



Amplificación de ADN isotérmica mediada por horquillas para el diagnóstico de tuberculosis en el contexto mexicano

Loop-mediated isothermal amplification of DNA for the diagnosis of tuberculosis in the Mexican context.

José Alberto Choreño-Parra,¹ Nayeli Martínez-Zúñiga²

Resumen

La tuberculosis es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo asociadas con un agente infeccioso. Aunque se trata de una enfermedad curable, el control de su diseminación es complicado debido a la dificultad en realizar el diagnóstico y al retraso en el inicio del tratamiento. En años recientes se han desarrollado nuevas tecnologías para detectar a los sujetos enfermos, lo que ha resultado en un repertorio amplio de herramientas diagnósticas. Sin embargo, estas tecnologías tienen alto costo y no están disponibles en la mayor parte de los países en desarrollo. En este contexto, la amplificación isotérmica mediada por horquillas ofrece ventajas sobre otras técnicas para el diagnóstico de tuberculosis en áreas con escasos recursos debido a su bajo costo y sencillez metodológica. La evidencia de su eficacia y precisión posicionan a este método como una opción útil en países como México, donde la mayoría de los pacientes acuden a hospitales periféricos con pobre infraestructura.

PALABRAS CLAVE: Tuberculosis; reacción en cadena de la polimerasa; ADN.

Abstract

Tuberculosis is a leading cause of morbidity and mortality worldwide associated with a single pathogen. Even when it is a curable disease, the control of its dissemination is complicated due of the difficulty in making the diagnosis and delay in starting treatment. Recently, new technologies to detect infected individuals resulting in a broader repertoire of diagnostic methods have been developed. However, such technologies are expensive and not widely available in most of the developing countries. In this context, loop-mediated isothermal amplification of DNA offers advantages over other tools for the diagnosis of tuberculosis in areas with scarce resources due of its lower cost and methodological feasibility. The current evidence of its efficacy and accuracy place this method as a suitable option applicable in countries like Mexico, where most of the patients attend to regional hospitals and peripheral units with poor infrastructure.

KEYWORDS: Tuberculosis; Polymerase chain reaction; DNA.

¹ Laboratorio de Inmunología Clínica I, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

² Banco Nacional de Cerebros, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

Recibido: septiembre 2017

Aceptado: enero 2018

Correspondencia

José Alberto Choreño Parra
chorepr@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Choreño-Parra JA, Martínez-Zúñiga N. Amplificación de ADN isotérmica mediada por horquillas para el diagnóstico de tuberculosis en el contexto mexicano. Med Int Méx. 2018 mayo-junio;34(3):418-422.
DOI: <https://doi.org/10.24245/mim.v34i3.1654>



ANTECEDENTES

La tuberculosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y representa una carga importante para los sistemas de salud de países subdesarrollados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año ocurren 10.4 millones de casos nuevos y 1.8 millones de muertes atribuibles a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, lo que la posiciona como la primera causa de muerte relacionada con un agente patógeno.¹ México es el tercer país con mayor incidencia en América Latina y el número de casos nuevos reportados durante los últimos años permanece por arriba de 16,000.² Aunque se trata de una enfermedad curable, la dificultad en su diagnóstico y el retraso en el inicio del tratamiento han complicado el control de la diseminación de *Mycobacterium tuberculosis*, especialmente en países en vías de desarrollo con escasez de recursos y escaso acceso a los sistemas de salud. En la actualidad, la única forma de prevenir la propagación de la tuberculosis es administrando tratamiento farmacológico a los casos confirmados. Por esta razón se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar nuevos métodos diagnósticos capaces de detectar con precisión individuos con enfermedad activa pulmonar, extrapulmonar o ambas.

Mientras que el cultivo en medios sólidos sigue siendo el patrón de referencia en el diagnóstico de tuberculosis activa, la microscopia con tinción de Ziehl-Neelsen en muestras de esputo es la principal herramienta usada para observar bacilos en países de bajos recursos. No obstante, otros métodos se encuentran cada vez más disponibles en diferentes sitios, como es el caso de la microscopia de fluorescencia con tinción de auramina-rodamina,³ las pruebas rápidas de cultivo en medios líquidos con indicadores de crecimiento de micobacterias (BACTEC/MGIT),⁴ así como diferentes tecnologías de amplificación

de ácidos nucleicos (NAATs) que detectan la infección y de forma simultánea amplifican regiones de resistencia a fármacos.⁵ Sin embargo, muchos de estos nuevos métodos (especialmente el BACTEC/MGIT y los NAATs) son costosos y requieren técnicas complicadas, así como infraestructuras amplias no disponibles en la mayor parte de los laboratorios de hospitales periféricos de países tercermundistas, como ocurren en el caso particular de México, donde la mayoría de los pacientes con tuberculosis activa acuden a unidades de primer nivel de atención y hospitales regionales que sólo cuentan con opciones más baratas, como la baciloscopia y el cultivo, que tienen baja sensibilidad o requieren largos periodos de incubación, respectivamente.

En este contexto, es de mayor importancia el desarrollo de nuevas herramientas que permitan la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en diferentes muestras biológicas de forma rápida, fácil y a bajo costo. Para este propósito, varios grupos en todo el mundo han enfocado sus esfuerzos en probar tecnologías emergentes para determinar su uso potencial en el diagnóstico de tuberculosis. La amplificación de ADN isotérmica mediada por horquillas (LAMP) es una de las técnicas que más han llamado la atención de los investigadores y clínicos en los últimos años debido a su simplicidad metodológica comparada con otras técnicas moleculares y a su alta precisión con respecto a la baciloscopia, lo que ha llevado a la Organización Mundial de la Salud a recomendar su uso como un método que puede reemplazar a la microscopia para el diagnóstico de tuberculosis en regiones subdesarrolladas con alta incidencia de la enfermedad.⁶

Amplificación de ADN isotérmica mediada por horquillas y su papel en el diagnóstico de infección por *Mycobacterium tuberculosis*

La técnica de LAMP la desarrolló y reportó el grupo de Tsuguromi Notomi y colaboradores en

2000.⁷ Se trata de una prueba que permite la amplificación de regiones de ADN bajo condiciones isotérmicas con gran precisión y tiempos cortos de incubación, lo que le confiere ventajas sobre la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y evita la necesidad de termocicladores costosos. Para tal propósito, LAMP usa una polimerasa de ADN con alta actividad de ruptura de la doble cadena y un panel de cuatro cebadores (dos internos y dos externos) que reconocen seis distintas regiones del ADN blanco. El primer paso en la amplificación del ADN es la apertura de la doble cadena, lo que se logra mediante la hibridación sucesiva de los cebadores internos y externos con sus respectivas secuencias blanco en ambas cadenas. El resultado de esta reacción es la ruptura de la doble cadena y la formación de estructuras de ADN en tallo y horquilla que son complementarias a las cadenas originales. Posteriormente, uno de los cebadores internos, que también tiene una secuencia blanco en la horquilla del ADN con forma de tallo-horquilla, se hibrida y se inicia la síntesis de ADN en sentido contrario originando una nueva estructura tallo-horquilla, pero con una longitud mayor. Esta nueva estructura sirve de molde para el segundo cebador interno, produciendo una estructura tallo-horquilla adicional. El ciclo continúa resultando en la acumulación de hasta 10⁹ copias del ADN blanco en menos de una hora.

Debido a la factibilidad de realizar esta reacción en laboratorios periféricos, el uso de la técnica de LAMP ha ido creciendo para el diagnóstico rápido de la infección por diversos patógenos en diferentes contextos. En el caso de la tuberculosis, varios grupos de investigadores han demostrado su utilidad para el diagnóstico de la infección por *M. tuberculosis*, aunque existen ciertas discrepancias en sus resultados porque los reportes de sensibilidad y especificidad varían en intervalos de 68 a 100% y 48 a 100%, respectivamente. Esto se debe, en parte, al escaso poder estadístico de los estudios hasta ahora realizados.

Sin embargo, en un metanálisis reciente en el que se analizaron los resultados de 26 estudios que incluyeron 9330 muestras de esputo, se estimó que la técnica de LAMP tiene sensibilidad de 89.6% y especificidad de 94% con precisión diagnóstica para muestras negativas similar a la PCR y valor predictivo negativo alto, porque un resultado negativo en la prueba LAMP en una muestra de esputo reduce la probabilidad de tuberculosis.⁸ No obstante, los autores observaron que el ensayo comercial recientemente disponible en algunas regiones (Loopamp™ MTBC Detection Kit, EIKEN Chemical Company, Japón) tiene menor sensibilidad cuando se compara con ensayos diseñados por diversos investigadores de forma independiente.

En otro estudio que comparó la precisión del ensayo comercial TB-LAMP con el GeneXpert MTB/RIF y el cultivo BACTEC/MGIT para la detección de *M. tuberculosis* en 285 sujetos de Gambia con síntomas sugerentes de tuberculosis, se demostró que cuando el cultivo se usa como patrón de referencia, el ensayo de TB-LAMP tiene sensibilidad y especificidad similares a los de GeneXpert MTB/RIF.⁹ Estos datos los confirmó una revisión sistemática publicada por la Organización Mundial de la Salud en 2016, en la que además se observó que TB-LAMP es 7 a 13% más sensible que la baciloscopia y puede usarse como una prueba adicional después de un resultado negativo en la microscopia del esputo, porque la técnica TB-LAMP permite detectar casos positivos de tuberculosis que hubieran sido omitidos realizando únicamente baciloscopia.⁶ Además, la técnica de TB-LAMP es más costo-efectiva que GeneXpert MTB/RIF cuando se usa como prueba diagnóstica de rutina en laboratorios periféricos. Éstos reportes han llevado a la Organización Mundial de la Salud a emitir las siguientes recomendaciones para el uso de TB-LAMP en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar: 1) esta prueba puede usarse para sustituir o complementar a la baciloscopia



en adultos con signos y síntomas sugerentes de tuberculosis pulmonar; 2) la técnica TB-LAMP no debe reemplazar a la PCR en contextos de alto riesgo de tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB).

Retos y perspectivas

Aunque se trata de una prueba idónea para el diagnóstico de tuberculosis en adultos en áreas con bajos recursos, la técnica de TB-LAMP aún no ha sido validada para la detección de infección por *M. tuberculosis* en muestras extrapulmonares, como el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la orina. Trabajos recientes demostraron datos esperanzadores acerca del uso de esta herramienta en el contexto de tuberculosis extrapulmonar.^{10,11} No obstante, se requieren estudios más amplios con mayor número de participantes para confirmar estos hallazgos y poder establecer recomendaciones mejor fundamentadas.

Asimismo, la prueba de TB-LAMP no ha sido completamente evaluada en muestras de niños y sujetos con VIH; sin embargo, en la revisión sistemática publicada por la OMS no se encontraron ventajas sobre la baciloscopia en individuos con VIH. Además, debido a la falta de evidencia, las recomendaciones para el uso de TB-LAMP en niños deben ser tomadas de las hechas para el caso de los adultos hasta que existan más datos disponibles.⁶

Un desventaja metodológica es la ocurrencia de falsos positivos en regiones húmedas con temperaturas mayores de 37°C,¹² lo que debe considerarse en países como México, donde la mayoría de los casos ocurre en áreas costeras y regiones al norte con mayor temperatura respecto al centro del país,² porque se requiere mejor capacitación del personal que realizará la prueba. Por último, TB-LAMP no es útil para detectar resistencia a fármacos, por lo que no puede sustituir a GeneXpert MTB/RIF en países

con incidencia alta de infección con cepas MDR.

Aunque en la actualidad GeneXpert MTB/RIF es la mejor herramienta disponible para el diagnóstico de tuberculosis y la detección de resistencia a fármacos en términos de sensibilidad y especificidad, muchos laboratorios periféricos en países con alta prevalencia de tuberculosis y limitada infraestructura permanecen sin ser capaces de realizar una PCR. Por tanto, la prueba TB-LAMP podría representar una nueva opción que debe ser adoptada en países subdesarrollados como México, debido a que ofrece alta precisión y eficacia probada que le confiere ventajas sobre otras herramientas diagnósticas, especialmente en situaciones que requieran un resultado rápido y en casos de alta probabilidad de tuberculosis preprueba. Mientras aumenta la disponibilidad de esta herramienta, las autoridades médicas de los sistemas nacionales de salud y los médicos expertos en el cuidado de los pacientes con tuberculosis deben discutir y analizar de manera más profunda las recomendaciones establecidas por la OMS, con el objetivo de normar el uso de estas tecnologías emergentes y adaptarlas al contexto mexicano. Por último, aún quedan ciertas áreas de incertidumbre respecto al uso de TB-LAMP para el diagnóstico de tuberculosis en poblaciones específicas que deben ser aclaradas, lo que debe representar un estímulo para que los médicos e investigadores mexicanos busquen soluciones a estas controversias mediante la realización de ensayos clínicos y estudios experimentales, aprovechando la alta incidencia de la enfermedad en nuestro país.

Agradecimientos

A Citlaltepétl Salinas Lara del Departamento de Neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez por su lectura crítica y comentarios acerca del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Global Tuberculosis Report 2016. World Health Organization; 2017 [accessed 2017 May 31]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
2. Casos nuevos de tuberculosis Estados Unidos Mexicanos 1990-2016. CENAPRECE, Secretaría de Salud. [accessed 2017 May 31]. Available from: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/8CasosTbTodas16.pdf>
3. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006;6(9):570-81.
4. Palomino JC, Martin A, Von Groll A, Portaels F. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods* 2008;75(2):161-166.
5. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2009;22(2):174-182.
6. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance. World Health Organization; 2016 [accessed 2017 May 31]; Available from: <http://www.who.int/tb/publications/lamp-diagnosis-molecular/en/>
7. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;20(12):e63.
8. Nagai K, Horita N, Yamamoto M, Tsukahara T, Nagakura H, Tashiro K, et al. Diagnostic test accuracy of loop-mediated isothermal amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis*: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:39090.
9. Bojang AL, Mendy FS, Tientcheu LD, et al. Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in The Gambia. *J Infect* 2016;72(3):332-337.
10. Nagdev KJ, Kashyap RS, Parida MM, Kapgate RC, Purohit HJ, Taori GM, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and reliable diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1861-1865.
11. Joon D, Nimesh M, Saluja D. Loop-mediated isothermal amplification as alternative to PCR for the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015;19(8):986-991.
12. Gray CM, et al. Feasibility and operational performance of tuberculosis detection by loop-mediated isothermal amplification platform in decentralized settings: results from a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2016;54(8):1984-1991.

AVISO PARA LOS AUTORES

Medicina Interna de México tiene una nueva plataforma de gestión para envío de artículos. En: **www.revisionporpares.com/index.php/MIM/login** podrá inscribirse en nuestra base de datos administrada por el sistema *Open Journal Systems* (OJS) que ofrece las siguientes ventajas para los autores:

- Subir sus artículos directamente al sistema.
- Conocer, en cualquier momento, el estado de los artículos enviados, es decir, si ya fueron asignados a un revisor, aceptados con o sin cambios, o rechazados.
- Participar en el proceso editorial corrigiendo y modificando sus artículos hasta su aceptación final.