

Utilidad de la biología molecular en el estudio de las zoonosis

Salim Máttar V. Ph.D.

*Universidad de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico,
Montería Córdoba Colombia*

Las técnicas de biología molecular para la detección rápida y directa de ácidos nucleicos de los diferentes microorganismos son muy útiles en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Un gran número de estas técnicas de identificación rápida se han desarrollado con base en la amplificación enzimática de secuencias específicas de ácidos nucleicos; estas técnicas incluyen: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el RFLP (*Restriction Fragment length Polymorphism*), *ribotyping* (ribotipificación), PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic ADN*) Ampliación al azar del ADN y el *Spoligotyping*. Estos nuevos métodos de análisis a nivel genético han aumentado la posibilidad de diferenciar las cepas bacterianas y han permitido llevar a cabo estudios epidemiológicos moleculares. La comparación de cepas para establecer su identidad se basa en el hecho de que las cepas relacionadas epidemiológicamente provienen de la expansión clonal de un precursor único. Se entiende por clon una cepa que ha sido obtenida en forma independiente de una fuente, en diferentes localizaciones o quizás en diferentes tiempos, pero mostrando caracteres fenotípicos y genotípicos muy parecidos, de manera que la explicación más lógica para esta similitud sea un origen común.

El concepto de identidad de los componentes de una clona se ve complicado en la práctica por el hecho de que los microorganismos son genéticamente inestables y acumulan modificaciones de su material genético con cada generación. Estas modificaciones se deben a mutaciones al azar o a fenómenos de recombinación genética como la inserción o delección de elementos móviles como plásmidos, secuencias de inserción o transposones. A esta inestabilidad genética de los microorganismos se la conoce como deriva genética. Así, pues, la clonalidad no es absoluta, sino que está modulada por el tiempo, o sea, la similitud de los componentes de una clona irá cambiando con el tiempo.

Análisis del ADN cromosomal. Cuando se digiere una molécula de ADN con una enzima de restricción se obtiene un número de fragmentos equivalentes a las veces que se encuentra repetido el lugar de restricción a lo largo del cromosoma. Esta frecuencia depende del número de nucleótidos del lugar de restricción, así como de la porción relativa de nucleótidos ATGC del lugar de restricción, en relación con el ADN digerido. Así, la posibilidad de que en una molécula de ADN se dé un lugar de

restricción de 6 pb es de una vez por cada 4.096 pb, mientras que un lugar de restricción de 4 pb se daría cada 256 pb. El tamaño de los fragmentos de restricción traducen la separación entre dos lugares de restricción contiguos. Un cambio por mutación o recombinación, en uno de estos lugares de restricción lo hace irreconocible para la enzima y se traduce en una variación del perfil de los fragmentos de restricción. Este perfil también variará si existen delecciones o inserciones de ADN entre dos lugares de restricción.

La comparación de cepas para establecer su identidad y relación en las enfermedades zoonóticas se basa en el hecho de que las cepas relacionadas epidemiológicamente provienen de la expansión clonal de un precursor único. Se entiende por clon una cepa que ha sido obtenida en forma independiente de una fuente, en diferentes localizaciones o quizás en diferentes tiempos, pero mostrando caracteres fenotípicos y genotípicos muy parecidos, de manera que la explicación más lógica para esta similitud sea un origen común. El concepto de identidad de los componentes de una clona se ve complicado en la práctica por el hecho de que los microorganismos son genéticamente inestables y acumulan modificaciones de su material genético con cada generación. Estas modificaciones se deben a mutaciones al azar o a fenómenos de recombinación genética como la inserción o delección de elementos móviles como plásmidos, secuencias de inserción o transposones. A esta inestabilidad genética de los microorganismos se la conoce como deriva genética. Así, pues, *la clonalidad no es absoluta*, sino que está modulada por el tiempo, o sea, la similitud de los componentes de una clona irá cambiando con el tiempo.

Análisis del ADN cromosomal

Cuando se digiere una molécula de ADN con una enzima de restricción se obtiene un número de fragmentos equivalentes a las veces que se encuentra repetido el lugar de restricción a

lo largo del cromosoma. Esta frecuencia depende del número de nucleótidos del lugar de restricción, así como de la porción relativa de nucleótidos ATGC del lugar de restricción, en relación con el ADN digerido. El tamaño de los fragmentos de restricción traducen la separación entre dos lugares de restricción contiguos. Un cambio por mutación o recombinación, en uno de estos lugares de restricción lo hace irreconocible para la enzima y se traduce en una variación del perfil de los fragmentos de restricción. Este perfil también variará si existen delecciones o inserciones de ADN entre dos lugares de restricción. Los fragmentos de gran tamaño (> 40 pb) conseguidos con una digestión con enzimas de baja frecuencia de corte comigran en una única banda en la electroforesis convencional y han de separarse con técnicas electroforéticas especiales como la electroforesis de campo pulsado (PFGE). Se obtiene perfiles con pocas bandas que son fácilmente comparables entre sí. A pesar de que se utilizan enzimas que cortan el ADN con baja frecuencia, el hecho de que se explore todo el genoma bacteriano hace que, en general de la PFGE un instrumento útil en la bacteriología molecular.

Utilidad de las técnicas de Biología Molecular en las Zoonosis. Existen numerosos trabajos en donde se aplican estas metodologías para el estudio de las zoonosis. La salmonelosis, las infecciones por *E. coli* 0157: H7, la brucelosis, borreliosis y rickettsiosis entre otras. Nos detendremos a explicar las técnicas de biología molecular más importantes como la PFGE, la ribotipificación, RAPD y el RFLP.

Análisis de microorganismos por RFLPs.

Una alternativa para simplificar la interpretación de los RFLPs de ADN total consiste en centrarse en una zona concreta del genoma en lugar de estudiar todo el cromosoma. Para ello, se realiza una transferencia de los fragmentos de restricción del ADN cromosomal obtenido con una enzima de frecuencia media de corte y

separados por electroforesis en un gel de agarosa, a una membrana de nylon que se somete a hibridación con una sonda marcada complementaria del fragmento, cuyo polimorfismo se requiere estudiar. El revelado de la hibridación tan sólo pondrá en evidencia aquellos fragmentos que contengan la totalidad o parte de la secuencia escogida, obteniéndose perfiles con pocas bandas. El número de bandas estará en relación con el número de copias de las secuencias existentes en el genoma, mientras que su polimorfismo estará relacionado con su distribución a lo largo del genoma, así como con las variaciones en los sitios de restricción dentro de esta secuencia y en las regiones más próximas.

Ribotipificación. Desde 1970 el polimorfismo dentro y alrededor del ARNr de *E. coli* ha sido identificado y caracterizado. La demostración que la ubicuidad y el polimorfismo del loci *rrn* estén altamente conservadas en el reino Eubacteria condujo a la idea para usar la secuencia del ARN ribosomal (ARNr) de *E. coli* como una sonda universal para estudios de patrones de restricción en propósitos taxonómico. Posteriormente se desarrolló el concepto de sonda universal, demostrando su utilidad para estudios epidemiológicos y se llamo ribotipificación. La ribotipificación consiste en someter a hibridación el ADN genómico de una bacteria digerido con una enzima de restricción y transferido a una membrana contra una sonda que sea complementaria a la secuencia de ADN de los genes del ARNr.

Actualmente las sondas más utilizadas son de ADN, estas pueden ser ADN cromosómico sintetizado directamente de rARN mediante transcripción reversa. Por otra parte el rARN de *E. coli* no es la única sonda heteróloga que puede ser usada para el estudio de otras especies, algunos trabajos han preferido usar sondas homólogas derivadas de las secuencias rARN específicas del organismo que se vaya a estudiar, como han mostrado estudios hechos con *Mycoplasma spp*, *E. coli* O157: H7, *Brucella*,

Leptospira, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacteriodes* y *Listeria monocytogenes* entre otros.

El procedimiento para llevar a cabo la ribotipificación consiste básicamente en usar de 3 a 20 ml de caldo de un cultivo bacteriano realizar la lisis de las células bacterianas contenidas en este caldo. Las proteínas son eliminadas mediante un tratamiento con proteinasa K en presencia de sodio dodecyl sulfato y/o por extracción con fenol cloroformo. Finalmente el ADN es precipitado con etanol o isopropanol; posteriormente es secado y resuspendido en un buffer con baja fuerza iónica; el ADN es entonces digerido con enzimas de restricción y los fragmentos generados son separados según el tamaño mediante electroforesis sobre una membrana de gel de agarosa. El análisis por enzimas de restricción requiere del ADN puro, libre de la contaminación por proteínas.

De acuerdo con el procedimiento clásico de *Southern*, el ADN es transferido a una membrana de nylon y entonces es hibridado mediante una sonda marcada. En la ribotipificación se usan sondas marcadas que contienen secuencias 23s, 16s y 5s de rARN de *E. coli*, pero la naturaleza y el modo de marcaje varían. Nuestros resultados en estudios de salmonelosis y zoonosis en Colombia han demostrado el gran poder de discriminación del *ribotyping*.

Análisis de microorganismos por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE). El principio de la electroforesis de campo pulsado se basa en que primero es aplicado un campo eléctrico (E1) al gel, entonces hebras de ADN, el cual se ha cortado con enzimas de restricción, éstas se elongan en la dirección del campo eléctrico y comienzan a migrar en el gel, por los cambios periódicos en el campo eléctrico. Este primer campo es entonces removido y un segundo campo (E2) en ángulo con el primer campo, es activado. El ADN debe cambiar la conformación y la reorientación antes de comenzar a migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta

reorientación varía de acuerdo al peso molecular de la muestra. La PFGE separa fragmentos cromosómicos que no pueden ser separados por el método convencional uni-direccional de electroforesis. El límite de la electroforesis convencional es su ineficiencia para separar secuencias de ADN con un tamaño mayor de 50kb.

Las técnicas moleculares para el análisis de ADN cromosomal como el PFGE han demostrado ser un método eficiente para resolver divergencias entre las diferentes cepas y ha sido bastante utilizado en el estudio epidemiológico de las mismas. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es una de las técnicas más modernas utilizadas en estudios epidemiológicos, ya que es capaz de separar fragmentos de 10 kpb hasta 10.000 kpb y por esta razón ha demostrado ser altamente discriminatoria para estudios epidemiológicos por su habilidad para diferenciar intra-especies de aislados bacterianos en estudios epidemiológicos de zoonosis. Los estudios sugieren que PFGE es una técnica útil en la diferenciación de cepas provenientes de animales y del hombre y que puede complementar otras técnicas moleculares para propósitos epidemiológicos, para prevención y control de importantes infecciones bacterianas. Este método es además, fácilmente reproducible, relativamente estable y rápido en comparación con métodos que requieren hibridaciones de ADN. Nosotros demostramos su utilidad en Colombia en cepas de *Salmonella* y recientemente con *E. coli* O157.

RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN). Ampliación al azar del ADN. Esta técnica esta basada en la amplificación del genoma/ADN usando *primers* o iniciadores sencillos sobre una secuencia nucleotida al azar. Estos *primers* producen una amplificación al azar de uno o más *loci* impredecibles; en ese sentido la técnica de PCR genera una serie de fragmentos de ADN que pueden ser utilizados para comparar poblaciones bacterianas o razas entre si. La técnica de RAPD ha sido usada

exitosamente en cepas de *E. coli* O157:H7 y ha permitido relacionar y diferenciar cepas aisladas de brotes así como cepas provenientes de animales para demostrar zoonosis. La técnica de RAPD es sensible y eficiente como la ribotipificación, la PFGE y el análisis multienzimático. La técnica de RAPD es capaz de diferenciar intraserotipos de *E. coli* enterotoxigenico, enteropatógeno y enterohemorrágico. Los análisis realizados por nosotros muestran fragmentos polimórficos entre 4, 8 y 12 bandas usando tres *primers* diferentes. En estudios realizados por nuestro grupo de investigación hemos encontrado 10 fragmentos amplificados de ADN, permitiendo un buen análisis de polimorfismo. En resumen, la técnica de RAPD es una herramienta útil en la epidemiología molecular ya que es capaz de detectar polimorfismos de ADN. El análisis de ADN de cepas que ocasionan casos de zoonosis y brotes epidemiológicos infecciosos pueden entonces ser estudiados con la técnica de RAPD por su sencillez y bajo costo.

En resumen: los métodos de biología molecular proporcionan la posibilidad de identificar y relacionar clonalmente el origen de los aislados humanos, animales y distinguir entre las cepas asociadas con epidemias. Estas técnicas deben ser utilizadas en los laboratorios para la vigilancia de las diferentes zoonosis como la salmonelosis, leptospirosis, rickettsiosis, brucelosis, listeriosis, TBC, campylobacteriosis y *E. coli* O157 entre otros. Esta claro que el uso de las técnicas de biología molecular proporciona ayuda a las autoridades de la salud pública para implementar medidas preventivas adecuadas y a tiempo. El desarrollo de la PFGE, RFLP, RAPD y ribotipificación han demostrado ser métodos eficaces en la diferenciación de microorganismos, su principal utilidad radica en su alto poder discriminatorio de clones en una misma especie, su capacidad para dilucidar el origen filogenético de microorganismos y su excelente aplicación en el estudio de las zoonosis.

REFERENCIAS

1. Máttar S, Vásquez E. Emerging infectious caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Colombia (letter). *Emerging Infectious disease*. 1998; 4:11-
2. Diaz ML, Máttar S, Chalá MS. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* isolated from children with infectious diarrhoea in Bogotá, D.C. Colombia. *Medical Science Research* 1998;26:711-14
3. Poutou R, Mattar S. RAPD fingerprinting of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Santafe de Bogotá. *Med Sci Res* 2000;28:29-32
4. Máttar S, Benavides M, Alarcon S, Garzon L, Moreno M. Investigación epidemiológica sobre la prevalencia de *E.coli* O157:H7 en humanos, bovinos y productos cárnicos en Colombia. *Enferm Infecc y Microbiol (Mex)* 1998:18:45-50.
5. Cuesta J, Mattar S, Visbal J. Molecular typing of *E. coli* O157:H7 isolates in Colombia. *Med Sci Res* 2000 submitted.
6. Mendez I, Mattar S, Visbal J. Molecular analysis of *S. enterica*.; *Med Sci Res* 2000; submitted.
7. Gerhardt, Murray and Wood. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM Press Washington USA, 1997.

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

POSTGRADOS

- Especialización en Producción Bovina Tropical.
- Especialización en Fauna Silvestre.
- Diplomado en Tecnología de la leche.
- Diplomado en Laboratorio Clínico Veterinario.