

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

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

### Transcripción, Video 3: Métodos Basados en Ácidos Nucleicos para la Detección de Patógenos

Los métodos basados en cultivo son extremadamente útiles para aislar posibles patógenos bacterianos y obtener alguna información preliminar sobre su identidad. Sin embargo, los métodos basados en el cultivo tienen limitaciones inherentes: los virus y patógenos eucariotas no pueden ser cultivados en medios de laboratorio. Por otra parte es difícil cultivar a muchos patógenos bacterianos. Cuando se aprietan las placas (es decir, tienen demasiadas colonias), a menudo es difícil detectar patógenos en el cultivo, porque las colonias formadas por los miembros de la microbiota nativa lo impiden (si por ejemplo se sembraron muestras de heces).

Otra limitación importante de las pruebas basadas en el cultivo es que algunos patógenos, tales como *E. coli* patógena o *Shigella* forman colonias que son muy similares a las de los organismos que no son patógenos. Además, como los fabricantes de medios señalan, algunas bacterias ambientales o miembros benignos de la comunidad microbiana intestinal pueden formar colonias que son muy similares a las formadas por los patógenos. Por lo tanto, hay alto riesgo de falsos positivos y falsos negativos. Técnicas basadas en ácidos nucleicos e inmunológicas serán importantes para resolver estas incertidumbres. Tenga en cuenta que todas estas técnicas tienen limitaciones y no es prudente confiar en una sola técnica para la identificación del patógeno, especialmente durante la investigación de un brote.

Aquí hay una serie de técnicas basadas en ácidos nucleicos. Estas, pueden ayudarle a determinar si un gen particular está presente en la muestra y (a veces) si un gen de interés está siendo expresado o no. Tenga en cuenta que el ADN podría ser bastante estable incluso después de la muerte de las bacterias o su inactivación por tratamientos bacteriostáticos (tales como tetraciclina) o desinfectantes. Además, algunos genes de virulencia bacteriana pueden ser transportados por fagos (bacteriófagos). Como recordarán, los fagos no son virulentos hacia los eucariotas. Por lo tanto, la búsqueda de un gen de virulencia, en particular de una muestra ambiental o en una muestra de un paciente no establece de forma inequívoca que dicho gen pertenezca a un patógeno activo y culpable del brote. Por consiguiente, las pruebas a base de ácidos nucleicos son solamente informativas en combinación con otros métodos para la detección de patógenos.

Para que la detección de patógenos a base de ácidos nucleicos sea eficaz, tenga en cuenta que algunos virus sólo tienen ARN, y no ADN. El ARN no sirve como plantilla en la reacción de PCR, porque se utilizan polimerasas de ADN, las cuales sólo leen ADN. Por lo tanto, el ARN necesita ser primero convertido a ADN complementario (o ADNc) antes de utilizarse para realizar la PCR. Una enzima llamada transcriptasa inversa cataliza la conversión de ARN a ADNc.

No es necesario limitar el PCR de transcripción inversa a la identificación de virus. También se puede utilizar para la detección de patógenos bacterianos y eucariotas activos. Recordemos que a diferencia del ADN, el ARN es extremadamente inestable, su vida-media dentro de las células vivas es muy corta (más o menos como de media hora) y es aún más corta en el medio ambiente. Por lo tanto, la detección basada en ARN podría ser muy útil para la identificación de la vida activa y el metabolismo de los patógenos bacterianos o eucariotas, asimismo podría ser

útil para determinar si los genes de virulencia se expresan dentro de un paciente (asumiendo que tienen las muestras apropiadas).

Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) se pueden aislar a partir de cultivos puros (por ejemplo, si se las arregló para aislar un patógeno con las técnicas basadas en el cultivo) o de muestras complejas, como las heces o sangre, el suelo o los alimentos. Actualmente se encuentran disponibles comercialmente una serie de kits para la extracción de ácidos nucleicos a partir de diversas matrices. Típicamente, el primer paso en la extracción de ácidos nucleicos requiere la lisis de las células, esto se logra ya sea con detergentes (tales como SDS), o enzimas, (tales como la lisozima). Todos los kits utilizados para el aislamiento de ADN requieren el uso de una solución tampón que contiene EDTA, agente quelante que secuestra cationes divalentes. Esto debido a que las enzimas que degradan ácidos nucleicos (nucleasas) requieren cationes divalentes para funcionar, de esta manera, su eliminación con EDTA vuelve inactivas a las nucleasas y así se protege al ADN durante la purificación. Diferentes kits incluyen pasos para la eliminación de proteínas (después de su desnaturalización con disolventes orgánicos o sales), pasando por centrifugación para precipitar las proteínas desnaturalizadas y otros desechos. La solución donde se encuentra el ADN se aplica típicamente sobre un filtro de fibra de vidrio a la que el ADN se unirá. Luego es eluido del filtro de fibra de vidrio con una solución tampón ligeramente alcalina, esto porque el DNA es más soluble y estable en soluciones ligeramente alcalinas.

Los protocolos para la extracción de ARN son bastante similares, con el agregado que, se tiene que ser cuidadoso para evitar que las enzimas que degradan ARN (RNasas), omnipresentes en el medio ambiente y en nuestras manos, pueden degradar el ARN en la muestra. Soluciones especiales, mientras usando plásticos y guantes libres de RNasas tendrán que ser utilizados durante la extracción de ARN. Una vez que el ARN se purifica, tiene que ser transcrito usando la enzima transcriptasa inversa para generar ADNc. La transcriptasa inversa utiliza plantilla de ARN para sintetizar una copia de ADN complementario (ADNc). Recordemos que en eucariotas y bacterias, la ARN polimerasa típicamente lleva a cabo una reacción diferente, la cual utiliza plantilla de ADN para sintetizar ARN.

Una vez que se tenga el ADN (o ADNc), utilícelo en la PCR para detectar la presencia del gen de interés. Cuando se trabaja con agentes patógenos, estamos más interesados en la detección de genes de virulencia. Por ejemplo si se han obtenido colonias de color amarillo de la muestra fecal de un paciente, existen dos posibilidades: que estas sean *E. coli* patógenas o miembros benignos de la comunidad microbiana intestinal. Las pruebas para detectar la presencia de genes de virulencia, tales como stx genes que codifican la toxina Shiga permitirán distinguir entre las dos posibilidades. Todos los patógenos llevan consigo genes de virulencia y es la detección de estos que le permitirán distinguir entre los agentes patógenos y sus familiares no virulentos pero estrechamente relacionados.

En los últimos años, la PCR cuantitativa (qPCR) se ha hecho popular para la detección simultánea y cuantificación de los genes de virulencia. La PCR tradicional se ejecuta durante 30-35 ciclos y el producto se detecta como una banda en un gel. En lugar de la detección de productos de PCR utilizando un gel, la reacción qPCR contiene un colorante fluorescente (o una sonda) que permite medir (en tiempo real) la cantidad de producto que ha sido formado durante la reacción de PCR. En el qPCR al no ser fijo el número de ciclos, se puede medir cuanto tiempo tardó en formarse un producto detectable y así inferir cuanta platilla estaba en la muestra original, la lógica es, a más plantilla presente menor el número de ciclos necesarios, lo que permite derivar que más células del patógeno estaban presentes en la muestra. En el contexto de la investigación de un brote, qPCR es menos útil cuando se utiliza en ADN extraído

de cultivos purificados del patógeno y es más informativo cuando se utiliza con muestras obtenidas de pacientes o de agua, alimentos o medio ambiente.

Como todas las reacciones bioquímicas, las reacciones de PCR a veces fallan. También es posible obtener falsos positivos, por lo tanto, es importante incluir controles positivos y negativos. Si ha diseñado cebadores (*primers*) para amplificar un gen particular, un gran control positivo sería una plantilla que sin duda contiene este objetivo. Respecto a los controles negativos, estos nunca son suficientes. Lo típico es utilizar un control que contiene todos los componentes de las reacciones de PCR (los cebadores, nucleótidos y la enzima polimerasa) y a continuación, la retención de una plantilla. Sin embargo, controles negativos adicionales también serían apropiados. Por ejemplo, el ADN a partir de muestras de individuos que no presentan los síntomas o el ADN de las muestras ambientales que no están vinculados con el brote sería controles negativos informativos.

¿Y si tuviera una gran hipótesis, pero la reacción de PCR fallaste? En otras palabras, todos los controles funcionaron, pero su muestra dio negativo para el gen de virulencia que pensabas esta asociado con el patógeno y el cual provocó el brote? Otra alternativa sería amplificar y secuenciar los genes que están involucrados en la producción de la subunidad pequeña del ribosoma. Todos los organismos tienen ribosomas y todas las bacterias tienen la subunidad 16S ribosomal. Como recordarán, el gen codificante del 16S es muy conservado pero además presenta regiones variables. Las regiones conservadas que flanquean a las variables son los sitios que van a utilizar para diseñar cebadores. La razón es que el diseño de cebadores que universalmente se unen a las regiones conservadas, permitirán la generación de productos de PCR a partir de un gran número de bacterias. La región variables amplificadas suelen ser representativas de especies bacterianas particulares. Se puede mandar a secuenciar para identificar el organismo de interés. Tenga en cuenta que esto sólo funcionará si se tiene un cultivo purificado del potencial patógeno.

Si se utiliza una muestra compleja como plantilla de ADN para las reacciones de PCR, con cebadores que se unen a la región conservada del gen 16S, se terminará con miles, si no millones de productos, que serán representativos de toda la comunidad microbiana en una muestra particular y no sólo de un patógeno, que se está tratando de identificar.