producción de interleuquinas que estimulan actividad bactericida y citotóxica, se construyeron e inyectaron plásmidos portadores de genes que codifican antígenos citoplasmáticos del bacilo reconocidos tempranamente (como el antígeno 85) o los de proteínas de stress reconocidas más tardíamente (como el de 65kDa, 36 kDa o el ESAT-6).

Lo cierto es que, hasta ahora, ni las variedades del bacilo recientemente creadas por el hombre (atenuados, recombinados o mutados), ni las subunidades purificadas (proteicas o ADN) han resultado inmunógenos significativamente mejores que BCG. El fracaso en el diseño de una vacuna que provea resistencia a la infección por el bacilo puede ser considerado como una de las mayores frustraciones de la investigación microbiológica.

## Diagnóstico

Es muy difícil detectar bacilos contenidos en una lesión cuando son escasos y más aún cuando están encerrados. Muy raramente pueden ser vistos en el examen microscópico de una muestra de esa lesión, y no siempre pueden ser aislados por cultivo, para lo que es ne-

cesario implementar una rutina especial y laboriosa dado que estos microorganismos tienen requerimientos diferentes de los de las bacterias comunes. Aun cuando el cultivo resulte fructífero, se tarda mucho para detectar los bacilos, identificarlos y determinar su sensibilidad a los antibióticos, porque son longevos y de lenta multiplicación. Demasiado tiempo frente a la urgencia para instaurar o modificar la quimioterapia. Resolver estas limitaciones del diagnóstico bacteriológico fue uno de los primeros objetivos del desarrollo de las técnicas moleculares.

Ciertos segmentos de ADN y ARN, como la mencionada IS6110, son exclusivos del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*). Aun con diferentes fenotipos, resulta difícil encontrar un marcador característico de cada una de estas especies con gran similitud genética<sup>29, 30, 31</sup>. Se intentó amplificar segmentos propios del complejo desde que fue posible multiplicar material genético en un tubo de ensayo. Se aplicaron distintos métodos (identificados por las siglas de sus nombres en inglés que aluden a las enzimas o sistemas que utilizan: PCR, RT-PCR, TMA, LCR, Q $\beta$ RA, SDA). Varios laboratorios desarrollaron sus propios protocolos, utilizaron una gran variedad de *primers* (iniciadores de la replicación) y técnicas de extracción de los ácidos nucleicos contenidos en muestras clínicas, de amplificación y detección de material genético multiplicado. Sometidos a evaluación internacional, estos protocolos resultaron absolutamente insatisfactorios. La industria compró luego las patentes, invirtió en el perfeccionamiento técnico y logró mejorar la precisión diagnóstica, aunque aún no resolvió todos los problemas.

Amplificando segmentos propios del complejo *M. tuberculosis*, se esperaban resultados positivos sólo si había algún bacilo de este tipo en la muestra. Pero en la práctica se produjeron falsos resultados positivos por la contaminación con amplicones (segmentos multiplicados). Fácilmente pueden salir de un vial cuando éste es abierto, permanecen en el ambiente del laboratorio, pueden introducirse en otro vial conteniendo una nueva muestra y originar en ella una señal positiva aun cuando no contenga bacilos. El porcentaje de falsos resultados positivos llega a niveles inaceptables en algunos casos, y con las mejores condiciones (utilizando costosos sistemas de descontaminación y protección de aerosoles, material descartable y áreas de trabajo separadas) es del 2-3%. Además, los ácidos nucleicos de los bacilos son amplificados aun cuando estén muertos, por ejemplo los expectorados por un paciente en proceso de curación o ya curado. Por otra parte, métodos tan sensibles prometían detectar hasta un único bacilo. Sin embargo, en la práctica, la pérdida de material genético que puede ocurrir cuando se lo extrae de una muestra y los inhibidores de la amplificación que pueden estar presentes en el material biológico desbarataron la expecta-

tiva. Se obtienen resultados positivos en casi la totalidad de las muestras ricas en bacilos, con baciloscopia positiva. Pero en muestras con pocos microorganismos, detectables sólo por cultivo, la sensibilidad disminuye a la mitad, al menos con sistemas de amplificación de primera generación.

En ese estado de cosas, un resultado discordante de la amplificación de ácidos nucleicos no debería modificar la conducta médica frente al paciente con baciloscopia negativa. Con alta sospecha clínica de tuberculosis, no se puede dejar de administrar tratamiento antituberculoso por una prueba de amplificación negativa, sabiendo que la sensibilidad es limitada para detectar estos casos. Si la sospecha clínica de tuberculosis es mínima, se dudará en instituir tratamiento basado en un resultado positivo de la prueba, considerando que en ese grupo de pacientes la probabilidad de tuberculosis es baja y próxima a la de un falso resultado positivo.

Pero la amplificación resultó, desde un inicio, muy útil para identificar una micobacteria en el mismo momento en que es detectada por algún método bacteriológico. Desde antes era posible hacerlo capturando sus ácidos nucleicos con sondas (segmentos específicos de ADN con una marca que las pone de manifiesto), pero sólo si se contaba con un cultivo abundante, porque son necesarios muchos bacilos para que la hibridación sea evidente. La amplificación de ácidos nucleicos específicos permite identificar menor cantidad de gérmenes. Así, es posible determinar si los bacilos vistos en el microscopio o puestos de manifiesto precozmente por algún sensor introducido en un medio de cultivo pertenecen, por ejemplo, al complejo *M. tuberculosis* o al complejo *M. avium-intracellulare* (oportunista frecuente en inmunosuprimidos). Y así orientar, en el mismo día en que se detecta el microorganismo, la terapéutica específica y determinar si es necesario tomar medidas de control de transmisión y de contactos. Esta aplicación es particularmente útil para pacientes con SIDA entre quienes es más probable que ocurra una micobacteriosis diferente a tuberculosis, no tanto para inmunocompetentes entre quienes la presencia de una micobacteria ambiental es una rareza.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, cuatro años atrás la Food and Drug Administration de Estados Unidos, aprobó el uso de un par de equipos de origen comercial que amplifican ácidos nucleicos, para identificar *M. tuberculosis* sólo en muestras respiratorias de pacientes vírgenes de tratamiento con baciloscopia positiva, y para ser utilizados en conjunto con el cultivo<sup>32, 33, 34</sup>. Muchos esfuerzos técnicos se han hecho desde entonces. Algunos sistemas lograron incrementar su sensibilidad, varios incorporaron estrategias para detectar y eliminar inhibidores de la amplificación, y para esterilizar y disminuir la diseminación de amplicones. Se están perfeccionando métodos que realizan toda la reacción

en un único contenedor totalmente cerrado, y se están automatizando los procesos. A la vez se proponen recomendaciones como la de repetir toda prueba positiva y la de realizar la determinación en más de una muestra del paciente toda vez que sea posible, para identificar falsos positivos y a la vez incrementar la detección. Se pretende así superar problemas técnicos, optimizar la precisión y lograr la aprobación también para muestras extrapulmonares y con baciloscopia negativa.

Uno de los primeros intentos para acelerar la detección de *M. tuberculosis* y el estudio de su sensibilidad a los antibióticos se hizo utilizando micobacteriófagos. Son virus que pueden sobrevivir y reproducirse sólo si infectan micobacterias en multiplicación. Una forma de revelar rápidamente si han encontrado un hospedador en un cultivo, es transformando al sistema biológico en una especie de luciérnaga. Se le introduce al virus el gen de luciferasa y si éste encuentra bacilos donde expresar el gen, se sintetiza la enzima. Pocas horas después de la infección, la enzima actúa en una reacción que produce luz si se le suministra el sustrato correspondiente. Así, la luz permite inferir que hay bacilos vivos en el medio mucho antes de que puedan ser detectados visualmente. Y si la luz es emitida en presencia de un antibiótico se deduce que el bacilo resiste a él<sup>35</sup>. La estrategia resultó útil para explorar la actividad de nuevos antibióticos con cepas de laboratorio de *M. tuberculosis*, y está siendo utilizada por la industria, pero no pudo ser generalizada a una gran variedad de aislamientos de origen clínico. No parece sencillo vencer la renuencia del bacilo a incorporar y expresar "cassettes" con información genética<sup>36</sup>. Otra alternativa, por la que últimamente se ha renovado el interés, obvia esta dificultad. Pocas horas después de agregados los fagos a un cultivo, se inactivan químicamente los que quedaron sueltos, mientras que sobreviven los que encontraron e infectaron bacilos viables. Transferidos sobre un agar sembrado con una micobacteria que se multiplica muy rápidamente, *M. smegmatis*, los virus persistentes pueden infectar a esta otra micobacteria y terminan lisándola por lo que aparecen, en uno o dos días, placas sin desarrollo sobre una napa de bacterias. En este caso es la aparición de placas lo que permite inferir que el cultivo inicial contenía bacilos vivos<sup>37, 38</sup>.

A diferencia de otras bacterias que pueden adquirir determinantes de resistencia a antibióticos por intercambio de material genético móvil, no hay evidencia de que algo semejante ocurra con el bacilo de la tuberculosis. De hecho, todas las mutaciones que se han caracterizado como determinantes de resistencias son espontáneas, seleccionadas y fijadas por los antibióticos en el cromosoma, generación tras generación del microorganismo. Se conocen las alteraciones más frecuentes que hacen que el germen resista frente a cada una de las drogas antituberculosas de primera, segunda y tercera

línea<sup>39</sup>. Es posible detectarlas secuenciando y caracterizando los genes involucrados, pero la metodología necesaria para esto pocas veces está disponible en un laboratorio de diagnóstico microbiológico.

Entre la resistencia a los antibióticos la más crucial, porque condiciona el éxito del tratamiento, es la simultánea a rifampicina e isoniacida, es decir la multiresistencia. Es importante detectarla rápidamente para tratar de reorientar la terapia y prevenir estrictamente la transmisión. El 90-95% de los aislamientos resistentes a rifampicina portan mutaciones puntuales en una pequeña región del gen *rpoβ* (codifica una subunidad de la ARN polimerasa) y se conocen las más frecuentes. Frente a este fenómeno, fue posible desarrollar una estrategia simple y práctica para detectarlas. Se pueden ordenar sobre un soporte sólido los segmentos que integran la región del gen tal como están en el germen sensible y, por otra parte, tal como se presentan más frecuentemente en los resistentes. Se puede luego amplificar la misma región de ese gen a partir de un aislamiento clínico, para depositar los amplicones sobre las secuencias inmovilizadas. Si se unen a los segmentos mutados es posible anticipar que ese aislamiento es resistente a la rifampicina. Algunos equipos así diseñados están en evaluación<sup>38</sup>. Dado que se conoce la mayoría pero no la totalidad de las mutaciones asociadas a resistencia, y que los sistemas han sido pensados para detectar las más frecuentes, es posible, aunque poco probable, que un aislamiento sea resistente aun cuando no se evidencie alteración alguna. Por lo tanto, es necesaria la prueba de sensibilidad convencional para confirmar que un aislamiento es sensible. La detección rápida de resistencia a rifampicina es muy útil para el manejo clínico de un caso. Por sí misma suele comprometer el éxito del tratamiento estandarizado y, más aún, normalmente está asociada a la resistencia a isoniacida y es, por lo tanto, un marcador bastante preciso de multiresistencia. Ciertas mutaciones parecen conferir resistencia cruzada a otras rifamicinas<sup>40</sup> por lo que su detección podría predecir la inutilidad terapéutica de drogas análogas. Por ahora, no es igualmente sencillo detectar la resistencia a isoniacida porque el bacilo ha desarrollado una variedad de mecanismos para resistirla. Puede aparecer la alteración de alguno de tres genes: el involucrado en la activación de la isoniacida (*katG*), el que puede detoxificarla (*inhA*) o el que gobierna la producción de una enzima esencial para la elongación de los ácidos grasos de la pared (*ahpC*) y que es blanco de la droga activada. Seguramente restan por identificar otros mecanismos. La alteración del primero de los genes es más frecuente, pero ocurre sólo en aproximadamente la mitad de los casos.

Más allá de la aplicación diagnóstica, es posible que el estudio de las mutaciones que graban la resistencia en la memoria del bacilo podría contribuir a caracterizar

la dinámica poblacional de *M. tuberculosis*, en especial en respuesta a la presión selectiva de las drogas.

De manera que, las pruebas moleculares están siendo perfeccionadas para informar si los bacilos están presentes o ausentes en la muestra de la lesión del paciente. No se puede afirmar que hayan ocupado el lugar de referencia para confirmar o, menos aún, descartar el diagnóstico de tuberculosis. En cambio, resultaron certeras para caracterizar rápidamente bacilos detectados por baciloscopia o por cultivo, aportando mayor alcance y precisión al diagnóstico rápido, determinante en el caso de pacientes inmunosuprimidos y con tuberculosis multirresistente. Complementan pero no reemplazan a los estudios bacteriológicos. Como resultado de ello está creciendo la asociación entre empresas dedicadas al desarrollo de equipos automatizados para lectura de cultivos y para determinaciones moleculares, que apunta a potenciar ambas estrategias combinándolas.

## Terapia

Como casi todos los antibióticos, las drogas antituberculosas fueron descubiertas bastante azarosamente. Primero se conoció su acción letal sobre el bacilo. Más tarde fueron identificadas las funciones vitales que bloqueaban y las moléculas cuya biosíntesis impedían (básicamente los componentes de la pared, ácidos nucleicos y proteínas). Y, recientemente, se conocieron los blancos moleculares que atacan. Algunas tienen amplio espectro porque interactúan con enzimas presentes en varios gérmenes. Otras, son específicas porque interfieren enzimas propias del bacilo (principalmente las involucradas en la síntesis de la pared), o porque son transformadas en antibióticos por enzimas propias del bacilo, o por una combinación de ambos mecanismos<sup>41</sup>.

No bastó con descubrir los antibióticos. Para lograr la cura fueron necesarios más de veinte años de aprendizaje acerca de cómo administrarlos. Se combinaron, para atacar simultáneamente varias funciones vitales del germen y poblaciones del bacilo con distinto grado de actividad biológica. Se prolongó la acción, para aniquilar microorganismos que, en las condiciones letales generadas por la respuesta inmune del hospedador y la quimioterapia, pueden persistir quiescentes minimizando así la exposición de los blancos atacables. Sólo así se conformó un esquema terapéutico específico y efectivo que reduce al mínimo posible el tiempo durante el cual el paciente permanece infeccioso, las recaídas y la resistencia a los antibióticos.

Por complejo, pero sobre todo por prolongado, el esquema resulta de difícil cumplimiento. Y cuando los tratamientos se hacen irregularmente no sólo fracasan en la eliminación de las fuentes de transmisión del bacilo sino que, además, crean una presión selectiva que hace

emerger gérmenes resistentes a los pocos antibióticos efectivos conocidos.

Esta realidad creó la demanda de nuevas drogas que simplifiquen la terapéutica y que sean activas contra los bacilos multirresistentes. No se encontraron. Frecuentemente se argumenta que no las buscaron con suficiente interés los países que tienen medios para hacerlo, porque no están afectados seriamente por tuberculosis. Es una verdad a medias, donde se ha invertido recursos el resultado ha sido magro. Con excepción de las oxazolidinonas, todas las "nuevas" drogas con actividad antituberculosa no son más que viejos antibióticos ligeramente modificados en su estructura química. Tal el caso de los nitroimidazoles y las nuevas rifamicinas, incluyendo la rifapentina recientemente aprobada como alternativa de la rifampicina. Otras ni siquiera son tan activas como las de primera línea, tal el caso de las quinolonas fluoradas. A la vez, se experimenta con liposomas y micropartículas de biopolímeros que encierran y luego liberan los antibióticos continuamente durante un tiempo prolongado, con el fin de espaciar y disminuir el número de ingestas y de reducir la toxicidad<sup>42</sup>.<sup>43</sup>. Se sigue apuntando, en definitiva, a los mismos blancos del bacilo, en el mejor de los casos con ventajas farmacocinéticas por optimización de la fórmula o vía de administración de las drogas convencionales. La introducción de análogos de las drogas en uso no soluciona el problema de la resistencia o sólo lo hace temporalmente, porque los mecanismos que desarrolló el germen para evitar la actividad de un antibiótico son también útiles o se adaptan rápidamente para resistir a sus derivados. Este estancamiento en el descubrimiento de antimicrobianos, quizás más importante pero no restringido al campo de las drogas antituberculosas, ha llevado a augurar el fin de la era antibiótica<sup>44</sup>.

Alternativamente, se intentó coadyuvar la quimioterapia con moléculas moduladoras de la respuesta inmune. Limitados ensayos clínicos en los que se administraron citoquinas amplificadoras, particularmente interferón  $\gamma$ , interleuquina 2 y GM-CSF<sup>42</sup>, dejan la idea de que la inmunoterapia es todavía una aspiración que presenta más dilemas que soluciones. Es difícil controlar y dirigir un fenómeno tan complejo. Una respuesta deficiente lleva a la enfermedad, pero la exacerbada puede causar destrucción tisular irreversible. Al conflicto de la elección de la molécula moduladora, se suma el de la dosis que sea capaz de desencadenar la cascada de respuestas apropiadas con la intensidad apropiada.

Al finalizar la centuria, la búsqueda de nuevos "talones de Aquiles" del bacilo puede encararse por un camino más racional y dirigido, gracias a la potencialidad de la biología molecular<sup>3</sup>. Se trata de identificar genes que codifiquen funciones esenciales, potenciales blancos de nuevos antibióticos. Es especial el interés por interferir factores críticos para la infección, la patogénesis, y la

transformación hacia la quiescencia que le permite persistir al bacilo. El análisis comparativo de los genomas permite inferir si esos blancos están presentes sólo en una especie de microorganismos o en varias, y si están en el hombre. Se orienta así el desarrollo de antibióticos de limitado o amplio espectro que sean, a la vez, no tóxicos. Los recientes avances en el reemplazo y mutación de genes y en la detección de ARN transcripto, proveen estrategias para validar la expresión y la condición de esencial del blanco seleccionado. Una vez diseñados y sintetizados los quimioterápicos, es posible evaluarlos preliminarmente en forma rápida recurriendo al uso de micobacteriófagos, tal como ya fue descrito.

Por otra parte, la terapia génica promete estimular la producción de moduladores de la respuesta inmune en el hospedador, sin necesidad de administrarlos. Y también impedir la expresión de algunos genes o interrumpir procesos vitales del bacilo y hasta introducirle genes suicidas<sup>45</sup>. Queda por demostrar si esto es posible y efectivo.

## Conclusión

La biología molecular parece estar en el proceso de confirmar, explicar, detallar y precisar fenómenos percibidos o conocidos por el hombre desde hace mucho tiempo, cuando aún no contaba con métodos de tanta precisión y alcance. También ha estimulado la generación de conocimiento, fundamentalmente en base a predicciones que surgen del análisis de información contenida en bases de datos. Estas predicciones, que necesitan ser validadas con experimentación, parecen plantear interrogantes más que responderlos con lo que resultan un interesante estímulo del pensamiento.

Aun cuando no se puede menos que admirar las potencialidades de la ingeniería y manipulación genética, se debe reconocer que todavía no han logrado diseñar ninguna vacuna o antibiótico más efectivos o convenientes para el control de la tuberculosis. En cambio sí han provisto herramientas ingeniosas y poderosas para optimizar el diagnóstico rápido y el rastreo epidemiológico.

No parece razonable ni posible reemplazar los métodos convencionales por los moleculares ni para la producción de conocimiento básico, ni para el diagnóstico, ni para el estudio epidemiológico. La microbiología, la patología clínica y la epidemiología tradicionales deben respaldar los resultados de la biología molecular para que adquieran significado lógico y certero.

## Bibliografía

1. Cole ST, Brosch R, Parhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete sequence. *Nature* 1998; 393: 537-54.

2. Mizrahi V, Andersen SJ. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Mol Microbiol* 1998; 29: 1331-9.
3. Moir DT, Shaw KJ, Hare RS, et al. Genomics and antimicrobial drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 439-46.
4. Strauss EJ, Falkow S. Microbial pathogenesis: genomics and beyond. *Science* 1997; 276: 707-12.
5. Stead WW. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med* 1997; 18: 65-77.
6. Schluger NW, Rom WN. The host response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679-91.
7. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998; 338: 640-44.
8. Van Soolingen D, Hemans PWM. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Eur Respir J* 1995; 8: 649s-56s.
9. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3078-9.
10. Fujiwara PI, Sherman LF. Multidrug-resistant tuberculosis: many paths, same truth. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1: 297-8.
11. Aita J, Barrera L, Ritacco V, et al. Hospital transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rosario, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 48-50.
12. Morcillo N, Alito A, Romano MI, et al. Multidrug Resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires. DNA fingerprinting analysis of isolates. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 45-7.
13. Ritacco V, DiLonardo M, Reniero A, et al. Nosocomial spread of HIV-related multidrug resistant tuberculosis in Buenos Aires. *JID* 1997; 176: 637-42.
14. Bauer J, Thomsen VO, Poulsen S, Andersen AB. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 988-91.
15. Van Duin JM, Pijnenburg JEM, van Rijswoud CM, et al. Investigation of cross contamination in a *Mycobacterium tuberculosis* laboratory using IS6110 DNA fingerprinting. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 1: 425-29.
16. Jasmer RM, Ponce de Leon A, Hopewell PC, et al. Tuberculosis in mexican-born persons in San Francisco: reactivation, acquired infection and transmission. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1: 536-41.
17. Chin DPK, DeReimer K, Small PM, et al. Interaction of factors contributing to the incidence of tuberculosis in San Francisco. *Am J Respir Dis Crit Care Med* 1998; 158: 1797-803.
18. Borgdorff MW, Nagelkerke NJD, van Soolingen D, et al. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 187-95.
19. Borgdorff MW, Nagelkerke NJD, van Soolingen D, et al. Transmission of tuberculosis in The Netherlands: an analysis using DNA fingerprinting. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 202-6.
20. Van Soolingen D, Qian L, Haas PWE, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3234-8.
21. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuber-*

- culosis* complex isolates indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9869-74.
22. Rhee JT, Piatek AS, Small PM, et al. Molecular epidemiologic evaluation of transmissibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1764-70.
  23. Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *JID* 1995; 171: 1504-13.
  24. Groves MJ. BCG: the past, present and future of a tuberculosis vaccine. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49 (Suppl 1): 7-15.
  25. Cohn DL. Use of the Bacille Calmette-Guérin vaccination for the prevention of tuberculosis: renewed interest in an old vaccine. *Am J Med Sci* 1997; 313: 372-6.
  26. Brosch R, Gordon SV, Billault A, et al. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing and comparative genomics. *Infect Immunol* 1998; 66: 221-29.
  27. Orme IM. Progress in the development of new vaccines against tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1: 95-100.
  28. Huygen K. DNA vaccines: application to tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 971-8.
  29. Gutiérrez MC, Galán JC, Blázquez J, et al. Molecular markers demonstrate that the first described multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* outbreak was due to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 971-5.
  30. Frothingham R, Strickland BJ, Bretzel G, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1921-6.
  31. Rodríguez JG, Fissantoti JC, del Portillo P, et al. Amplification of a 500 base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2330-2.
  32. American Thoracic Society. Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1804-14.
  33. Centers for Disease Control and Prevention. Nucleic Acid Amplification Tests for Tuberculosis. *MMWR* 1996; 45: 950-2.
  34. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 242-56.
  35. Jacobs WR, Barletta RG, Udani R, et al. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science* 1993; 260: 819-22.
  36. Carrière C, Riska PF, Zimhony O, et al. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3232-9.
  37. Wilson SM, Al-Suwadi Z, McNerney R, et al. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine* 1997; 4: 465-8.
  38. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, et al. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1969-73.
  39. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle Lung Dis* 1998; 79: 3-29.
  40. Williams DL, Spring L, Collins L, et al. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1853-7.
  41. Chopra I, Brennan P. Molecular action of antimycobacterial agents. *Tubercle Lung Dis* 1998; 78: 89-98.
  42. Schraufnagel DE. Tuberculosis treatment for the beginning of the next century. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 651-62.
  43. Barrow ELW, Winchester GA, Staas JK, et al. Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2682-9.
  44. Hancock REW, Knowles D. Are we approaching the end of the antibiotic era? *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 493-4.
  45. Rom WN, Yie T, Tchu-wong K. Development of a suicide gene as a novel approach to killing *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1993-8.

-----

Así como despaciosas son las horas de la infancia, cuando uno se va haciendo viejo, las horas se achican, como un astro que girara cada vez en órbitas más pequeñas, y a mayor velocidad, de modo que los regalos de cumpleaños no se han llegado a gozar cuando ya viene, emboscado, un nuevo aniversario.

Ernesto Sábato

*Antes del fin*. Buenos Aires: Seix Barral, 1998, p 179