IV CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Publicación INCAP E-1388

MEMORIAS

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

25-29 NOVIEMBRE 1991

DIAGNOSTICO POR SEPARACION DE MACROMOLECULAS

Olga R. Torres de Matute. Programa de Infección, Nutrición e Inmunología. INCAP

Las técnicas de biología molecular incrementaron la sensibilidad, eficiencia y rapidez del diagnóstico microbiológico al permitir que se aplicaran métodos de alta resolución y discriminación a la solución de problemas para los cuales los métodos tradicionales como serología, identificación microbiológica hasta género y especie, pruebas bioquímicas, patrón de resistencia antibiótica y otros no funcionan. Algunas de estas técnicas son electroforesis de ácidos nucleicos y blots tipo Southern o Northern, uso de enzimas de restricción, secuenciado de ácidos nucleicos y reacción de polimerasa en cadena así como electroforesis de proteínas y Western blots.

Históricamente, la primera aplicación diagnóstica de estas técnicas fue la electroforesis de ácido desoxirribonucleico de plásmidos (pADN) extraído de bacterias implicadas en brotes epidémicos. En muchos casos las bacterias causantes de estos brotes comparten un patrón de plásmidos estable, que se mantiene a lo largo de muchas generaciones y el cual se puede "seguir" para detectar el origen y/o diseminación de las bacterias implicadas en el brote en cuestión. Asimismo, el estudio de genes de resistencia antimicrobiana se ha enriquecido por el estudio de las macromoléculas que la determinan y median.

El fundamento de los métodos es la purificación de macromoléculas celulares (ADN, ácido ribonucleico -ARN- o proteínas) seguida de la separación de las mismas por medio de electroforesis, transferencia a matrices de nitrocelulosa (NC) o nylon, detección por medios radiactivos o enzimáticos y cuando es pertinente, secuenciado y amplificación. En algunos casos puede observarse una diferencia significativa entre el ADN de los microorganismos de interés, simplemente después de correr una electroforesis de los ácidos nucleicos tratados con enzimas de restricción. Estas enzimas reconocen secuencias palindrómicas en la doble hélice del ADN y hacen cortes en ambos extremos de la repetición invertida formando una infinidad de fragmentos de ADN de diferente peso molecular, los cuales se separan por electroforesis dando patrones de separación únicos, que se conocen como "huella digital", las que pueden ser cromosómicas o plasmidias. Sin embargo, en algunos casos el ADN digerido con enzimas de restricción forma patrones muy similares a los de otros microorganismos, requiriéndose de un análisis más discriminante para poder diferenciar entre las muestras, lo cual se logra por

medio del uso de sondas de ADN ó ARN. Las sondas son secuencias específicas que codifican una característica genética de interés para el investigador, tal como resistencia a antibióticos, secuencias propias del ARN ribosomal (rARN) de una especie en particular, factores de patogenicidad y otros. Este fragmento es marcado con moléculas radiactivas o enzimáticas, detectables por métodos colorimé-tricos (fosfatasa alcalina, avidina-biotina) o luminimétricos (luciferasa). Metodológicamente, las sondas pueden aplicarse después de que el ADN separado electroforéticamente se transfiere del gel a una matriz de NC o nylon (blot), donde se desnaturaliza e hibrida con la sonda para finalmente desarrollar el blot y observar si la muestra posee secuencias complemen-tarias con la sonda en cuestión (Blots de Southern). Una alternativa muy usada para el diagnóstico clínico son los "dot blots", en los que no se requiere separación electroforética previa, sino solamente la extracción de ADN contenido en una gota o colonia del cultivo inoculado directamente sobre la membrana de NC o nylon, seguido de la hibridación. Finalmente, hay casos en que las secuencias de interés se encuentran en muy baja concentración, lo que impide o limita su detección por los métodos anteriores, pero la amplificación de tales secuencias por medio de la reacción de polimerasa en cadena (PCR), soluciona dicha limitante y permite visualizar las secuencias de interés aún cuando estén presentes en concentraciones muy bajas, con relativa rapidez, reduciendo los falsos negativos. Para amplificar es necesario secuenciar la región de interés.

Para el estudio de la epidemiología de infecciones por Campylobacter jejuni en niños se han empleado algunas de las técnicas anteriores. El ADN de las bacterias aisladas de niños con o sin diarrea se ha sometido a digestión con la enzima de restricción Bgl II y la comparación de las "huellas digitales" cromosómicas ha permitido agrupar los aislados en ocho patrones diferentes. Esperamos hibridar estas muestras con sondas de rARN de C. jejuni, para analizar los resultados desde esa perspectiva, y compararlos con los patrones electroforéticos de ADN digerido con Bgl II.

Siempre en la misma línea, los antígenos de superficie de cepas de C. jejuni aisladas de infantes amamantados fueron separados por electroforesis de poliacrilamida en geles desnaturalizantes, transferidos a nitrocelulosa y sometidos a reacción con leche materna recolectada al mismo tiempo que la muestra de heces de donde se aisló la bacteria. Esperaríamos encontrar proteínas reconocidas por las leches de madres cuyos hijos excretan C. jejuni asintomáticamente, pero no por las leches de madres cuyos niños padecían de diarrea por C. jejuni, sin

embargo los resultados aún no han sido analizados.

Para el estudio de resistencia a tetraciclina en Enterococcus faecalis se purificó ADN cromosómico de cepas conteniendo el transposón (Tn) conjugativo Tn925 y de bacterias que obtuvieron el Tn 925 por cruces en filtros de membrana tanto de la misma especie como Bacillus subtilis. Se demostró por medio de Southern blots que, cuando el Tn 925 se transfiere isogénicamente (de E. faecalis a E. faecalis) lo hace por conjugación, mientras que al transferirse entre E. faecalis y B. subtilis, lo hace por transposición.