

Investigación de un Brote – Serie de Videos Dr. Max Teplitski

<https://www.youtube.com/playlist?list=PLvgkamPnkczk53-mLCNSaysR8mr4yg1h7>

Transcripción, Video 5: Identificación de la Fuente y de las Huellas Digitales de los Patógenos

Por lo general, la búsqueda de la fuente y de las “huellas digitales” (*fingerprinting*) del patógeno es lo último que se hace en la investigación de un brote. Por ahora, la investigación epidemiológica debería haber ayudado a reducir las posibles causas de los brotes y señalado a los posibles sospechosos. Se debería haber identificado inequívocamente el patógeno de interés utilizando una combinación de las técnicas de cultivo, ácidos nucleicos o las basados en técnicas inmunológicas. Se debería haber identificado el mismo patógeno en los pacientes y en la fuente potencial (alimentos o agua). Las técnicas inmunológicas deberían haber demostrado que los pacientes (e inclusive algunos miembros de la cohorte asintomática) han estado expuestos a ese patógeno. Y a pesar de que todas las pruebas apunten al mismo agente patógeno, recuperado del agua o de alimentos y las muestras de sus pacientes sean del mismo organismo, la prueba definitiva sólo vendrá después de realizados los análisis para establecer las “huellas digitales” de los patógenos.

El método más concluyente para establecer que las cepas del patógeno aislado de la fuente y del paciente son la misma, es llevar a cabo la secuenciación del genoma de los aislados. Los avances tecnológicos hacen de esta una tarea bastante sencilla y asequible, sin embargo, en la actualidad todavía se lleva por lo menos una o dos semanas para llevar a cabo la secuenciación y posterior ensamblado del genoma. En un futuro muy cercano, es probable que sea un proceso mucho más rápido. Es por esto, que hoy en día, los laboratorios tienen que depender de otras tecnologías, como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) o los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para comparar múltiples aislamientos.

El objetivo de ambos PFGE y RFLP es generar un "código de barras" que será único para cada genotipo. Recuerde que PFGE y RFLP no pueden proporcionar información sobre si las cepas están relacionadas o no, pero se puede establecer con una certeza razonable si los dos genotipos son idénticos o no.

Asimismo PFGE y RFLP, necesitan cultivos purificados de los agentes patógenos, libres de otros organismos contaminantes. Esto requerirá de medidas basadas en cultivo que se describieron en el segundo vídeo. PFGE y RFLP son técnicamente difíciles de realizar para organismos no cultivables. Una vez que se ha cultivado el patógeno de interés, será necesario extraer el ADN como hemos comentado en el Tercer Vídeo.

PFGE es una técnica usada por los científicos para generar una “huella digital” de ADN para un aislado bacteriano. El primer paso es el uso de tijeras moleculares, llamados enzimas de restricción, para cortar el ADN bacteriano en ciertas ubicaciones conocidas como sitios de restricción. Esto generará una colección de pequeños fragmentos de ADN, que se separan para generar un patrón que se parece a un código de barras. El procedimiento para PFGE es relativamente similar a la realización de una electroforesis en gel estándar, excepto que en lugar de un constante voltaje en una sola dirección, la tensión se cambia periódicamente en tres direcciones; una que pasa por el eje central del gel y dos que actúan en un ángulo de 60 grados a cada lado. Los tiempos de pulso son iguales para cada dirección, lo que resulta en

una migración neta hacia adelante del ADN. El cambio periódico de la dirección del campo hace que diversas longitudes de ADN reaccionen a ritmos diferentes. Los trozos más grandes de ADN serán más lentos para realinear su carga cuando se cambia la dirección del campo, mientras que pedazos más pequeños lo harán más rápido. Al transcurrir el tiempo y con el cambio constante de direcciones, cada banda comenzará a separarse más y más incluso a muy grandes longitudes. De este modo se hace posible la separación de piezas muy grandes de ADN utilizando PFGE.

RFLP es una técnica menos preferida. Para comparar dos cepas, típicamente todo el ADN genómico se digirió previamente con una enzima de restricción (o dos) para generar un patrón de bandas. Estos patrones pueden ser comparados para determinar si son los mismos. Es razonable plantear la hipótesis de que si dos genomas generan los mismos patrones de bandas, es probable que sean iguales, lo que indicaría un mismo genotipo.

La toma de huellas dactilares es el último paso en la investigación de un brote y permite vincular los patógenos aislados del paciente a posibles fuentes del brote.