
MONOGRAFÍA

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES

Patricio Retamal M.
 Departamento de Medicina Preventiva Animal
 Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
 Universidad de Chile
 pretamal@uchile.cl

Temario

- * Introducción
- * Biomarcadores
- * Tipificación microbiana
- * Limitaciones de Técnicas moleculares
- * Bibliografía

INTRODUCCION

El sorprendente avance de la biología molecular ha permitido el descubrimiento de nuevas fronteras en la investigación y desarrollo de diversas áreas del conocimiento. Esta evolución ha generado el entendimiento de los procesos biológicos a un nivel básico, celular o molecular, que en el ámbito de la medicina humana y veterinaria se ha incorporado con gran utilidad en el estudio, prevención y control de las enfermedades. Disciplinas como la microbiología, inmunología, patología, genética y epidemiología han sido fuertemente beneficiadas por el impresionante desarrollo de la biología molecular, existiendo en la actualidad un amplio espectro de técnicas para la resolución de múltiples interrogantes en cada una de estas áreas (Schulte, 1999; Cotran, 1999; Hellriegel, 2001; Pfaller, 2001; Porta et al., 2002). El concepto de

«epidemiología molecular» ha sido definido de diversas formas por varios autores, pero el aporte de Schulte (1993) es capaz de expresar en forma muy simple la esencia de esta disciplina: es la incorporación de variables moleculares en la investigación epidemiológica.

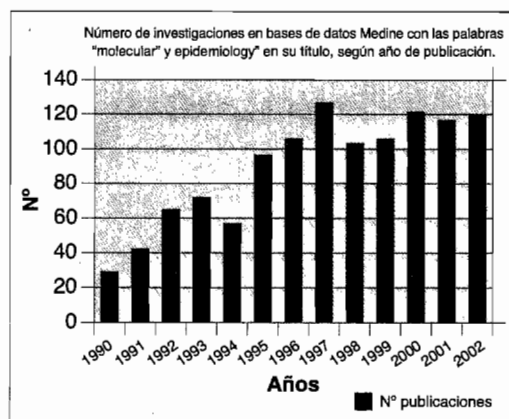
En el lenguaje técnico tales variables corresponden a marcadores biológicos o biomarcadores y se utilizan como herramientas para definir la exposición, susceptibilidad o enfermedad en un proceso patológico (Slattery, 2002). Por lo tanto representan a señales de eventos bioquímicos, moleculares, genéticos, inmunológicos o fisiológicos en sistemas biológicos. Su aplicación no es nueva en la epidemiología, pero recientemente se han definido conceptos, patrones de selección y validación de estos a fin de otorgarles una base científica en su aplicación e interpretación (Schulte 1993).

La epidemiología molecular integra las capacidades de la biología molecular, con mediciones hechas en individuos, en una ciencia que utiliza las evaluaciones de grupos de animales o seres humanos para encontrar las causas de una enfermedad y las formas de prevenirla. No es una ciencia o disciplina distinta de la epidemiología tradicional, sino más bien la aplicación de una serie de herramientas que complementan y refuerzan a esta última en el estudio de los fenómenos poblacionales. Representa la oportunidad de alcanzar un nuevo poder de resolución para desarrollar y verificar teorías de la etiopatogenia de una enfermedad, que expliquen detalladamente las complejas interacciones del proceso salud-enfermedad (Schulte, 1993).

Las enfermedades, al igual que otros procesos biológicos, pueden entenderse como la sucesión de una serie de etapas de complejidad variable que deben ser estudiadas para lograr finalmente el desarrollo de métodos y técnicas que permitan su control y prevención en la población, objetivo final de la investigación epidemiológica. Tal complejidad impone la necesidad de recurrir a múltiples disciplinas, lo que desencadena inevitablemente la incorporación de técnicas moleculares. La aparición de brotes epidémicos, especialmente de enfermedades con un alto impacto sanitario y económico, involucra la participación inmediata de los sistemas de vigilancia e investigación epidemiológica con el objetivo principal de identificar rápidamente al agente, no solo a nivel de género y especie, sino que a nivel de serotipo, subtipo y cepa actuante, establecer los mecanismos de ingreso y evitar la transmisión a otras zonas. La información generada en este proceso es fundamental para determinar las zonas en riesgo y las medidas sanitarias correspondientes y debe ser obtenida a través de un conjunto de técnicas establecidas para la detección de biomarcadores del proceso patológico.

En los últimos 10 años se ha observado una tendencia creciente en la realización de estudios de epidemiología molecular. En la figura se puede observar el número de artículos en cuyo título se encuentran las palabras «molecular» y «epidemiology», según

la base de datos de Medline.



BIOMARCADORES

En la epidemiología tradicional los procesos que transcurren y explican el desarrollo de la enfermedad generalmente no son abordables, existiendo una verdadera caja negra entre la exposición a un agente biológico y sus efectos en el organismo del hospedador. La identificación de biomarcadores permite dilucidar el interior de esa caja negra, incorporando las variables biológicas en la descripción de los procesos patológicos, confiriendo las siguientes potencialidades a la investigación (Schulte, 1993; Koh y col., 1999; Hellriegel, 2001):

- * Delineación de un continuo de eventos entre la exposición a un factor y la enfermedad resultante.
- * Identificación y cuantificación de exposiciones a pequeñas cantidades de un antígeno.
- * Identificación temprana de los eventos que transcurren durante la enfermedad, y a una escala menor.
- * Menor error en la clasificación de variables dependientes e independientes.
- * Identificación de los mecanismos por los cuales se relacionan la exposición y la enfermedad.
- * Mejor evaluación de riesgos individuales y poblacionales.

Existen tres grupos principales de biomarcadores, denominados según el evento que están representando al interior del individuo: marcadores de exposición, de

enfermedad y de susceptibilidad (Schulte, 1993; Koh y col., 1999). Entre los primeros podemos mencionar por ejemplo a los componentes de la respuesta inmune de los animales: anticuerpos, citoquinas, células, etc, quienes son buenos biomarcadores de exposición a antígenos capaces de ser reconocidos por los mecanismos de defensa del hospedador. Entre los biomarcadores de enfermedad se pueden mencionar los niveles sanguíneos de ciertas enzimas (LDH, CK, etc) que implican trastornos funcionales o estructurales de tejidos y órganos. Por último, entre los biomarcadores de susceptibilidad se pueden encontrar secuencias o mutaciones genéticas que determinen un mayor riesgo de presentación de patologías metabólicas, tumorales, etc. (Cotran, 1999; Koh y col., 1999; Perera, 2000).

Para el estudio específico de algún evento, la elección del biomarcador ideal requiere un análisis de validación previo que califique y cuantifique la idoneidad de esta molécula para el estudio en cuestión, y permita por tanto decidir con base científica la mejor alternativa. La validación determinará algunas características básicas de los marcadores que deben ser conocidas antes de su aplicación a estudios epidemiológicos: relación dosis-respuesta, persistencia, variación intra e inter individuos, correlación entre marcadores, y correlación con la manifestación clínica de la enfermedad. Existen cinco criterios fundamentales en los cuales debe basarse un proceso de validación (Schulte y Perera, 1993; Koh y col., 1999).

a) Relevancia Biológica

Este criterio se refiere a la relación biológica que caracteriza al marcador con el proceso en estudio. Implica conocer que punto del continuo exposición - enfermedad se encuentra representado por el biomarcador, y cual es el grado de esta relación.

b) Aspectos farmacocinéticos.

Implican la evaluación de los tejidos y órganos donde deberá investigarse la presencia del marcador, ya que este puede variar su

ubicación al interior del organismo a medida que avanza el fenómeno en estudio.

c) Relevancia temporal

Diferentes marcadores tienen distintas vidas medias en el ambiente biológico. La medición ideal no debe ser demasiado temprana ni demasiado tardía en relación al evento estudiado, ya que puede significar la subestimación de los niveles reales alcanzados por el biomarcador durante la enfermedad.

d) Variabilidad de fondo y variables confundidoras

La variabilidad es el resultado de factores genéticos y ambientales, ya sea aisladamente o en conjunto. Se hace esencial conocer la variabilidad que presenta un biomarcador en la población «normal» a fin de establecer los límites mínimos y máximos que determinarán un estado sano o alterado. Es lo que se conoce como variabilidad de fondo o basal. Entre las variables confundidoras más habituales se pueden mencionar la edad, sexo, raza, dieta, factores genéticos, ambientales, u otras patologías concomitantes.

e) Reproducibilidad, Sensibilidad, Especificidad y Valores predictivos.

Al igual que las pruebas de laboratorio, los biomarcadores deben cumplir con estos criterios de validación para ser seleccionados en cualquier estudio epidemiológico. Deben encontrarse la mayoría de las veces cuando se reproduzca un evento de características similares (reproducibilidad), debe encontrarse en la mayoría de los individuos expuestos, enfermos o susceptibles (sensibilidad), y no en aquellos sanos (especificidad). Tal vez el criterio más determinante en la validez de un marcador es su valor predictivo: un alto porcentaje de los individuos con el biomarcador debe estar cursando efectivamente con el evento en cuestión (valor predictivo positivo) y un alto porcentaje de aquellos sin este marcador debe estar libre del mismo (valor predictivo negativo).

Aunque no es nueva la aplicación de biomarcadores en estudios epidemiológicos, pocas veces se ha considerado un proceso de validación que cumpla con todos los criterios mencionados. Tal deficiencia se ha transformado en uno de los desafíos actuales de este tipo de investigaciones, ya que la detección y análisis de moléculas debidamente caracterizadas permitirá clasificar adecuadamente las variables en estudio, obtener conclusiones confiables y establecer programas óptimos de vigilancia e investigación epidemiológica en poblaciones (Schulte, 1993).

TIPIFICACION MICROBIANA

Uno de los aportes más importantes de la biología molecular es el desarrollo de los métodos de tipificación de agentes infecciosos, tales como bacterias, virus, hongos y protozoos (Pfaller, 2001). La caracterización de estos patógenos es útil para determinar sus relaciones biológicas y genéticas, información de gran importancia para los clínicos, microbiólogos y epidemiólogos comprometidos con la investigación en esta área (Struelens y col., 1998; Tibayrenc, 1998). Por este motivo, las técnicas moleculares de tipificación se han utilizado principalmente en el entendimiento de los procesos evolutivos que explican la biodiversidad de los microorganismos y también en la vigilancia e investigación epidemiológica de las enfermedades que estos causan (Musser, 1996; Struelens y col., 1998; Tybayrenc, 1998; Gupta y Maiden, 2001).

En la investigación de brotes epidémicos la tipificación permite determinar la expansión clonal de un patógeno en el ambiente e identificar la fuente primaria de infección (caso índice). En forma alternativa, la acción de vigilancia epidemiológica debe monitorear la dispersión de un clon y la prevalencia de distintas cepas al interior de una población susceptible, como ayuda en la evaluación periódica de las estrategias de prevención y control o para la detección y monitoreo de infecciones emergentes o reemergentes (Struelens y col., 1998; Pfaller, 1999).

Los métodos de tipificación se clasifican en

dos grandes grupos: fenotípicos y genotípicos. Los primeros corresponden a los métodos tradicionales (Tabla 1) que han sido claves en el desarrollo de la epidemiología bacteriana descriptiva. Sin embargo, usualmente se pueden aplicar solo a los organismos para los cuales han sido desarrollados, son muy variables, complejos, lentos y no siempre discriminan entre las cepas. En cambio las técnicas genotípicas son aplicables al estudio de cualquier microorganismo, entregan información más completa y rápida que las tradicionales, y otorgan un mayor poder de resolución a la tipificación epidemiológica de los agentes infecciosos (Tabla 1) (Struelens y col., 1996; Tenover, 1997; Pfaller, 1999; Gupta y Maiden, 2001).

Tabla 1: Métodos de tipificación de microorganismos utilizados en la investigación Epidemiológica.

Métodos fenotípicos	
<ul style="list-style-type: none"> • Biotificación • Antibiogramas • Serotipificación • Bacteriofagos • Electroforesis de proteínas celulares • Inmunoblot 	
Métodos genotípicos	
De comparación	De clasificación
<ul style="list-style-type: none"> - Análisis de plásmidos - Endonucleasas de restricción - Electroforesis de campos pulsados - Reacción en cadena de la polimerasa con partidores aleatorios (RAPD). 	<ul style="list-style-type: none"> - Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP). - PCR de elementos espaciadores repetitivos. - Amplificación selectiva de fragmentos de restricción genómica. - Patrones de hibridización con oligonucleótidos de alta densidad.

Los avances en el análisis genómico han permitido el desarrollo de pruebas con una sensibilidad y especificidad potencial muy alta, sometidas a la evaluación de una gran cantidad de muestras y siendo aplicables simultáneamente a la detección y caracterización de los microorganismos (Pfaller, 1999; Gupta y Maiden, 2001). Las técnicas de tipificación basadas en el DNA se pueden clasificar en métodos comparativos y métodos de clasificación (Struelens y col., 1998; Pfaller, 1999).

* Métodos comparativos

Utilizados más frecuentemente en investigación de brotes epidémicos, ayudando en el control rápido de la transmisión de infecciones. El objetivo es comparar un número limitado de aislados obtenidos en un corto

período de tiempo, determinando de esta forma la existencia de una epidemia al identificar relaciones clonales entre cepas o bien un suceso esporádico en la ausencia de estas.

* Métodos de estudio y clasificación («library typing systems»)

Son más aplicables a estudios epidemiológicos prospectivos donde los datos son obtenidos y analizados durante un largo período de tiempo (años o décadas). En este caso se requiere el uso de marcadores de cepas microbianas con una nomenclatura estandarizada y con una alta reproducibilidad a lo largo del tiempo y entre laboratorios. Se utilizan también para detectar y monitorear infecciones emergentes y reemergentes.

Los sistemas de tipificación también deben ser sometidos a un proceso de evaluación y validación respondiendo a 2 criterios fundamentales (Struelens y col., 1996): rendimiento (eficacia) y conveniencia (eficiencia). Entre los criterios de rendimiento se encuentran la tipeabilidad, reproducibilidad, estabilidad, poder de discriminación, concordancia epidemiológica y concordancia del sistema de tipificación (Tabla 2). Entre los criterios de conveniencia están la flexibilidad, rapidez, accesibilidad y complejidad del procedimiento.

Tabla 2: Criterios de rendimiento en la evaluación de sistemas de tipificación.

Criterio	Definición	Fórmula
Tipeabilidad (T)	Proporción de cepas que son asignadas a un tipo mediante un sistema de tipificación.	$T = \frac{N_T}{N}$ $N_T = N^{\circ}$ de aislados asignados a un tipo. $N = N^{\circ}$ de aislados testeados.
Reproducibilidad (R)	Habilidad de un sistema de tipificación de asignar una cepa a un mismo tipo de ensayos separados e independientes.	$R = \frac{N_R}{N}$ $N_R = N^{\circ}$ de aislados asignados al mismo tipo en tests separados. $N = N^{\circ}$ de aislados testeados.
Poder de Discriminación (D)	Probabilidad promedio de que un sistema de tipificación asigne a tipos diferentes a dos cepas no relacionadas y reasigne al azar de una población microbiana.	$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S \eta_j(\eta_j - 1)$ $N = N^{\circ}$ de cepas no relacionadas testeadas $S = N^{\circ}$ de tipos diferentes $\eta_j = N^{\circ}$ de cepas provenientes del j° tipo
Concordancia Epidemiológica (E)	Probabilidad de que cepas epidemiológicamente relacionadas sean reconocidas fehacientemente similares para ser clasificadas dentro del mismo clon filotípico.	$E = \frac{N_E}{N}$ $N_E = N^{\circ}$ de cepas asignadas a clones epidémicos. $N = N^{\circ}$ de cepas testeadas desde un brote bien definido.

Los métodos de genotipificación han permitido el estudio de relaciones entre cepas colonizadoras, contaminantes e infectantes, distinguiendo entre procesos de reinfección v/s reagudización de un cuadro y determi-

nando la diseminación de cepas específicas en distintas zonas geográficas (Pfaller, 1999).

La utilidad de las técnicas moleculares de tipificación en la investigación epidemiológica se puede evidenciar con un par de ejemplos. En un estudio realizado por Gutiérrez y col. (1997), se utilizó el método de tipificación de oligonucleótidos espaciadores (espoligotipificación) con el objetivo de caracterizar cepas de *Mycobacterium bovis* aisladas desde varias especies, e identificadas previamente por cualidades fenotípicas. Tal estudio demostró que los aislados de humanos correspondían en su mayoría a cepas del grupo genómico bovino, como era de suponer en base a la epidemiología que caracteriza a esta zoonosis. Sin embargo, se descubrió que tres aislados correspondían al grupo caprino, comprobando la participación de esta especie animal en la transmisión de *M. bovis* a seres humanos. En otro reporte, Knowles y col. (2001) analizaron la cepa del virus de Fiebre Aftosa (FA) causante del brote ocurrido en el Reino Unido a principios del año 2001. Tal estudio incluyó evaluaciones genéticas y geográficas del serotipo O del virus FA, llegando a identificarse como el causante de los brotes documentados desde principios de los 90 en países de Asia, África y Europa. Con esta información se establece la ruta seguida por el virus, los mecanismos más probables de su transmisión y el estatus epidemiológico de pandemia para la cepa actuante.

Los métodos moleculares también pueden ser aplicados a la identificación de genes específicos, como por ejemplo aquellos que causan resistencia a los antibióticos, codifican factores de virulencia, etc., facilitando la decisión terapéutica y el estudio de brotes con estas cepas (Pfaller 1999, 2001).

LIMITACIONES DE LAS TECNICAS MOLECULARES

Entre las desventajas que caracterizan el uso de técnicas moleculares se encuentran el alto costo que significa implementarlas en forma rutinaria, considerando los reactivos, equipos y el adecuado entrenamiento del

personal. En análisis genómicos, la complejidad de los resultados requiere de los investigadores conocimientos de biología molecular y epidemiología, muchas veces con el apoyo de sistemas computacionales que permitan la comparación de diversos patrones. Además, muchas metodologías, nomenclaturas y cepas de referencia aún no se encuentran debidamente validadas y estandarizadas, por lo que es muy difícil comparar resultados obtenidos por distintos procedimientos o por distintos laboratorios (Struelens y col., 1996; Pfaller 1999, 2001).

La progresiva aparición de técnicas genotípicas más rápidas y de bajo costo (Musser, 1996) junto a la habilitación de laboratorios aptos para el desarrollo de estas metodologías, impone la necesidad de trabajar en la solución de las limitaciones mencionadas, ya que la falta de procedimientos estandarizados incrementará enormemente la complejidad en la interpretación y comparación de las pruebas desarrolladas en estas múltiples condiciones.

Es destacable el esfuerzo que realizan diversos investigadores por incorporar y difundir los conceptos de la biología molecular en el estudio de los agentes infecciosos y sus enfermedades, explicar la utilidad e interpretación de la epidemiología molecular en diversos procesos patológicos, así como la implementación, validación, estandarización y diseño de las técnicas y equipos necesarios en su realización (Musser, 1996; Struelens y col., 1996; Tenover y col., 1997; Durr y col., 2000; Thompson y col., 2001).

En nuestro país, el desarrollo de la biotecnología y la masificación de las técnicas moleculares ha generado un incipiente estímulo a la investigación epidemiológica basada en biomarcadores de algunas enfermedades humanas y animales. Sin embargo, la brecha con respecto a naciones desarrolladas es amplia, al igual que las necesidades actuales en el conocimiento de nuestra situación epidemiológica. La formación de especialistas y grupos multidisciplinarios son la base para enfrentar este desafío, situación que debiera abor-

darse progresivamente en los programas de post-grado de las universidades chilenas. Como una primera demostración de esta necesidad, la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Chile ha ofrecido un breve curso de Epidemiología Genética y Molecular en enero de este mismo año, que ha permitido evidenciar la importancia de estas disciplinas y de este tipo de instancias en favor del estado sanitario de nuestras poblaciones.

BIBLIOGRAFIA

COTRAN, R. (1999). Genetic disorders. **En Robbins pathologic basis of basis of disease. 6th ed./ Ramzi S. Cotran, Vinay Kumar, Tucker Collins, p. 139.**

DURR, P.; R. CLIFTON-HADLEY; R. HEWINSON. (2000). Molecular Epidemiology of bovine tuberculosis. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 19, 675-701.**

GUPTA, S.; M. MAIDEN. (2001). Exploring the evolution of diversity in pathogen populations. **Trends in microbiology. 9 181-185.**

GUTIERREZ, M.; S. SAMPER; M. JIMÉNEZ, J. van EMBDEN, J. GARCIA, C. MARTÍN. (1997). Identification by spoligotyping of a caprine genotype in Mycobacterium bovis strains causing human tuberculosis. **J Clin Microbiol. 35, 3328-3330.**

HELLRIEGEL, B. (2001). Immunoepidemiology - bridging the gap between immunology and epidemiology. **Trends in Parasitology. 17, 102-106.**

KOH, D.; A. SEOW; C. ONG. (1999). Applications of new technology in molecular epidemiology and their relevance to occupational medicine. **Occup. Environ. Med. 56, 725-729.**

KNOWLES, N; A. SAMUEL; P. DAVIES; R. KITCHING; A. DONALDSON. (2001). Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in UK caused by a pandemic strain. **The Veterinary Record. 148, 258-259.**

MUSSER, J. (1996). Molecular population genetic analysis of emerged bacterial pathogens: selected insights. **Emerging Infectious Diseases**. 2. 1-17.

PERERA, F. (2000). Molecular Epidemiology: On the path to prevention. **Journal of the National Cancer Institute**. 92, 602-612.

PFALLER, M. (1999). Molecular Epidemiology in the care of patients. **Arch Pathol Lab Med**. 123, 1007-1010.

PFALLER, M. (2001). Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. **Emerging Infectious Diseases**. 7. 312 - 318.

PORTA, M.; N. MALATS; J. VIOQUE; A. CARRATO; M. SOLER; L. RUIZ; V. BARBERÁ; D. AYUDE; F. REAL. (2002). Incomplete overlapping of biological, clinical, and environmental information in molecular epidemiological studies: a variety of causes and a cascade of consequences. **J. Epidemiol. Community Health**. 56. 734-738.

SCHULTE, P. (1993). A Conceptual and Historical Framework for Molecular Epidemiology. **En Molecular Epidemiology : principles and practices**. Schulte y Perera Eds. 4 - 44.

SCHULTE, P.; F. PERERA. (1993). Validation. **En Molecular Epidemiology : principles and practices**. Schulte y Perera Eds. 81 - 109.

SLATTERY, M. (2002). The science and art of molecular epidemiology. **J. Epidemiol. Community Health**. Vol. 56. p 728-729.

STRUELENS, M., and the Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clinical Microbiology and Infection**. 2, 2-11.

STRUELENS, M.; Y. De GHELDRE; A. DEPLANO. (1998). Comparative and library epidemiological typing systems : Outbreak investigations versus surveillance systems. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. 19. 565-569.

TENOVER, F.; R. ARBEIT; R. GOERING. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. 18. 426-439.

THOMPSON, A.; S. LUCCHINI; J. HINTON. (2001). It's easy to build your own microarrayer. **Trends in Microbiology**. 9, 154-156.