



# PIEL

## FORMACION CONTINUADA EN DERMATOLOGIA

[www.elsevier.es/piel](http://www.elsevier.es/piel)



### Técnicas de diagnóstico

## Utilidad de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de las infecciones cutáneas

## Usefulness of molecular biology techniques in the diagnosis of skin infections

Q1 **Fernando Alcaide**

Servicio de Microbiología, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

Fundación de la Unidad de Investigación en Tuberculosis de Barcelona (FUITB), Barcelona, España

Grupo de Estudio de las Infecciones por Micobacterias (GEIM) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), España

### Introducción

Las infecciones cutáneas pueden ser producidas por una amplia variedad de microorganismos que proceden, fundamentalmente, de la propia microbiota de la piel y de las mucosas, aunque también del medio ambiente. Estas infecciones pueden darse a cualquier edad y afectar la piel y los tejidos blandos con una gran variabilidad clínica, etiológica y evolutiva. La mayoría de las infecciones cutáneas no suelen estar asociadas a bacteriemia, y el diagnóstico inicial suele basarse en la clínica, aunque se requiere una confirmación microbiológica en casi todos los casos, y muy especialmente en los pacientes inmunodeprimidos<sup>1,2</sup>.

En general, la identificación del agente infeccioso es esencial para poder realizar un tratamiento adecuado. Para ello, existen los métodos convencionales basados en técnicas microscópicas mediante diversas tinciones y los cultivos, constituyendo el *gold standard* actual. Sin embargo, en diversas infecciones donde el cultivo y las tinciones no son factibles o muy poco rentables, o con tratamientos antimicrobianos previos, se recurre a las técnicas serológicas, si bien este es un diagnóstico indirecto, lento y de difícil valoración en muchas ocasiones. Por ello, en las situaciones donde las técnicas convencionales no son suficientes y/o se requiere un diag-

nóstico rápido, se deberán complementar con métodos moleculares<sup>2,3</sup>.

### Métodos moleculares

Estas técnicas son globalmente bastante sensibles, específicas y rápidas, y cada vez son más sencillas y algo más económicas. Sin embargo, es importante recordar que la detección de ADN no implica necesariamente la viabilidad del microorganismo.

Entre los métodos moleculares se pueden encontrar los caseros (*home-made*) y los comerciales. Normalmente se suelen preferir y recomendar los comerciales por su estandarización, calidad y facilidad de implementación, entre otras ventajas (tabla 1), aunque en diversos casos se debe recurrir a los métodos caseros de técnicas que aún no están comercializadas<sup>4</sup>. En la actualidad existen dos grandes grupos de técnicas moleculares (tabla 2): a) las basadas en hibridación (sondas), que tienen muy buena especificidad pero su sensibilidad es algo más baja y solo están disponibles para un grupo reducido de especies patógenas, requiriendo una orientación inicial para la elección de la sonda adecuada, y b) las que requieren un proceso de amplificación genómica, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros sistemas, de una zona de ADN o ARN concreta (diana).

Correo electrónico: [falcaide@bellvitgehospital.cat](mailto:falcaide@bellvitgehospital.cat)

<https://doi.org/10.1016/j.piel.2018.07.010>

0213-9251/© 2018 Publicado por Elsevier España, S.L.U.

**Tabla 1 – Características diferenciales entre los métodos moleculares caseros y comerciales**

Métodos caseros ( <i>home-made</i> )	Métodos comerciales
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificil estandarización</li> <li>• Manuales (dificil automatización)</li> <li>• Problemas para la comparación entre laboratorios</li> <li>• No recomendados por organismos oficiales (OMS, CDC...)</li> <li>• Implementación más compleja</li> <li>• Más económicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estandarizados. Controles de calidad internos</li> <li>• Capacidad de automatización</li> <li>• Permiten las comparaciones inter-laboratorios</li> <li>• Algunos recomendados por organismos oficiales (OMS, CDC...)</li> <li>• Más fácil implementación</li> <li>• Más caros</li> </ul>
CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (EE.UU.); OMS: Organización Mundial de la Salud.	

Posteriormente se realiza una observación directa de los fragmentos de amplificación obtenidos, o bien un análisis más completo mediante restricción (cada vez menos utilizado), hibridación (p.ej., en tiras de nitrocelulosa o *arrays* donde están inmovilizadas diversas sondas) o secuenciación (de una región concreta o, en un futuro próximo, del genoma completo). Estas técnicas de amplificación genómica son en la actualidad las que presentan un mayor interés y capacidad de desarrollo, ya que tienen, entre otros aspectos, una mayor sensibilidad y la posibilidad de detectar un elevado número de dianas genéticas<sup>3,4</sup>. Sin embargo, estas técnicas también conllevan un riesgo potencial de contaminación en el laboratorio (falsos positivos), y por ello se requiere experiencia y seguir rigurosamente todas las medidas de buenas prácticas en los métodos de diagnóstico molecular<sup>4-6</sup>. En el caso de que las muestras tengan una baja carga microbiana, existe la posibilidad de mejorar la sensibilidad con la incorporación de dos amplificaciones consecutivas, como la *nested*-PCR o bien la PCR en tiempo real, entre otros. Esta última se basa en la realización simultánea de la amplificación de una o varias dianas concretas y el reconocimiento de estas mediante hibridación que, a su vez, son detectadas y cuantificadas mediante el uso de diversos marcadores fluorogénicos<sup>4</sup>. Ello le confiere rapidez, sensibilidad y la posibilidad de cuantificar.

Los métodos de biología molecular en las infecciones de piel y tejidos blandos nos permiten detectar<sup>2,3</sup>: a) microorganismos (bacterias, hongos, virus, e incluso parásitos); b) mecanismos de resistencia a los fármacos más importantes, y c) factores de patogenidad determinantes de la virulencia y también de la formación de *biofilms*.

Un aspecto fundamental y debatido es saber cuándo se deberían utilizar estos métodos moleculares en las infecciones de piel y tejidos blandos. En general existe un cierto consenso sobre sus indicaciones básicas<sup>2,3,7</sup>: a) cuando los microorganismos son de crecimiento lento, de cultivo difícil o imposible,

incluyendo a los pacientes que han recibido tratamiento antimicrobiano previo; b) cuando se disponga de muestras adecuadas, fundamentalmente biopsias de tejido fresco, y c) cuando se requiera un diagnóstico rápido condicionado por la gravedad del paciente o por cuestiones epidemiológicas para el control de una determinada enfermedad contagiosa.

### Diagnóstico de las infecciones bacterianas

Los métodos de biología molecular pueden identificar múltiples géneros y especies bacterianos basados en una PCR y posterior secuenciación de un fragmento del 16S ribosomal. Esta PCR, denominada «panbacteriana», es una prueba universal, aunque no es tan sensible como las técnicas de amplificación de *ADN* más específicas o dirigidas a determinadas especies. En concreto, estas se suelen utilizar en las infecciones cutáneas para la detección de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, micobacterias y espiroquetas (*Borrelia* y *Treponema pallidum*)<sup>2,3,7</sup>. En el caso de *S. aureus* es destacable la detección rápida, mediante PCR a tiempo real, de la bacteria (*ADN*) y de la resistencia a la meticilina (SARM) con una sensibilidad superior al 97-98%<sup>8-10</sup>. Además, existe la posibilidad de identificar factores de virulencia (gen) como la leucocidina de Panton-Valentine (LPV)<sup>11</sup>. Se trata de una exotoxina que puede ser producida por diversos *S. aureus* y que se asocia a infecciones rápidas y graves de la piel, partes blandas y neumonías, con una elevada mortalidad<sup>1,2</sup>.

En el caso de la sífilis secundaria y terciaria el diagnóstico se basa en la serología. Sin embargo, en el primer estadio se requiere la visualización de las espiroquetas mediante microscopía en campo oscuro (baja sensibilidad), o la detección de *ADN* de estas mediante PCR de las lesiones (chancro), con un excelente rendimiento<sup>12</sup>. La PCR es algo menos sensible en la sífilis secundaria, siendo en la terciaria

**Tabla 2 – Características generales de los métodos de diagnóstico moleculares**

Hibridación (sondas de DNA o RNA)	Amplificación de ácidos nucleicos (AAN)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnicas sencillas y rápidas</li> <li>• Marcadas con radioisótopos o enzimas o quimioluminiscentes</li> <li>• Fase líquida, sólida o hibridación <i>in situ</i> (muestras parafinadas)</li> <li>• Especificidad elevada</li> <li>• Sensibilidad baja</li> <li>• →Detección dirigida (diagnóstico de sospecha inicial)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Múltiples técnicas (PCR, RT-PCR, Nested-PCR, Multiplex-PCR, Real time-PCR, Digital-PCR, LCR, NASBA, SDA, LAMP, HDA...)</li> <li>• Numerosas dianas (detección universal-cribado)</li> <li>• Sensibilidad y especificidad elevadas</li> <li>• Pueden ser cuantitativas</li> <li>• Extracción DNA/RNA automatizada (evitar contaminación potencial)</li> <li>• Capacidad de automatización</li> </ul>
HDA: Helicase-Dependent Amplification; LAMP: Loop Mediated Isothermal Amplification; LCR: Ligase Chain Reaction; NASBA: Nucleic Acid Sequence Based Amplification; PCR: Polymerase Chain Reaction; RT-PCR: Reverse Transcription PCR; SDA: Strand Displacement Amplification.	

apenas rentable<sup>12,13</sup>. Por otro lado, las técnicas inmunohistoquímicas a partir de biopsias de tejidos son bastante sensibles en la sífilis primaria, y sobre todo en la secundaria, si bien en las muestras orales la posibilidad de que existan treponemas saprófitos o comensales conlleva la posibilidad de falsos positivos con este tipo de técnicas, teniendo que recurrir a la PCR específica de *T. pallidum*<sup>14</sup>.

En general, la PCR tiene una elevada sensibilidad en los estadios tempranos de las infecciones por *Borrelia*. En la enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) y, en especial, los casos de eritema migrans que clínica e histológicamente no son claros, la PCR estaría indicada con un buen rendimiento (67-71%), a pesar de no existir un método definitivo de referencia<sup>15-17</sup>. Por ello, los resultados moleculares deberían correlacionarse con los hallazgos clínicos y serológicos<sup>3</sup>.

En las infecciones micobacterianas el diagnóstico se basa en el cultivo y la identificación mediante métodos moleculares, ya que la microscopía tiene una sensibilidad muy baja<sup>18</sup>. La detección rápida (PCR) a partir de las muestras tiene en la actualidad múltiples indicaciones en la tuberculosis cutánea y muy especialmente en la lepra, ya que el bacilo de Hansen no se puede cultivar<sup>19,20</sup>. En el caso de las infecciones por micobacterias no tuberculosas o ambientales (MNT; micobacteriosis) habría que tener en cuenta que las PCR universales (basadas en la secuenciación) tienen una buena sensibilidad, aunque algo limitada, y pueden dar falsos positivos (contaminaciones), sobre todo en las muestras parafinadas. En las infecciones por *Mycobacterium marinum* la PCR es un buen método, y junto con el cultivo y la inmunohistoquímica se consigue un elevado rendimiento diagnóstico<sup>21</sup>. En las MNT de crecimiento rápido (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum*, principalmente) la PCR directa de las muestras cutáneas es una técnica complementaria que no supera en sensibilidad al cultivo<sup>22,23</sup>. En la úlcera de Buruli, producida por *Mycobacterium ulcerans*, la PCR tiene una sensibilidad del 54-84% y ha demostrado ser el método de elección en el diagnóstico microbiológico<sup>24</sup>.

## Diagnóstico de las infecciones por virus

La detección de ADN del virus del papiloma humano (VPH) se ha impuesto en los nuevos algoritmos diagnósticos de las diferentes patologías benignas y malignas de cuello uterino y, menos frecuentemente, anal, vaginal y de la cavidad orofaríngea. Incluso en la actualidad se focaliza en la detección individualizada de los genotipos con mayor implicación en estos procesos<sup>25</sup>. No obstante, se han observado detecciones positivas en muestras dérmicas sanas y en pacientes que han curado clínicamente. Por ello, las técnicas moleculares no se aconsejan para la monitorización del tratamiento de estos casos<sup>26</sup>.

En otras infecciones virales, como el poliovirus de las células de Merkel, virus de Epstein-Barr, del herpes simple, varicela zoster y herpes 8, la detección molecular mediante PCR es bastante útil, aunque con múltiples variantes en las que se pueda demostrar la actividad viral y en relación con diversos procesos cancerígenos<sup>24,25</sup>. En general, es preciso interpretar los resultados moleculares junto con la clínica y los hallazgos histopatológicos<sup>26</sup>.

## Puntos clave

- Los métodos moleculares son globalmente bastante sensibles, específicos y rápidos, y cada vez son más sencillos y algo más económicos.
- Se suelen preferir y recomendar los métodos comerciales por su estandarización, calidad y facilidad de implementación, entre otras ventajas.
- Existen métodos de hibridación (sondas) y los basados en la amplificación de diversas dianas del genoma, siendo estos últimos los más utilizados.
- Los métodos de amplificación genómica tienen el riesgo potencial de contaminaciones en el laboratorio y dar posibles resultados positivos falsos.
- Los métodos moleculares permiten detectar microorganismos, mecanismos de resistencia a los fármacos más relevantes y factores de patogenicidad.
- La detección de ADN no implica necesariamente la viabilidad del microorganismo.
- En general, en muchos casos es preciso interpretar los resultados moleculares junto con la clínica y los hallazgos histopatológicos.
- En las infecciones cutáneas bacterianas se suelen utilizar para la detección de *Staphylococcus aureus* (incluido SARM), *Pseudomonas aeruginosa*, micobacterias y espiroquetas (*Borrelia* y *Treponema pallidum*).
- Las técnicas moleculares son muy importantes en las infecciones y procesos tumorales cutáneos por virus, como el del papiloma humano, de Epstein-Barr, del herpes simple, varicela zoster, herpes 8 y poliovirus de las células de Merkel.
- En las infecciones fúngicas se suelen utilizar técnicas de PCR de diversas dianas del ADN ribosomal (18S o ITS rDNA), en especial en pacientes inmunodeprimidos.
- Entre los parásitos destaca la aplicación de los métodos moleculares en la leishmaniasis con un excelente rendimiento.
- En los casos en que no se disponga de muestras de biopsias frescas (de elección) es preciso recurrir a las muestras parafinadas o conservadas en formol, con el riesgo de obtener algunos resultados falsos negativos y positivos.

## Diagnóstico de las infecciones fúngicas

Se suelen utilizar técnicas de PCR basadas en la identificación de diversas dianas del ADN ribosomal (18S o ITS rDNA), en especial en pacientes inmunodeprimidos<sup>27</sup>. Siempre se deberán valorar los resultados moleculares junto con la clínica y los datos histopatológicos, y a veces incluso con métodos microbiológicos convencionales (microscopía y cultivos)<sup>3</sup>.

## Diagnóstico de las infecciones por parásitos

Entre los parásitos destaca la aplicación de los métodos de amplificación genómica en la leishmaniasis. A pesar de la carencia de técnicas comerciales, son útiles para la identi-



cación de la especie y subespecie (93-100%), que es fundamental en la selección del tratamiento más adecuado<sup>28,29</sup>.

## Diagnóstico en muestras parafinadas

En los casos en que no se disponga de muestras de biopsias frescas es preciso recurrir a las muestras parafinadas o conservadas en formol para lograr un diagnóstico etiológico de las infecciones de la piel y tejidos blandos («diagnóstico de rescate»). Ello es especialmente interesante en los patógenos de cultivo difícil o imposible (*M. leprae*, *T. pallidum*, *B. burgdorferi*, etc.). Sin embargo, esto supone un reto en la valoración de los resultados por la presencia de falsos negativos y positivos en bastantes situaciones en las que se utilizan muestras parafinadas. Por ello es preciso seguir rigurosamente los protocolos de buenas prácticas en las técnicas moleculares, utilizar sistemas de extracción y amplificación cerrados y automatizados, y seleccionar adecuadamente los casos (sospecha histológica)<sup>30</sup>. La interpretación final del diagnóstico molecular deberá realizarse junto con las evidencias histológicas y clínicas.

## Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

- Pasternack MS, Swartz MN. Cellulitis, necrotizing fasciitis and subcutaneous tissue infections. En: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editores. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases*. 8 th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2015. p. 1194-1215.
- Moffarah AS, al Mohajer M, Hurwitz BL, Armstrong DG. Skin and soft tissue infections. *Microbiol Spectr*. 2016;4:1-16.
- Kempf W, Flaig MJ, Kutzner H. Molecular diagnosis in infectious skin diseases. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013;11:50-8.
- Nolte FS. Molecular microbiology. En: Jorgensen JH, Pfaller MA, editores. *Manual of clinical microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 54-90.
- Furrows SJ, Ridgway GL. 'Good laboratory practice' in diagnostic laboratories using nucleic acid amplification methods. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:227-9.
- Navarro-San Francisco C, Ruiz-Garrajosa P, Cantón R. The what, when and how in performing and interpreting microbiological diagnostic tests in skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31:104-12.
- Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: Multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *J Clin Microbiol*. 2009;47:823-6.
- Palavecino EL. Rapid methods for detection of MRSA in clinical specimens. *Methods Mol Biol*. 2014;1085:71-83.
- Bouchiat C, Bes M, Bouveyron C, Vandenesch F, Tristan A. Evaluation of the R-Biopharm RIDA<sup>®</sup> GENE Pantone-Valentine leukocidin (PVL) kit for the detection of *Staphylococcus aureus* PVL from pus samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:1905-8.
- Costa-Silva M, Coutinho D, Sobrinho-Simões J, Azevedo F, Lisboa C. Cross-sectional study of *Treponema pallidum* PCR in diagnosis of primary and secondary syphilis. *Int J Dermatol*. 2018;57:46-9.
- Müller H, Eisendle K, Bräuning W, Kutzner H, Cerroni L, Zelger B. Comparative analysis of immunohistochemistry, polymerase chain reaction and focus-floating microscopy for the detection of *Treponema pallidum* in mucocutaneous lesions of primary, secondary and tertiary syphilis. *Br J Dermatol*. 2011;165:50-60.
- Smith JR, Tsang RS, Kadkhoda K. Tonsillar syphilis: An unusual site of infection detected by *Treponema pallidum* PCR. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3089-91.
- Lebech AM, Hansen K, Brandrup F, Clemmensen O, Halkier-Sørensen L. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in clinical specimens from patients with erythema migrans and Lyme neuroborreliosis. *Mol Diagn*. 2000;5:139-50.
- Lager M, Faller M, Wilhelmsson P, Kjelland V, Andreassen A, Dargis R, et al. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato — An analytical comparison of real-time PCR protocols from five different Scandinavian laboratories. *PLoS ONE*. 2017;12:e0185434.
- Wang SH, Pancholi P. Mycobacterial skin and soft tissue infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2014;16:438.
- Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, Navarro JC, et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev*. 2003;74:18-30.
- Marques LÉC, Frota CC, Quetz JDS, Bindá AH, Mota RMS, Pontes MAA, et al. Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases. *Pathog Glob Health*. 2018;112:72-8.
- Sia TY, Taimur S, Blau DM, Lambe J, Ackelsberg J, Yacisin K, et al. Clinical and pathological evaluation of *Mycobacterium marinum* group skin infections associated with fish markets in New York City. *Clin Infect Dis*. 2016;62:590-5.
- Ang P, Rattana-Apiromyaki N, Goh CL. Retrospective study of *Mycobacterium marinum* skin infections. *Int J Dermatol*. 2000;39:343-7.
- Nakanaga K, Hoshino Y, Yotsu RR, Makino M, Ishii N. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous non-tuberculous mycobacterial infections. *J Dermatol*. 2013;40:151-9.
- Guarner J. Buruli ulcer: Review of a neglected skin mycobacterial disease. *J Clin Microbiol*. 2018;56:e01507-17. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01507-17>.
- Mateos Lindemann ML, Pérez-Castro S, Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. En: Cerenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*; 2016.
- Hazard K, Karlsson A, Andersson K, Ekberg H, Dillner J, Forslund O. Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol*. 2007;127:116-9.
- Pulitzer M. Molecular diagnosis of infection-related cancers in dermatopathology. *Semin Cutan Med Surg*. 2012;31:247-57.
- Mertz KD, Pfaltz M, Junt T, Schmid M, Fernandez Figueras MT, Pfaltz K, et al. Merkel cell polyomavirus is present in common warts and carcinoma in situ of the skin. *Hum Pathol*. 2010;41:1369-79.
- Böer A, Herder N, Blödorn-Schlicht N, Steinkraus V, Falk TM. Refining criteria for diagnosis of cutaneous infections caused by herpes viruses through correlation of morphology

- 322 with molecular pathology. Indian J Dermatol Venereol  
323 Leprol. 2006;72:270-5.
- 324 27. Sato T, Takayanagi A, Nagao K, Tomatsu N, Fukui T,  
325 Kawaguchi M, et al. Simple PCR-based DNA microarray  
326 system to identify human pathogenic fungi in skin. J Clin  
327 Microbiol. 2010;48:2357-64.
- 328 28. Gomes AH, Armelin IM, Menon SZ, Pereira-Chioccola VL.  
329 *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from  
330 patients with cutaneous leishmaniasis. Exp Parasitol.  
331 2008;119:319-24.
29. Fagundes A, Schubach A, Paula CC, Bogio A, Antonio LF,  
332 Schiavoni PB, et al. Evaluation of polymerase chain reaction  
333 in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a  
334 referral centre. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:109-12.  
335
30. Sunderkötter C, Becker K, Kutzner H, Meyer T, Blödorn-  
336 Schlicht N, Reischl U, et al. Molecular diagnosis of skin  
337 infections using paraffin-embedded tissue-review and  
338 interdisciplinary consensus. J Dtsch Dermatol Ges.  
339 2018;16:139-47.  
340
- 341

UNCORRECTED PROOF