

106
Zij



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**APLICACIONES DE LA REACCION EN CADENA DE
LA POLIMERASA (PCR) EN EL DIAGNOSTICO POR
EL LABORATORIO DE ENFERMEDADES
BACTERIANAS**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA:
MANUEL ROMAN SAAVEDRA TREJO**



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

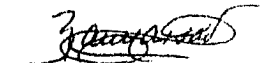
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Elda Peniche Quintana
Vocal: Prof. Raúl Garza Velasco
Secretario: Prof. Abel Gutiérrez Ramos
1er. Suplente: Prof. Antonio Castillo Durán
2do. Suplente: Prof. Marco Antonio Becerril Flores

El tema fue desarrollado en diversas bibliotecas del sector salud y de la U.N.A.M.



Asesor:
Q.F.B. Raúl Garza Velasco



Sustentante:
Manuel Román Saavedra Trejo

Esta Tesis está dedicada a:

Mi Madre, Margie y Oralia.

" Descubrir lo desconocido no es una especialidad de Simbad, de Erteo el Rojo o de Copérnico. No hay un sólo hombre que no sea un descubridor. Empieza descubriendo lo amargo, lo salado, lo cóncavo, lo liso, lo áspero, los siete colores del arco y las veintitantas letras del alfabeto; pasa por los rostros, los mapas, los animales y los astros; concluye por la duda o por la fe y por la certidumbre casi total de su propia ignorancia. "

Jorge Luis Borges, Atlas.

El presente trabajo fue realizado
con la supervisión académica del
Q.F.B. Raúl Garza Velasco,
cuya orientación y guía lo hizo posible.

Agradecimientos

• Josefa Haydee Aguilera Rendón⊕ • Oralia Alvarado Aguilera • Nelson Angulo Zetina • Sandra Balladares Macedo • José Alexandro Bonifaz Trujillo • Verónica Bustos Monterrosas • Matilde Cabrera Montoya • Arturo Calderón Flores • Rafael Castillo Bocanegra • Lourdes Cervantes Ayala • Alma Delia Cortés Pérez • Cecilia De La Vega Góngora • Saturnino De León Chapa • Marcela Fariás González • Susana Flores Almazán • Miguel Angel Flores Sánchez • Rebecca Franco y Bourland • Raúl Garza Velasco • Rocío Godoy Becerril • Alicia Gutiérrez Murillo • Abel Gutiérrez Ramos • Homero Hernández Montes • Claudine Irlés Machuca • Eduardo infante Montaño • Margarita López Fernández • Mónica López Fernández • Angela López Giral • Marisol López López • Beatriz Luna Milián • Consuelo Martínez Gigena • Giovanni Argel Mendoza Trejo • Nancy Monroy Jaramillo • Eduardo Pacheco Mendoza • Elda Peniche Quintana • Patricia Pidal Schaffer • Erika Alejandra Polanco Frías • Ricardo Rajsbaum Gorodezky • Ingrid Ramírez David • Itzel Ramos Solís • Mitzi Rodríguez Lizana • José Guillermo Sánchez Martínez • Angel Daniel Santana Vargas • Irma Silva Zolezzi • Leticia Solís Gutiérrez • Dalia Torres Frausto • Carmen Trejo Aguilera • Guadalupe Trejo Aguilera • Jorge Luis Trejo Aguilera • Mario Alberto Trejo Aguilera⊕ • Mario Lucio Trejo Peralta⊕ • Miguel Angel Trejo Aguilera • Oralia Trejo Aguilera • Ma. de Lourdes Zavala Trejo

Y especialmente a
Marcela López Fernández

GRACIAS

ÍNDICE

Introducción	1
Objetivos	4
1. Generalidades acerca de la bacteriología diagnóstica clásica	5
1.1. Examen microscópico	7
1.2. Pruebas bioquímicas	8
1.3. Pruebas inmunológicas	12
2. Reacción en cadena de la DNA polimerasa I (PCR)	
2.1. Muestras clínicas a analizar	14
Biopsia gástrica	15
Exudados, esputo y lavado bronquio alveolar	16
Saliva	18
Heces	19
Sangre	20
Orina y sedimento urinario.	22
2.2. Obtención del DNA bacteriano	23
Lisis bacteriana por congelamiento/descongelamiento	24
Lisis bacteriana por congelamiento/ebullición	24
Ebullición con Chelex 100	24
Extracción con fenol:cloroformo y precipitación en etanol	26
Extracción salina y precipitación en etanol	29
2.3. Conceptos teóricos y principales reactivos	30
Fundamentos de la PCR	38
Secuencia blanco u objetivo	42
Iniciadores para la amplificación del DNA (<i>Primers</i>)	43
DNA Polimerasa I termo estable	47
Desoxirribonucleótidos	48
Iones magnesio	49

Amortiguador de reacción	49
Cosolventes	50
Cubierta de aceite mineral	50
Parámetros de reacción	51
Controles	53
Limitaciones de la PCR	55
Protocolo básico para la PCR	56
Organización en el laboratorio	60
3. Identificación y análisis del DNA amplificado	62
Detección en geles de agarosa-bromuro de etidio	62
<i>Southern-blot</i> y sondas radioactivas	66
Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP)	69
Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)	73
Marcaje con biotina o digoxigenina (DIG) y detección inmunoenzimática	75
4. La PCR en el diagnóstico de enfermedades bacterianas del humano	81
<i>Bordetella pertussis</i>	85
<i>Staphylococcus aureus</i>	86
<i>Streptococcus pyogenes</i>	88
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	89
<i>Listeria monocytogenes</i>	90
<i>Neisseria meningitidis</i>	90
Enterobacterias	91
<i>Escherichia coli</i>	92
<i>Salmonella typhi</i>	93
<i>Shigella dysenteriae</i>	94
<i>Vibrio cholerae</i>	95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95
<i>Haemophilus influenzae</i>	96
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	97

<i>Borrelia burgdorferi</i>	98
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100
<i>Chlamydia trachomatis</i>	101
Conclusiones	115
Referencias bibliográficas	117
Apéndice	
A) Definición de términos	129
B) Reactivos y soluciones	138

Lista de tablas y gráficas

Figura 1. Diagnóstico de enfermedades infecciosas por el laboratorio	6
Figura 2. Técnica de secuenciación de DNA según Sanger	34
Figura 3. Secuenciación de DNA (continuación)	35
Figura 4. Secuenciación de DNA (continuación)	35
Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
Figura 6. Formación del enlace fosfodiéster mediante la DNA polimerasa	39
Figura 7. Programa de temperaturas de un termociclador de PCR	40
Figura 8. Estructuras secundarias de los iniciadores	44
Figura 9. Programa de diseño de los iniciadores	46
Figura 10. Molécula de etidio (EthBr)	63
Figura 11. Transferencia del DNA para <i>Southern-blot</i>	67
Figura 12. Mapa de restricción obtenido por análisis de RFLP	72
Figura 13. Sonda marcada con biotina	77
Figura 14. Captura por hibridación en sandwich	79
Figura 15. Flujo de la información genética	130

Figura 16. Bases nitrogenadas, enlace fosfodiéster y complementariedad	134
Figura 17. Identificación de secuencias específicas mediante sondas marcadas	137
Tabla 1. Examen microscópico	7
Tabla 2. Pruebas bioquímicas	8
Tabla 3. Pruebas inmunológicas	12
Tabla 4. Composición típica de una reacción de PCR	59
Tabla 5. Concentración apropiada de agarosa para separar fragmentos de DNA de diferente tamaño	65
Tabla 6. Secuencias de reconocimiento de algunas enzimas de restricción	70
Tabla 7. Comparación de la PCR con la prueba de ELISA en el diagnóstico de la clamidiasis	103
Tabla 8. Bacterias patógenas para el hombre: secuencias de iniciadores para PCR, DNA blanco, tamaño del producto amplificado y método de detección	104
Tabla 9. Parámetros de PCR para amplificar secuencias únicas de DNA para la detección de bacterias patógenas	111
Tabla 10. Concentraciones de los ácidos y bases de uso común	139

Introducción

El diagnóstico microbiológico por el laboratorio tiene como propósito principal el de contribuir con el equipo de salud en la determinación del tratamiento óptimo de los padecimientos infecciosos, a fin de que los enfermos recuperen la salud a la brevedad posible y, consecuentemente, que no funjan como focos de contagio para otros individuos.

En general, el diagnóstico y tratamiento oportunos resultan de vital importancia para neutralizar los procesos patológicos: tanto la mortalidad como la morbilidad se reducen significativamente cuando la terapia adecuada inicia en forma temprana; en este sentido, el médico requiere de la información asociada a diversas fuentes para establecer un diagnóstico presuntivo o definitivo; evidentemente, entre los datos de mayor interés destacan: la historia clínica y el examen físico, la información epidemiológica (viajes recientes, la exposición a animales o a diversos vectores y las enfermedades ocurridas en familiares o amigos, entre otras), los resultados de las pruebas microbiológicas, inmunológicas, químicas y citológicas de laboratorio y la información derivada de métodos especiales tales como la tomografía computarizada, el ultrasonido y los rayos X.

Cuando se sospecha de una enfermedad infecciosa, la observación microscópica de las muestras (empleando preparaciones en fresco, frotis al Gram o extensiones sometidas a campo oscuro) llegan a aportar información rápida pero, frecuentemente, el agente etiológico no se detecta o se confunde con los integrantes de la microflora propia del organismo, e inclusive, puede quedar "enmascarado" por bacterias oportunistas; por tal motivo, es prácticamente indispensable conocer otros métodos de identificación expedita de agentes etiológicos en los especímenes clínicos.

El método tradicional relacionado con el cultivo microbiológico para la detección de agentes infecciosos específicos, requiere del uso de diversos medios de crecimiento, de condiciones apropiadas de incubación y de la realización de pruebas bioquímicas las cuales, a su vez, pueden requerir de algunos subcultivos en medios específicos. En otras palabras, esta metodología llega a necesitar desde varios días a semanas, dependiendo de la naturaleza del microorganismo involucrado.

Otra alternativa diagnóstica más específica incluye el examen microscópico de las muestras, utilizando anticuerpos (Ac's) poli o monoclonales marcados con un conjugado fluorescente. Sin embargo, en numerosos casos se ha encontrado que los métodos inmunoquímicos incluyen la posibilidad de que ocurran reacciones cruzadas y, por lo tanto, la interpretación de sus resultados positivos suele complicarse, requiriendo de un juicio experto.

Más recientemente, gracias al avance de la biología molecular, se han venido implementando numerosos ensayos diagnósticos basados en la hibridación de ácidos nucleicos con sondas marcadas. De hecho, ya existe una variedad de sondas de DNA que se utilizan rutinariamente en varios laboratorios de diagnóstico, tanto para confirmar los resultados obtenidos mediante cultivo, como para detectar a los patógenos directamente en las muestras clínicas.

No obstante, es importante señalar que aún cuando el desarrollo de métodos de diagnóstico genético-molecular ha permitido una rápida detección de diversos patógenos, algunos de aquéllos carecen de la sensibilidad requerida y, en su mayoría, requieren de información genética específica que no siempre se encuentra disponible.

Hasta finales de 1988, la mayoría de los métodos moleculares de diagnóstico se concentraban en los análisis por *Southern-blot* del DNA y por *Northern-blot* del RNA. En ambos casos, el

problema consiste en sus limitaciones en cuanto a la cantidad de ácido nucleico que requieren, ya que es necesario que las muestras contengan entre uno y varios miles de células microbianas para que se genere una señal detectable.

En este contexto, el reciente desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**) y su aplicación en la detección de patógenos microbianos ha venido demostrando su potencial para cambiar la práctica diagnóstica de las enfermedades infecciosas en los laboratorios de todo el mundo: después de preparada la muestra, la amplificación del DNA resuelve la problemática de falta de sensibilidad y se trata de un método rápido y automatizado.

La PCR es una reacción bioquímica (catalizada por una enzima) en la cual pequeñas cantidades de un segmento específico de DNA se amplifican hasta redituar grandes cantidades de DNA lineal de doble cadena. El método hace posible obtener múltiples copias de casi cualquier segmento de DNA.

En general, el proceso consta de tres etapas:

- (A) Procesamiento de la muestra
- (B) Amplificación del DNA por PCR
- (C) Identificación y análisis del DNA amplificado

Evidentemente, el poder del diagnóstico molecular es consecuencia de dos factores: los ácidos nucleicos pueden ser identificados en forma rápida y sensible, y la elevada especificidad de la secuencia nucleotídica de cada molécula de DNA.

La reacción es fácil de ejecutar; requiere tan sólo de un tubo de reacción, algunos reactivos y una fuente estable de calor. Adicionalmente, el DNA de la muestra que se desea copiar puede encontrarse puro o constituir una pequeña proporción de una mezcla compleja de materiales biológicos. Una vez amplificado, el DNA puede ser identificado por diferentes métodos, los cuales

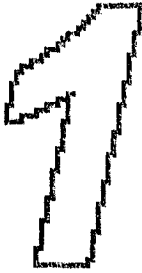
varian desde una simple electroforesis en gel de agarosa, hasta los ensayos inmunogenéticos con sondas y marcadores conjugados a biotina/estreptavidina. No obstante, el método más confiable para reconocer o confirmar la secuencia específica del material amplificado es, al parecer, el *Southern-blot*, que utiliza sondas apropiadas de oligonucleótidos.

Los numerosos estudios sobre PCR-*Southern blot* han demostrado ampliamente su elevada especificidad y sensibilidad para detectar a los diversos patógenos que se encuentran en las muestras clínicas.

Objetivos

- Describir los fundamentos teóricos de la PCR.
- Señalar las variables involucradas en la reacción de amplificación y los efectos que produce su variación.
- Mencionar las principales técnicas para identificar el producto amplificado.
- Describir los aspectos de mayor relevancia en la aplicación de la PCR al diagnóstico de las enfermedades de etiología bacteriana.
- Contrastar las ventajas y limitaciones de la técnica de PCR, en relación con las técnicas utilizadas en el diagnóstico microbiológico e inmunológico de los padecimientos infecciosos.

CAPÍTULO **Generalidades acerca de la bacteriología diagnóstica clásica**



El diagnóstico de laboratorio de una enfermedad infecciosa suele ser el siguiente paso, a partir del diagnóstico diferencial basado en la historia clínica del paciente y en un examen físico, realizado por el médico¹².

En otras palabras, el diagnóstico clínico debe culminar apuntando hacia aquellos microorganismos con mayor probabilidad de ser causantes de la enfermedad y, al mismo tiempo, selecciona los análisis y procedimientos que conducen a la detección del agente causal.

Las enfermedades infecciosas pueden afectar cualquier región anatómica, sistema u órgano, a través de una gran variedad de microorganismos que incluyen bacterias, hongos, parásitos y virus. Por lo tanto, la selección de la muestra a analizar constituye un componente crítico del método diagnóstico⁹.

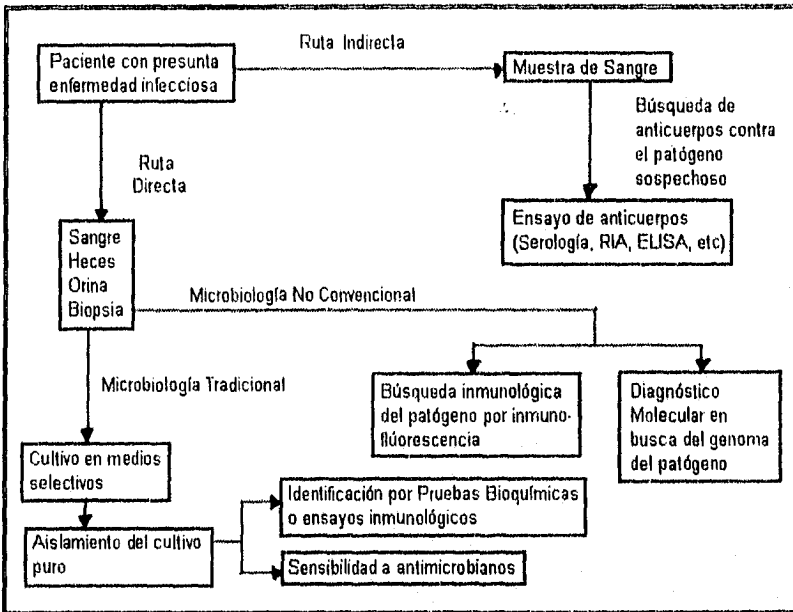
El diagnóstico de las enfermedades infecciosas por el laboratorio se puede dividir en dos ramas principales: La ruta directa y la ruta indirecta¹³.

En la ruta indirecta no se analiza la muestra en busca del agente etiológico; su presencia se prueba al poner de manifiesto los anticuerpos generados contra el mismo, mediante una serie de ensayos.

La ruta directa estudia al microorganismo y se puede subdividir a su vez en tradicional y no convencional. La microbiología tradicional se basa en una serie de pruebas que determinan la

actividad metabólica del microorganismo, mientras que la no convencional estudia ciertas características estructurales del mismo, como son sus determinantes antigénicos o su información genética (consultar figura 1).

Figura 1. Diagnóstico de enfermedades infecciosas por el laboratorio



A continuación se incluye una sinopsis de las principales pruebas diagnósticas de la microbiología tradicional. Estas resultarán de utilidad para contrastar las características de la microbiología no convencional (a la cual pertenece la reacción en cadena de la polimerasa) y permitirán una mejor comprensión de las ventajas que posee el diagnóstico por PCR.

1.1. Examen microscópico

Técnica	Preparación	Aplicación
Examen en fresco	Colocar una gota de la muestra en porta objetos	Estudiar morfología, movilidad, etc.
Frotis teñidos al Gram	Aplicar el colorante primario cristal violeta, lavar y aplicar lugol, decolorar con alcohol-acetona y contrateñir con safranina	Diferenciar las bacterias en dos grupos: Gram (+) violeta y Gram (-) rojos
Frotis teñidos por Ziehl-Neelsen	Aplicar fucsina fenicada en caliente, decolorar con alcohol-ácido y contrateñir con azul de metileno	Diferenciar a las bacterias ácido-alcohol resistentes como <i>Mycobacteria</i>
Biopsias y frotis sanguíneos teñidos por Giemsa	Aplicar el colorante de Giemsa a las preparaciones	Observar <i>Rickettsia</i> y/o Clamidas en células del hospedador.
Frotis teñidos para observación de esporas	Aplicar verde de malaquita en caliente, decolorar con alcohol-ácido y contrateñir con safranina	Observar esporas en los géneros <i>Bacillus</i> y <i>Clostridium</i>
Frotis "teñidos" para observación de cápsulas	Aplicar tinta china o nigrosina sobre el frotis	Observar cápsula en algunos microorganismos

1.2. Pruebas bioquímicas

Prueba	Principio	Procedimiento	Uso común
Fermentación de carbohidratos	Formación de gas y/o ácido	Añadir al medio de cultivo el carbohidrato y rojo de fenol como indicador; colocar campana para gas	Diferenciar bacterias entéricas
Catalasa	Descomposición enzimática del peróxido de hidrógeno	Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno a una asada de cultivo muy cargada y observar burbujas de oxígeno	Diferenciar <i>Bacillus</i> (+) <i>Clostridium</i> (-) <i>Streptococcus</i> (-) <i>Micrococcus</i> (+) <i>Staphylococcus</i> (+)
Citrato	Uso del citrato como única fuente de carbón, con alcalinización del medio	Añadir azul de bromotimol al medio de citrato como indicador de pH, el cual vira a un color azul intenso	Diferenciar <i>Klebsiella</i> (+) <i>Enterobacter</i> (+) <i>Escherichia</i> (-) <i>Salmonella</i> (+)
Prueba del Indol	Conversión de triptofano de las proteínas a Indol	Agregar dimetilamino-benzaldehído al medio de cultivo para detectar el indol	Diferenciar <i>Escherichia</i> (+) <i>Klebsiella</i> (-) <i>Enterobacter</i> (-) <i>Edwardsiella</i> (+) <i>Salmonella</i> (-)

Prueba	Principio	Procedimiento	Uso común
Coagulasa	Coagulación enzimática del plasma sanguíneo	Mezclar una suspensión de la bacteria con plasma e incubar por unos minutos	Diferenciar <i>Staphylococcus aureus</i> (+) <i>S. epidermidis</i> (-)
Descarboxilasas (lisina, ornitina, arginina)	Des-carboxilación de los aminoácidos con liberación de CO ₂ y amonio; alcalinización del medio	Agregar el aminoácido al medio y púrpura de bromocresol como indicador de pH, vira a color púrpura	Diferenciar el grupo de bacterias entéricas
β -Galactosidasa (ONPG)	Hidrólisis del ortonitrofenil- β -galactósido y formación de nitrofenol	Incubar una suspensión de lisado bacteriano con ONPG; observar una coloración amarilla	Diferenciar <i>Citrobacter</i> (+) <i>Salmonella</i> (-) Identificar algunas especies de <i>Shigella</i> y <i>Pseudomonas</i>
Licuefacción de Gelatina	Hidrólisis de la gelatina por acción de proteasas	Incubar en caldo de cultivo con 12% de gelatina; enfriar para verificar la formación del gel. Si fue hidrolizada se mantiene líquida aún al enfriar	Identificar <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Clostridium</i>

Prueba	Principio	Procedimiento	Uso común
Producción de Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	Descomposición de aminoácidos sulfurados o reducción del tiosulfato	Detectar en medio de agar hierro de Kliger mediante la formación de sulfuro ferroso de color negro	Identificar <i>Salmonella</i> , <i>Arizona</i> , <i>Edwardsiella</i> y <i>Proteus</i> dentro de las bacterias entéricas
Prueba de Rojo de metilo	Generación de ácido por fermentadores ácido-mixtos	Incubar en caldo glucosado con rojo de metilo como indicador de pH, viraje de amarillo a rojo (+)	Diferenciar <i>Escherichia</i> (+) <i>Enterobacter</i> (-) <i>Klebsiella</i> (-)
Reducción de nitratos	Utilización del nitrato como aceptor de electrones, reduciéndose a nitrito o nitrógeno elemental	Incubar en medio con nitrato y detectar el nitrito con α -naftilamina-ác. sulfanílico (color rojo). Si es negativo adicionar polvo de Zn, si no existe color se redujo a nitrógeno	Identificar bacterias entéricas; usualmente son (+)

Prueba	Principio	Procedimiento	Uso común
Prueba de la oxidasa	Oxidación del aceptor de electrones dimetil-p-fenilendiamina por el citocromo C	Agregar el reactivo a la colonia y buscar coloración azul o café	Diferenciar <i>Neisseria</i> (+) <i>Moraxella</i> (+) <i>Pseudomonas</i> (+) <i>Acinetobacter</i> (-) bacterias entéricas (-)
Prueba de oxidación / fermentación (O/F)	Producción de ácido en condiciones aeróbicas por algunos microorganismos	Observar la acidificación del medio con CBH's en la parte próxima a la superficie	Diferenciar <i>Micrococcus</i> y <i>Pseudomonas</i> (O) de <i>Staphylococcus</i> y bacterias entéricas (F)
Fenilalanina desaminasa	Desaminación de la PHE y producción de ácido pirúvico, detectado colorimétricamente	Agregar PHE al medio, incubar y añadir cloruro férrico para observar coloración verde	Identificar el género <i>Proteus</i> y <i>Providencia</i>
Hidrólisis de almidón	Formación de un color azul al añadir yodo-yodurado al medio	Incubar en un medio con almidón; cubrir la placa con el yodo de Gram y buscar zonas claras alrededor de las colonias	Identificar degradadores de almidón típicos como <i>Bacillus</i> spp

Prueba	Principio	Procedimiento	Uso común
Prueba de la Ureasa	Descomposición de la urea (NH ₂ -CO-NH ₂) en CO ₂ y amonio	Incubar en un medio con 2% de urea y rojo de fenol como indicador; el aumento del pH vira a color rojo-rosado	Identificar <i>Klebsiella</i> (+) <i>Escherichia</i> (-) <i>Proteus</i> (+) <i>Providencia</i> (-)
Prueba de Voges-Proskauer	Producción de acetoina por fermentación del carbohidrato	Identificar la acetoina usando α-naftol	Diferenciar <i>Klebsiella</i> (+) <i>Enterobacter</i> (+) <i>Escherichia</i> (-) y miembros de <i>Bacillus</i>

1.3. Pruebas Inmunológicas

Patógeno	Antígeno	Procedimiento
<i>Streptococcus</i> Grupo A	Estreptolisina O	Neutralización de la hemólisis por ASTO
<i>Neisseria meningitidis</i>	Polisacárido de la cápsula <i>N. meningitidis</i>	Hemaglutinación pasiva (Ag adsorbido en G.R.). Inmunofluorescencia
<i>Salmonella</i>	H, O	Rx. Widal, aglutinación, ELISA
<i>Vibrio cholerae</i>	O	Aglutinación; bactericida en presencia de complemento; ELISA
<i>Brucella</i>	Ag de la pared celular	Aglutinación, ELISA
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxina diftérica	Prueba dérmica (Elek)

Patógeno	Antígeno	Procedimiento
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculina (Proteínas bacterianas purificadas PPD)	Inoculación subcutánea del Ag
<i>Treponema pallidum</i>	<i>T. pallidum</i>	Inmunofluorescencia indirecta (FTA-ABS)
<i>Rickettsia</i>	Células inactivadas de <i>Rickettsia</i>	Fijación de complemento o pruebas de aglutinación

CAPÍTULO **Reacción en cadena de la DNA polimerasa I (PCR)**

2

El reciente desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**) y su aplicación en la detección de patógenos microbianos ha venido demostrando su potencial para cambiar la práctica diagnóstica de las enfermedades infecciosas en los laboratorios de todo el mundo.

Después de preparada la muestra, la amplificación del DNA por PCR representa un método rápido y automatizado que sólo requiere de la adición de una mezcla de reacción estandarizada al tubo de reacción correspondiente.

2.1. Muestras clínicas a analizar

La muestra (o espécimen) debe ser representativa del proceso patológico y su cantidad ha de resultar suficiente para un examen completo²⁷.

Con el advenimiento del SIDA, el personal debe considerar cualquier muestra biológica como potencialmente infecciosa y tomar las medidas adecuadas de protección. Dichas muestras incluyen sangre, productos sanguíneos, semen, secreciones vaginales, LCR o líquidos sinovial, pleural, peritoneal y amniótico, entre algunos otros⁸².

Biopsia gástrica

El procesamiento de las muestras de biopsia gástrica son particularmente útiles para intentar la detección de diversos patógenos gastrointestinales mediante la técnica de PCR y, en especial, la de *Helicobacter pylori*; la metodología descrita por Clayton¹⁷ se resume a continuación:

La muestra de la biopsia se disecciona con un bisturí estéril en 50 μL de una solución 0.01 mM de EDTA estéril, se mezcla por completo utilizando el Vórtex por 5 minutos y se hierve durante 10 minutos, dejando enfriar a temperatura ambiente. Se centrifuga en microcentrífuga (10,000 g) durante 5 minutos para separar el material tisular insoluble y el sobrenadante se transfiere con una micropipeta a un tubo de microcentrífuga de 0.5 mL para su amplificación por PCR.

Un método alternativo para detectar a *H. pylori* en biopsias gástricas ha sido detallado por Hammar³¹: las muestras se centrifugan en microcentrífuga por 5 minutos a 10,000 g (para separar el material tisular insoluble) y se desecha el sobrenadante. El tejido se resuspende en 70 μL de amortiguador de extracción [20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.5% (p/v) Tween 20] y se mezcla con Vórtex por 5 minutos. La muestra se trata entonces con proteinasa K (a partir de una solución patrón de 20 mg/mL), a una concentración final de 0.5 mg/mL y se incuba a 37°C por 1 h. Después de la incubación, la proteinasa K se inactiva calentando la muestra a 85°C durante 10 minutos. El espécimen puede ser utilizado en este momento para la amplificación por PCR sin necesidad de ningún paso de purificación.

Alternativamente, la muestra puede purificarse una vez añadiendo un volumen idéntico (70 μL) de fenol:cloroformo [1:1 (v/v)], mezclando con Vórtex, y centrifugando a 10,000 g por 5 minutos. La fase acuosa superior se retira cuidadosamente con micropipeta (sin alterar la fase de fenol/cloroformo del fondo) y se

transfiere a un tubo de microcentrifuga de 0.5 mL para su amplificación por PCR.

Generalmente, las muestras de biopsia se colocan en una solución salina con 10% (v/v) de formalina (10 mL de formalina en 90 mL de NaCl 0.9%) para fijar el tejido y las células microbianas asociadas al mismo y, posteriormente, el tejido se fija en parafina para realizarle los análisis histológicos de rutina⁸⁷. El espécimen fijado es sometido a cortes histológicos de un tamaño aproximado de 4 x 10 μ m, en un microtomo, utilizando una hoja de microtomo tratada con HCl 1M¹⁷. Las secciones se transfieren a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL al cual se le añaden 70 μ L de EDTA 0.01 mM estéril. La muestra se hierve por 15 minutos, se enfría en hielo durante 10 minutos y se centrifuga en microcentrifuga a 10,000 g por 5 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y se almacena a -20°C para su posterior amplificación por PCR.

Las biopsias gástricas se emplean en forma rutinaria para la identificación de *H. pylori*, aún cuando también pueden utilizarse para el diagnóstico de padecimientos ocasionados por algunos otros patógenos gastrointestinales.

Exudados, esputo y lavado bronquio alveolar

La recolección de exudados con hisopo se realiza generalmente para efectuar la identificación de patógenos microbianos que afectan el área genital¹⁶ (cérvix, vulva y pene) o la faringe.

El proceso involucra "raspar" la superficie de la mucosa con un hisopo de algodón previamente humedecido con solución salina y el espécimen se transfiere a un tubo cónico de 10 ó 15 mL que contiene 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos adicionado de Fungi-Bact al 2x. Si la muestra va a ser procesada dentro de las siguientes 24 h se puede mantener a temperatura ambiente

pero, para tiempos de almacenamiento mayores, se recomienda refrigerarla a 4°C.

Las células se separan por centrifugación a 2,000-3,000 g y el sobrenadante se descarta por aspiración. El botón se resuspende en 4 volúmenes (aproximadamente entre 30 y 300 μL) de amortiguador K (50 mM KCl, 20 mM Tris-Cl, pH 8.3, 2.5 mM MgCl_2), se incuba a 55°C por una hora, posteriormente se calienta a 95°C por 10 minutos y se congela una vez. Para realizar la amplificación por PCR se emplean de 5 a 10 μL .

Bäckman³ ha detallado un protocolo alterno asociado a la obtención de una muestra de moco vía aspiración con catéter riasofaríngeo, y a la cual se le adicionan de 5 a 10 mL de solución salina isotónica (para hervir durante 30 minutos) antes de tomar directamente 10 μL para la PCR.

Por su parte, Cartwright¹⁵ describió el tratamiento de muestras de esputo y lavado bronquio alveolar (BAL, por sus siglas en inglés) con ditioneitol 6.5 mM (DTT, comercialmente *sputolysin*), por 3 minutos a 37°C, para lograr su licuefacción; después se recogen de 0.5 a 2.0 mL, se someten a centrifugación a 15,000 g por 5 minutos y el botón se lava dos veces con solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS; pH 7.2).

Dicho botón se resuspende en 150 μL de amortiguador de lisis [10 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 20 mM DTT, 1 mg de proteinasa K mL^{-1} y 250 U de lítica (Sigma) mL^{-1} , pH 8.0] y después de incubar 15 minutos a 37°C se adiciona un volumen igual de dodecil sulfato de sodio [SDS 2% (p/v)] para realizar una segunda incubación por 10 minutos a 37°C. El DNA extraído se purifica por absorción en una matriz de sílice (GeneClean; Bio-101, La Jolla, Calif.), eluyendo con 30 μL de amortiguador TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4) y, finalmente, se toman 2 μL para la reacción de PCR.

Las muestras de exudado, esputo y BAL se emplean para llevar a cabo la identificación de diversos microorganismos, tales como *Bordetella pertussis*³, *Pneumocystis carinii*¹⁵, *Chlamydia trachomatis*¹⁶, *Aspergillus spp*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*⁵⁵.

Saliva

Hammar³¹ diseñó un método estandarizado para tratar muestras de saliva relacionadas con la detección de patógenos microbianos por PCR; generalmente, se mezclan 0.5 mL de saliva con 1 mL (2 volúmenes) de DTT en un tubo de microcentrifuga de 2 mL y el contenido se agita suavemente durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se centrifuga a 10,000 g durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante con una micropipeta, sin alterar el botón; éste último se resuspende en 70 μ L de amortiguador de extracción, que contiene 0.5 mg/mL de proteinasa K, y se incuba a 37°C por 1 hora. La actividad de la proteinasa se interrumpe calentando la muestra a 85°C por 10 minutos y se efectúa la purificación correspondiente extrayendo con un volumen igual (70 μ L) de fenol/cloroformo. La capa superior acuosa se utiliza para la amplificación por PCR.

Las muestras de saliva son una alternativa al muestreo por exudado faríngeo y se utilizan para la detección de microorganismos patógenos que causan enfermedades respiratorias.

Heces

Las muestras de heces se utilizan para la detección de diversos patógenos entéricos, tales como *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Giardia spp*, *Entamoeba histolytica* y varios enterovirus. El procesamiento de las muestras de heces humanas para intentar la detección de patógenos por PCR se ha descrito por Pollard⁶⁷.

Se suspenden 200 mg de heces en 1 mL de PBS (pH 7.4) y se mezclan con Vórtex durante 5 minutos, las partículas mayores, relativamente insolubles, se centrifugan a 3,000 g por 10 minutos y el sobrenadante se transfiere inmediatamente a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL utilizando una micropipeta, sin alterar el botón.

Se centrifuga el sobrenadante a 10,000 g durante 15 minutos para concentrar las bacterias y éstas se lisan posteriormente empleándose 70 μ L de amortiguador de lisis (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5% SDS), a los cuales se agregan 100 μ g de lisozima; previa incubación de 30 minutos a 37°C, se agregan a la muestra 300 μ L de una solución de NaCl 50 mM que contenga 1% de SDS y 800 μ g de proteinasa K y se continúa la incubación durante una hora más.

El DNA liberado se precipita añadiendo etanol absoluto en frío y se compacta centrifugando en microcentrífuga a 10,000 g durante 10 minutos. El alcohol se descarta cuidadosamente (por decantación o con una micropipeta) sin alterar el botón y, en seguida, el DNA se seca al vacío y resuspendiéndose en agua destilada estéril para su amplificación por PCR.

Cabe señalar que un método más sencillo para extraer el DNA a partir de patógenos del tracto gastrointestinal, consistente en el calentamiento de la muestra a 94°C durante 5 minutos y su posterior almacenamiento a -20°C hasta su uso. La muestra se

resuspende en amortiguador de TE pH 8.5 de la cual se utilizan directamente 10 μ L para efectuar la PCR.

Sangre

Las muestras de sangre se procesan para detectar varios patógenos microbianos; debido al peligro extremo relacionado con la bacteremia y la viremia, la identificación rápida y correcta del agente causal es uno de los deberes más importantes del laboratorio clínico.

Las bacterias son eliminadas rápidamente de la sangre por lo que la septicemia no es un proceso que ocurra en los individuos sanos; entre los patógenos que se encuentran con mayor frecuencia en una bacteremia destacan *Pseudomonas aeruginosa*, los coliformes tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y los cocos Gram positivos como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

La forma clásica de infección sanguínea, la septicemia, es el resultado del ingreso de microorganismos tales como *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae* al torrente sanguíneo, generalmente a partir de un foco de infección. La septicemia presenta síntomas sistémicos severos, destacando la fiebre, escalofríos y postración. En muchas situaciones infecciosas, el hemocultivo representa el único método para aislar e identificar al agente causal, aunque el diagnóstico depende de realizar adecuadamente la totalidad de los pasos.

El hemocultivo se practica obteniendo asépticamente 10 mL de sangre (por venopunción), los cuales se colocan en una botella de cultivo que contiene anticoagulante y un medio de cultivo multiusos. Por lo regular se realizan dos cultivos por espécimen: uno en condiciones aeróbicas y otro en anaeróbicas, ambos a 35°C, y se revisan diariamente durante 7 días; en ocasiones, se

lisar los glóbulos rojos para liberar posibles patógenos intracelulares que podrían pasar inadvertidos.

Como existe un cierto riesgo de contaminación con la microflora de la piel (al llevar a cabo la venopunción) pueden ocurrir falsos positivos hasta en 2 a 3% de los casos.

La contaminación se sospecha al encontrarse ciertos microorganismos propios de la piel, tales como *Staphylococcus epidermidis* y las corynebacterias, pero aún ellos son capaces de infectar las válvulas cardíacas (en la endocarditis bacteriana subaguda), por lo que la interpretación de los resultados es difícil.

En muchos de los casos, el éxito de los hemocultivos es muy bajo; por ejemplo, se obtienen resultados positivos en menos del 30% de los pacientes con neumonía neumocócica; algunos pacientes no presentan la bacteremia al momento de la recolección de la muestra de sangre, o bien, el paciente puede encontrarse bajo tratamiento con antibióticos³².

De igual forma, la detección de Ag's en fluidos corporales tales como el suero y la orina, mediante aglutinación en látex, ensayos inmunoenzimáticos o contraelectroforesis, presentan problemas de especificidad y/o sensibilidad.

Hassan-King y cols.³² describen un procedimiento que consiste en cultivar 1 a 2 mL de sangre (obtenida por venopunción) en 20 mL de medio tioglicolato y caldo soya-triptona, en condiciones anaeróbicas y aeróbicas, respectivamente, a 35°C durante 48 h.

Posteriormente se toman cuidadosamente 9 mL del sobrenadante y se colocan en tubos de *Nalgene* de 10 mL, se centrifugan a 26,500 g durante 10 minutos y a 4°C, y el botón se resuspende en una solución de desoxicolato de sodio al 0.1% para lisar las células.

El DNA se extrae mediante fenol/cloroformo, se precipita en etanol absoluto a -20°C , se centrifuga 3 minutos en una microcentrifuga clínica y se seca al vacío. Finalmente, el DNA se resuspende en $25\ \mu\text{L}$ de agua destilada y se realiza la PCR.

Orina y sedimento urinario

Las infecciones urinarias son muy comunes y, dado que los agentes causales frecuentemente son propios de la flora habitual, se debe poner el mayor cuidado en los análisis microbiológicos de la orina.

Como la orina favorece el crecimiento bacteriano en diversas condiciones, es normal encontrar un elevado número de bacterias; en la mayoría de los casos, la infección ocurre como resultado del ascenso de microorganismos por la uretra, a partir del exterior, e inclusive, la vejiga puede verse involucrada. Cabe señalar que las infecciones del tracto urinario se adquieren con cierta frecuencia dentro de los hospitales, como consecuencia del uso incorrecto de sondas y catéteres.

Los procesos uropatológicos significativos se traducen generalmente en cuentas de 10^5 microorganismos/mL ($\mu\text{O}/\text{mL}$) o mayores, en muestras recolectadas de la fracción media de la primera orina de la mañana; en contraste, la contaminación de la orina por los bacterias presentes en la piel y/o los genitales externos, derivan en cifras inferiores a $10^3\ \mu\text{O}/\text{mL}$ ⁹.

Las bacterias encontradas más frecuentemente son: *Escherichia coli* (en el 75 a 90% de los casos), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus faecalis* y *Neisseria gonorrhoeae*, la cual no crece en la orina sino en el epitelio uretral y por lo tanto requiere de otros métodos para su diagnóstico.

El examen microscópico directo de la orina suele aportar datos útiles y se recomienda en casi todos los procedimientos de diagnóstico: una pequeña gota de orina se coloca en un portaobjetos y se deja secar antes de realizar la tinción de Gram. Cuando la muestra contiene 10^5 $\mu\text{O}/\text{mL}$, generalmente se observan a inmersión 1 o más bacterias por campo; otra forma rápida para detectar bacterias en número significativo es mediante una tira reactiva para nitritos, puesto que el nitrato en la orina es reducido por las bacterias⁹.

Domeika²¹ reporta el uso del sedimento de la primera orina de la mañana para la detección por PCR de pacientes asintomáticos infectados por *Chlamydia trachomatis*. Una alícuota de 10 mL de orina se centrifuga a 1,500 g durante 15 minutos y el paquete se resuspende con 1 mL de solución *MicroTrak* (Syva), se agitan con Vórtex por 1 minuto y se centrifugan a 1,500 g por 10 minutos. El sobrenadante se reemplaza con 2 mL de amortiguador *Amplicor* (Roche) y se dejan reposar a temperatura ambiente por 1 h. Se añaden 2 mL de diluyente para orina y 10 minutos después se toma la muestra para la PCR.

2.2. Obtención del DNA bacteriano

En varias ocasiones, el análisis de muestras clínicas requiere de un procesamiento más amplio de dicho espécimen, a fin de asegurar la lisis del patógeno en estudio y, por ende, para que se libere el DNA genómico a amplificar por PCR.

A continuación, se describen algunos de los métodos de lisis más sencillos que se aplican exitosamente para realizar la PCR:

Lisis bacteriana por congelamiento/descongelamiento

Numerosas bacterias se pueden lisar por congelamiento y descongelamiento (de 5° a 20°C) repetido de la muestra².

El congelamiento rápido suele realizarse en un baño de hielo seco/metanol/etanol, en tanto que el descongelamiento se efectúa en un simple baño de agua a 50°C⁸. Después de algunos ciclos de congelamiento/descongelamiento, la muestra se calienta a 80°C durante 10 minutos, se enfría a temperatura ambiente, se le adicionan los reactivos de PCR y se lleva a cabo la amplificación.

Cabe subrayar que la mayoría de las bacterias Gram negativas resultan sensibles a la lisis por el método descrito, lo cual facilita la amplificación de su DNA por PCR.

Lisis bacteriana por congelamiento y ebullición

Como se describió anteriormente, las bacterias pueden congelarse y colocarse en un baño de agua hirviendo o en un termociclador durante 10 minutos, de 3 a 5 veces. Finalmente, se agregan los reactivos a la muestra para la PCR y se efectúa la amplificación⁵³.

La mayoría de las bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas, como *Staphylococcus* spp. se pueden lisar mediante este método.

Ebullición con Chelex 100

Las muestras pueden incubarse a 60°C durante 10 minutos y hervirse por un tiempo similar en un baño de agua o un termociclador, en presencia de 50 a 100 µL de ChelexTM 100

(BioRad, CA). Éste último estabiliza al DNA en el agua hirviendo, manteniendo la fuerza iónica del medio; Después de hervir, las muestras se centrifugan en una microcentrifuga clínica a 10,000 g por 3 minutos, y se utilizan de 3 a 5 μL del sobrenadante correspondiente para efectuar la PCR.

Este método es más efectivo que el de congelamiento/ebullición para liberar los ácidos nucleicos de bacterias Gram positivas, Gram negativas, e inclusive, para algunos quistes de protozoarios, tales como *Giardia* spp.

El siguiente método de lisis en directo fue descrito por Li⁴⁵: 50 μL de la muestra se colocan en 100 μL de amortiguador de PCR 1x que contiene 0.05 mg/mL de proteinasa K, 20 mM de DTT y 1.8 μM de SDS para lisar las bacterias; dicha mezcla se agita en Vórtex por 15 segundos, se incuba a 37°C durante 1 h, se calienta a 80°C por 5 minutos (para inactivar la proteinasa) y se le agregan los reactivos de PCR.

Cabe señalar que la amplificación de DNA por el método de PCR requiere que exista al menos una copia intacta del DNA "blanco" y un número mayor de copias de dicho DNA blanco aumenta la probabilidad de que la amplificación resulte exitosa. Además, cualquier corte (*nick*) en la secuencia "blanco" puede bloquear la amplificación por PCR.

La cantidad total de DNA utilizada para la PCR suele ser de 0.05 a 1.0 μg ; este rango asegura la detección de una copia única de la secuencia "blanco" presente en la muestra, aunque dicha cantidad puede modificarse en función del número de copias del gen "blanco" presentes por célula.

Adicionalmente, no es indispensable que la muestra se encuentre altamente purificada y puede ser preparada por simple lisis de las bacterias (hirviendo la muestra en una solución hipotónica, como se describió anteriormente). Sin embargo,

algunas impurezas tales como la formalina, sangre, ácido húmico, agentes quelantes, detergentes y metales pesados pueden llegar a interferir la amplificación del DNA "blanco", por lo que deben ser eliminados o diluidos⁶.

Extracción con fenol:cloroformo y precipitación en etanol²

A) Preparación de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico

1. Se colocan 0.5 g de 8-hidroxiquinolina en un vaso de precipitados de vidrio de 2 L (que contenga una barra de agitación magnética) y se añaden lentamente el fenol y 500 mL de Tris base 50 mM.

2. El vaso se cubre con papel aluminio y se agita durante 10 minutos, a temperatura ambiente y a baja velocidad. Posteriormente, se deja en reposo hasta que las fases se separen y se decanta la fase superior (acuosa) hasta donde sea posible en el recipiente de desechos. El remanente se retira con una pipeta y después se agregan 500 mL de Tris-Cl 50 mM, pH 8.0 y se repite el paso 2 hasta que el fenol alcance un pH de 8.0 (midiendo con el papel indicador).

3. Se puede almacenar el fenol hasta por 2 meses a 4°C en un frasco ámbar con 250 mL de amortiguador TE, cubriéndolo con papel aluminio.

⁶ Se debe tener precaución al trabajar con fenol ya que puede causar quemaduras severas; deben usarse guantes, lentes de seguridad y bata de laboratorio. De preferencia manejarse en campana de extracción bien ventilada y recolectar los desechos en un frasco de vidrio.

4. Para su uso en la purificación de DNA, se mezclan 25 volúmenes de fenol (fase inferior amarilla) con 24 de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico^d.

B) Extracción con fenol

1. Se agrega un volumen idéntico de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico a la muestra de DNA (0.1 a 0.4 mL) contenida en un tubo de microcentrifuga de polipropileno, agitando con Vórtex vigorosamente durante 10 segundos.

2. La mezcla resultante se centrifuga de 15 segundos a 2 minutos a temperatura ambiente y se transfiere la fase superior (acuosa)^e, que contiene al DNA, a un tubo nuevo de microcentrifuga.

C) Eliminación de fenol y cloroformo residual por extracción con éter

El éter^f es útil para descartar solventes orgánicos presentes en las soluciones de DNA, especialmente cuando dicho DNA es de alto peso molecular:

1. En un tubo de polipropileno, se añade una mezcla (a partes iguales) de dietiléter y de amortiguador TE y se agita en el Vórtex durante 10 segundos, dejando en reposo hasta que las fases se separen.

^d El cloroformo estabiliza la frontera entre la fase acuosa y el fenol puro. Reduce la cantidad de solución acuosa retenida en la fase orgánica. El alcohol isoamílico previene la formación de espuma y facilita la separación de las fases. La solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico puede almacenarse al mezclarse con 1/2 vol. de buffer TE como fase acuosa saturante.

^e Las concentraciones elevadas de sal pueden causar la inversión de las fases acuosa y orgánica (amarilla). Además, se debe repetir los pasos 1 y 2 para la fase acuosa si existe un precipitado blanco en la interfase.

^f El éter es extremadamente inflamable y puede ocasionar mareos. Todas las manipulaciones deben ejecutarse en una campana bien ventilada.

2. Se adiciona un volumen semejante de éter (fase superior) al DNA, agitando suavemente por inversión del tubo; después se centrifuga con microcentrífuga durante 5 segundos y se descarta la fase superior (éter). Este paso se repite.

3. Para retirar el éter se coloca la muestra en la campana ($\leq 100 \mu\text{L}$) o al vacío ($> 100 \mu\text{L}$) durante 15 minutos.

D) Precipitación en etanol

1. Se añade a la solución de DNA 1/10 de volumen de acetato de sodio⁹ 3M a pH 5.2 para facilitar la precipitación en etanol. Se agita cuidadosamente el tubo por inversión y finalmente se adicionan de 2 a 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C , agitando cuidadosamente. La precipitación se favorece usando un baño de hielo seco durante 5 minutos o colocando la muestra durante 30 minutos en el congelador a -20°C .

2. La muestra se centrifuga en microcentrífuga por 5 minutos. Para precipitados pequeños ($< 1 \mu\text{g}$) se aspira el sobrenadante con pipeta Pasteur, retirando el líquido por la cara opuesta al DNA precipitado; se inicia por la superficie, continuando hacia abajo conforme el nivel del líquido desciende.

Para precipitados grandes, se decanta el sobrenadante mediante una inversión rápida del tubo.

⁹ Debe mantenerse la concentración de acetato de sodio por debajo de 0.5 M en la precipitación. El acetato de amonio puede substituirse por acetato de sodio. No se recomienda el uso de NaCl por su baja solubilidad en etanol al 70%.

Para grandes cantidades de DNA ($> 50 - 100 \mu\text{g}/\text{mL}$), la precipitación es casi instantánea a temperatura ambiente. La recuperación de $< 1 \mu\text{g}$ de DNA puede mejorarse al reextraer la fase orgánica con $100 \mu\text{L}$ de buffer TE.

3. El botón se lava con 1 mL de etanol al 70% invirtiendo el tubo en varias ocasiones. Para DNA de <200 bases debe utilizarse etanol al 95%.

4. Después de centrifugar en microcentrífuga durante 5 minutos, se remueve el sobrenadante y el precipitado se seca en un desecador al vacío o en un evaporador *Speedvac* (*Savant*). Finalmente, se resuspende en suficiente amortiguador TE para llevar a 1 mg/mL. Una agitación suave en el Vórtex disuelve <25 μ g de DNA; mayores cantidades de DNA pueden requerir de calentamiento a 65°C durante 5 minutos.

La disolución de DNA genómico de alto peso molecular puede tomar varios días y debe agitarse suavemente (no en Vórtex) para evitar su ruptura.

Extracción salina y precipitación en etanol

Este protocolo alternativo tiene la ventaja de no utilizar solventes orgánicos los cuales, además de ser peligrosos en su manejo, someten al DNA a condiciones extremas, lo que ocasionalmente resulta en un fraccionamiento indeseable del DNA. Asimismo, se reduce el tiempo requerido en la purificación del DNA de la muestra.

1. Se agrega a la muestra un volumen idéntico de amortiguador TTS (Tris-Tritón-Sacarosa) y se mezclan cuidadosamente por inversión del tubo.

2. Se centrifuga a 10,000 g por 5 minutos y se decanta el sobrenadante. El botón se resuspende en 1 mL de amortiguador TTS, y se agita hasta lograr su homogeneización.

3. Se centrifuga nuevamente en microcentrifuga durante 2 minutos y se decanta el sobrenadante, resuspendiendo el botón en 1 mL de amortiguador TTS. Se añaden 570 μL de NaCl 5 mM y se agita. A continuación se adicionan 30 μL de SDS al 10% y se agita durante 5 minutos, con lo que la muestra adquiere una consistencia viscosa.

4. Se adicionan 200 μL de NaCl saturado y se agita; así se forma un precipitado proteico que se separa centrifugando a 3,000 g durante 10 minutos a 4°C.

5. Finalmente, se decanta el sobrenadante en un tubo de 13 x 100 mm y se le añaden 2 mL de etanol absoluto a -20°C para precipitar el DNA.

2.3. Conceptos teóricos y principales reactivos

El método de amplificación de DNA por PCR fue concebido por el Dr. Kary B. Mullis, del Departamento de Genética Humana de la Corporación Cetus, durante "un paseo a la luz de la luna por las montañas de California" en 1983⁵⁸.

A partir de una molécula de DNA, la PCR puede generar cien mil millones de copias en una tarde. Durante los primeros siete años que sucedieron a esa noche se habían publicado más de 1,000 artículos que involucraban el uso de la nueva técnica.

En buena parte de las discusiones que implican al material genético, destaca la tendencia a referirse al DNA como una molécula tan común como cualquier otra y, aparentemente, fácil de conseguir.

La realidad, en la práctica, es radicalmente diferente pues, exceptuando a los virus más simples, es difícil obtener una molécula bien caracterizada de DNA nativo de cualquier organismo.

La mayor dificultad reside en la naturaleza misma de la molécula. El DNA es una cadena delicada, compuesta de 4 desoxirribonucleótidos: desoxiadenilato (A), desoxitimidilato (T), desoxiguanilato (G) y desoxicitidilato (C); la secuencia de estas bases codifica la información genética⁶⁹.

Generalmente, el DNA se encuentra en forma de pares de hebras unidas por complementariedad de bases, que adquieren una conformación espacial semejante a una hélice. En el interior de la célula, dicha hélice de DNA está rodeada de varias proteínas que le permiten un mayor enrollamiento.

Cuando los biólogos moleculares tratan de aislar la cadena de DNA, resulta que la molécula es tan larga y delgada que hasta la agitación más suave la rompe en varios puntos al azar a lo largo de la misma⁵⁸.

Consecuentemente, cuando se extrae el DNA de 1,000 células idénticas, se obtienen 1,000 copias de un gen específico, pero cada una se localizará en un fragmento de diferente tamaño.

En la década de los 70's, gracias al descubrimiento de las enzimas de restricción, se logró obtener segmentos de DNA de menor tamaño, lo que facilitó su identificación y permitió el aislamiento de la pieza que contenía algún gen específico. Es decir, la investigación genética giraba en torno a los segmentos de restricción y de las sondas de oligonucleótidos que permitían determinar si la muestra de DNA contenía la secuencia en cuestión^{1,63}.

En 1979, el Dr. Mullis fue contratado por la Corporación Cetus, en Emeryville, Calif. U.S.A., para que sintetizara sondas de oligonucleótidos; no obstante, para 1983 dicho proceso se había reemplazado con técnicas automatizadas, lo que le permitió desarrollar el concepto de la PCR.

Cabe señalar que el Dr. Mullis buscaba diseñar una técnica que permitiera determinar la identidad de un nucleótido en una posición específica de la molécula de DNA, utilizando a la enzima DNA polimerasa I y a una variante metodológica de la secuenciación con didesoxirribonucleótidos desarrollada por Frederick Sanger⁷³.

Anteriormente, en 1955, Arthur Kornberg y sus cols. de la Universidad de Stanford habían descubierto a la enzima denominada DNA polimerasa I; las DNA polimerasas desempeñan diversas funciones naturales que incluyen la reparación y replicación del DNA: pueden alargar un oligonucleótido corto, denominado "*primer*" o iniciador, uniendo repetidamente un nucleótido adicional a su extremo 3', aunque sólo cuando dicho oligonucleótido se encuentra hibridado, es decir, unido a la hebra complementaria conocida como "molde". El nucleótido en turno (que es añadido por la polimerasa) debe ser complementario a la base en la posición correspondiente de la hebra molde⁵⁸.

La DNA polimerasa I puede escindirse proteolíticamente en dos cadenas polipeptídicas de distinto tamaño: el fragmento grande (P.M. 76,000) se denomina Klenow y presenta actividad elongante de la cadena y también actúa como una 3'→5' exonucleasa; por su parte, el fragmento pequeño (P.M. 36,000) sólo posee una actividad 5'→3' exonucleolítica. La estructura del fragmento Klenow (formando un complejo con desoxitimidina 5'-monofosfato) se ha determinado mediante cristalografía de rayos X⁶⁹.

La enzima contiene una hendidura de 2 nm de ancho, recubierta por cadenas laterales con carga positiva y, por lo tanto, capaz de unirse al DNA.

La DNA polimerasa I es, aparentemente, lo suficientemente flexible para envolver la cadena molde y, por ende, permite que ocurra la etapa de elongación de la cadena sin que se presente la disociación del DNA molde.

En cuanto a la secuenciación, su principio fundamental se basa en el hecho de que dos hebras de DNA cuyas longitudes sólo difieren en un nucleótido, pueden separarse en dos bandas distintas, al someterlas a una electroforesis en gel de poliacrilamida². Inicia con DNA de una sola hebra a la cual se le alinea un oligonucleótido de secuencia complementaria, necesario para que la DNA polimerasa empiece la reacción de elongamiento, mediante la incorporación de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's). Normalmente, la DNA polimerasa es capaz de sintetizar una nueva cadena de DNA de varios cientos de nucleótidos de longitud; sin embargo, en la secuenciación se limita la longitud de la cadena, al agregarse un nucleótido modificado a la reacción.

Este último nucleótido se denomina didesoxirribonucleótido (por ejemplo: ddATP), el cual puede incorporarse con igual eficiencia que los dNTP's normales, pero bloquea la elongación de la cadena ya que carece del grupo hidroxilo en la posición 3' de la ribosa (consultar figura 2).

Si se adiciona ddATP a la mezcla de reacción, la terminación de la cadena ocurrirá en las posiciones opuestas a las timinas del DNA molde. Pero la terminación no siempre ocurre frente a la primera timina del DNA molde, puesto que también existe dATP normal. El resultado es una familia de cadenas de longitudes diferentes que terminan en ddATP (consultar figura 3).

La reacción de secuenciación se realiza por cuadruplicado, en paralelo, puesto que se destina un tubo diferente para cada didesoxirribonucleótido (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP); cada familia de moléculas se carga en diferentes carriles de un gel de

poliacrilamida y bajo estas condiciones la electroforesis separa las moléculas de DNA que difieren en un nucleótido de largo.

La secuencia se puede leer directamente de las posiciones de las bandas en el gel, localizando la banda que se desplazó más lejos y que representa la pieza más pequeña de DNA y que se forma al incorporar el ddNTP en la primera posición después del iniciador; a partir de ésta se busca la siguiente banda en cualquiera de las reacciones con los diferentes ddNTP's (consultar figura 4).

Figura 2. Técnica de secuenciación de DNA según Sanger

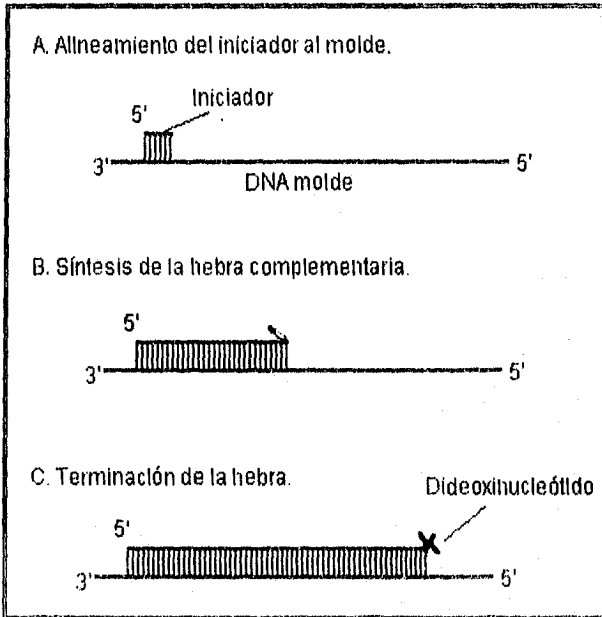


Figura 3. Secuenciación de DNA (continuación)

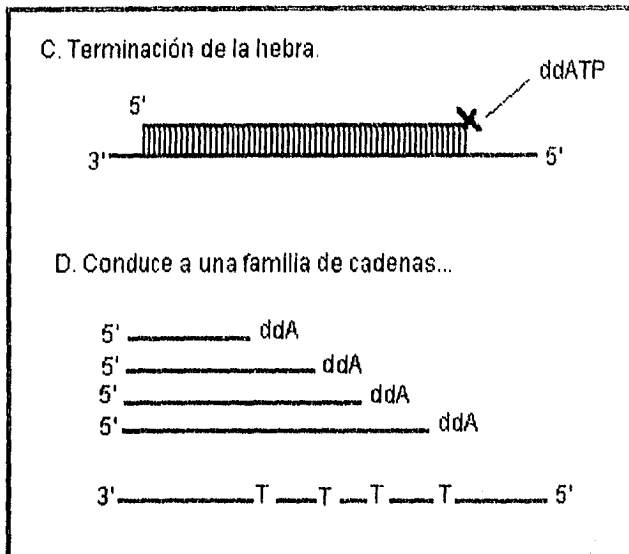
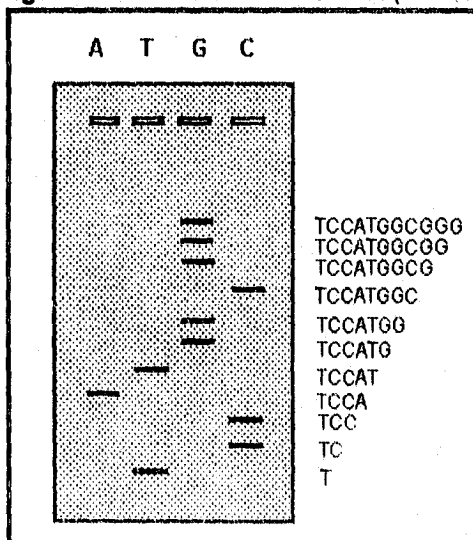


Figura 4. Secuenciación de DNA (continuación)



La intención del Dr. Mullis era la de utilizar todos los elementos de la secuenciación, según el método de Sanger, excepto en lo referente a los dNTP's ordinarios; de ese modo, la reacción terminaría inmediatamente después de la adición de una base en la cadena y, al conocer cuál ddNTP había sido incorporado, podría deducir la identidad de la base correspondiente en el DNA molde⁵⁸.

Sin embargo, su planteamiento fue incorrecto. El problema radicaba en que, bajo ciertas condiciones, los oligonucleótidos también pueden hibridarse con secuencias distintas a la deseada y ello redituaría resultados ambiguos. Por tal razón, los investigadores recurrían a procedimientos más elaborados para estudiar el DNA humano, tales como el uso de enzimas de restricción y la purificación del segmento de interés, separado oportunamente mediante electroforesis; esto reducía la hibridación errónea del oligonucleótido y permitía obtener resultados más significativos.

Fue cuando el Dr. Mullis decidió utilizar dos oligonucleótidos en vez de uno sólo; de esta manera, los iniciadores envolverían con precisión la secuencia blanco y, al dirigir un oligonucleótido a cada hebra del DNA, podría obtener información complementaria (al secuenciarlas a ambas): el experimento incluiría un control interno sin inconvenientes adicionales. En ese momento, el Dr. Mullis se encontraba a un paso de descubrir la PCR.

Al meditar sobre los posibles contratiempos que encontraría al ejecutar su nuevo planteamiento, se percató de que, de existir trazas de dNTP's en la muestra del DNA, se complicaría la interpretación del gel, en particular cuando aquéllos se añadieran al extremo 3' de los iniciadores, antes de que lo hicieran los ddNTP's con la marca radioactiva.

En tal sentido, decidió realizar un "simulacro de reacción", agregando DNA polimerasa en una primera fase, para que ésta

utilizara los dNTP's de la muestra al extenderse los iniciadores y, posteriormente, aumentaría la temperatura para separar los oligonucleótidos del DNA molde; entonces podría realizar su reacción de secuenciación.

Esto le produjo una nueva duda: ¿Podrían interferir los oligonucleótidos producidos en el simulacro con las reacciones subsecuentes?

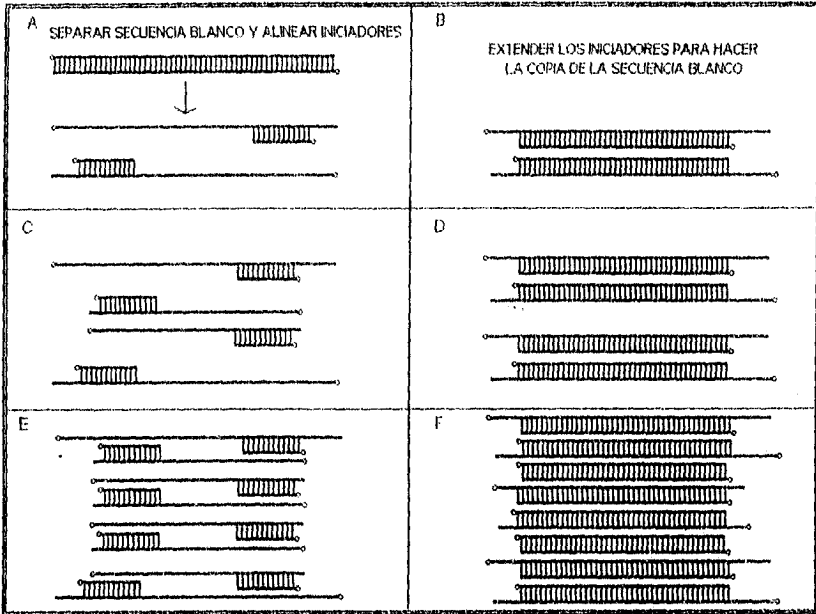
En ese instante comprendió el potencial de su procedimiento: si los oligonucleótidos extendidos en el simulacro tenían la misma secuencia que las hebras del DNA molde original, ¡la reacción habría duplicado el número de secuencias "blanco" en la muestra!

La repetición del procedimiento una y otra vez, brindaría la posibilidad de obtener un crecimiento exponencial. Así, después de promover algunos ciclos de: A) extensión de los iniciadores; B) disociación de los productos; C) rehibridación de los nuevos iniciadores y E) extensión de éstos últimos (nuevamente), se percató de que la longitud de las hebras de DNA que se acumulaban en forma exponencial estaría definida con precisión en sus extremos 5', por los iniciadores (consultar figura 5).

En ese sentido, pasaron algunos meses para que el Dr. Mullis preparara el primer experimento de PCR; para ello, requirió conjeturar sobre las soluciones, las concentraciones y las temperaturas a utilizar. Algunos de los primeros artículos de Kornberg, sobre la DNA polimerasa le sirvieron de ayuda⁵⁸.

El Dr. Mullis utilizó un fragmento de 25 pares de bases de un plásmido y dos oligonucleótidos iniciadores de 11 y 13 bases de largo, respectivamente. Colocó todo en un solo tubo de reacción y, ¡funcionó!

Figura 5. Reacción en cadena de la DNA polimerasa I (PCR)



Actualmente, el Dr. Kary B. Mullis trabaja en La Jolla, Calif., U.S.A., como consultor privado en tecnología de PCR y ácidos nucleicos.

Fundamentos de la PCR

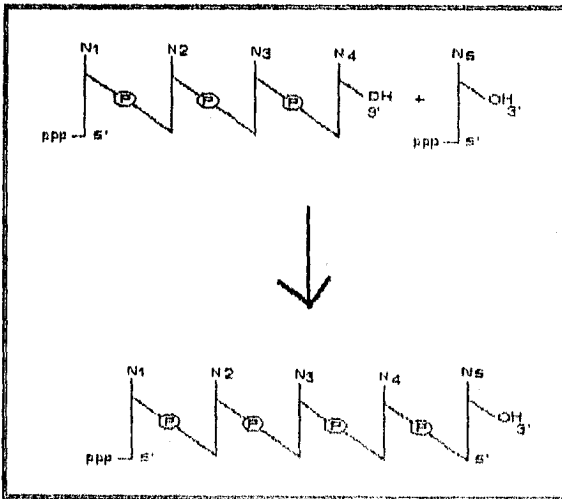
La amplificación de DNA por PCR corresponde a una reacción enzimática ejecutada por la DNA polimerasa (comúnmente *Taq* DNA pol I). Prácticamente todas las características de las DNA polimerasas, incluyendo sus propiedades catalíticas, requerimientos de sustrato (iniciadores y molde), V_{max} (nucleótidos incorporados por segundo por molécula de enzima),

tasa de error (mutaciones por bases incorporadas), procesividad (bases añadidas por extensión) y actividad nucleolítica asociada, se han descrito ampliamente^{6,23,54,71}.

Todas las DNA polimerasas catalizan la formación de un enlace fosfodiéster entre el 3'-OH en el extremo creciente de la cadena de DNA (el iniciador) y el grupo 5'-PO₄ del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) entrante (consultar figura 6)

Cada nucleótido entrante está determinado por el DNA molde, al cual el iniciador debe estar unido por complementariedad de bases a su extremo 3'-OH. Aunque todas las DNA polimerasas catalizan la misma reacción enzimática, pueden diferir en forma significativa en cuanto a sus condiciones óptimas de reacción; esto es especialmente cierto para la *Taq* DNA pol I cuya temperatura óptima es 75°C⁵⁴.

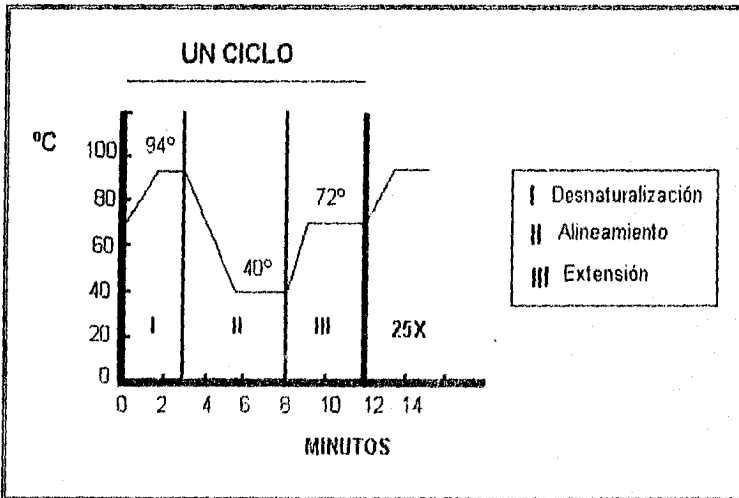
Figura 6. Formación del enlace fosfodiéster mediante la DNA polimerasa



La amplificación de DNA se logra mediante ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales tiene 3 etapas distintivas de temperatura: (1) desnaturalización del DNA molde entre los 94° y 96°C; (2) alineamiento de los iniciadores al molde entre los 42° y 60°C; (3) extensión de los iniciadores por la DNA polimerasa, entre los 60° y 72°C (consultar figura 7)³⁴.

La reacción de amplificación contiene 2 iniciadores, dispuestos de tal forma, que se hibridan a hebras opuestas de la secuencia blanco; cada iniciador se orienta para que la elongación de su extremo 3'-OH se superponga a través de la zona entre ambos iniciadores, hasta la región homóloga al otro iniciador. Como cada producto de extensión incluye la secuencia complementaria al otro iniciador, el producto de cada reacción sirve de molde para el siguiente ciclo de PCR, en una forma de reacción bioquímica en cadena⁷⁶.

Figura 7. Programa de temperaturas de un termociclador de PCR⁹



⁹ Modificado de Carleton¹⁴ Cap. 11, fig. 11.2, p.314

En la primera etapa del primer ciclo de PCR, el DNA molde se mezcla con un exceso de ambos iniciadores de la amplificación, a continuación ocurre la desnaturalización entre 94° y 96°C. En la segunda etapa del primer ciclo, la mezcla de reacción se lleva a la temperatura óptima de alineamiento iniciador-molde. Finalmente, en la tercera etapa, la temperatura se modifica a 72°C, ligeramente inferior a la óptima de la *Taq* DNA pol I, pero no tan alta como para derretir a los iniciadores y moldes alineados.

Los iniciadores se elongan para producir nuevas hebras de DNA (a partir de cada molde), cada uno con un extremo 5' discreto (determinado por la secuencia del iniciador) y un extremo 3' indefinido, denominado "producto largo". Este producto largo se seguirá produciendo a partir del molde original durante cada ciclo de PCR, pero su incremento será lineal⁴.

La primera extensión del iniciador es crítica en cuanto a la determinación de los productos finales. Los primeros ciclos de PCR constituyen una fase de tamizado en la cual se seleccionan segmentos específicos de DNA para su amplificación⁶.

La hibridación inespecífica de los iniciadores, en este punto, conduce a la acumulación de productos inespecíficos de amplificación y acelera el inicio de la fase de meseta (efecto **Plateau**) de la PCR⁶.

Durante los primeros ciclos de la amplificación por PCR, cada iniciador actúa como sonda, seleccionando las secuencias "blanco". Si un par de iniciadores se hibridan próximos y en la orientación apropiada, se selecciona un subconjunto de secuencias "blanco" para su amplificación. Este subconjunto determinará la especificidad de los productos⁶.

⁴ *vid. infra*: p. 55

En el segundo ciclo de la PCR, los productos largos del primer ciclo son desnaturalizados, alineados con los iniciadores contrarios y extendidos para producir los primeros "productos cortos". Estos productos cortos son DNA de hebra sencilla y de longitud discreta, cuyos extremos 5' y 3' están definidos por la secuencia de los iniciadores.

En el tercer ciclo de PCR, se producen 4 nuevos productos cortos a partir de los productos largos y, por primera vez, la extensión de los iniciadores que hibridaron a los productos cortos del segundo ciclo resulta en la síntesis de una molécula discreta de DNA de doble cadena lineal cuyos extremos están definidos por la secuencia de los iniciadores³⁴.

A partir del tercer ciclo y, en los subsecuentes, si cada ciclo es 100% eficiente, la cantidad de productos cortos de doble cadena será el doble después de cada ciclo, resultando en una amplificación igual a 2^n , donde n es el número de ciclos. Debe notarse, también, que la amplificación es en realidad mayor a la exponencial durante los primeros ciclos, debido a la contribución del producto largo.

Secuencia "blanco" u objetivo

Una secuencia "blanco" óptima debe tener un largo de 150 a 500 pares de bases (bp, por sus siglas en inglés), sin embargo, longitudes entre 100 y 2,000 bp son susceptibles de amplificarse en forma eficiente. Evidentemente, es preferible que dicha secuencia sea única, para evitar la competencia de moldes no deseados³⁴.

Lógicamente, cuando se encuentran copias múltiples dentro del genoma, se reduce el número requerido de ciclos de amplificación. La PCR es capaz de detectar mínimas cantidades de DNA, no

obstante, el riesgo de confusión con DNA contaminante (proveniente de otras especies presentes en la muestra) aumenta, si el número de copias de la secuencia "blanco" es muy baja.

Si la secuencia "blanco" contiene un sitio de restricción, se puede comprobar fácilmente que el producto de la amplificación es el correcto; lo anterior también se logra si la secuencia se detecta específicamente con una sonda que se posea en el laboratorio⁸⁰.

Iniciadores para la amplificación (*Primers*)

Una de las características ideales de los iniciadores para PCR es una longitud del oligonucleótido entre 15 y 25 bp. Los iniciadores deben tener una longitud y composición semejantes para que sus temperaturas de fusión (T_m , la temperatura a la cual el 50% de las hebras se encuentran separadas) queden dentro de un intervalo de $\pm 5^\circ\text{C}$ entre los 50° y 60°C (dependiendo de la composición del DNA molde)⁵⁴.

La temperatura de fusión DNA molde-iniciador (T_m), utilizada para la fase de alineamiento, se calcula con base en el contenido total de GC y AT de los iniciadores mediante la fórmula: $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$.

Preferentemente, el sitio de unión al DNA debe ser una región de secuencia conservada, al final de una gen no degenerado, por ejemplo, la primera o segunda base del codón de un aminoácido conservado¹⁴.

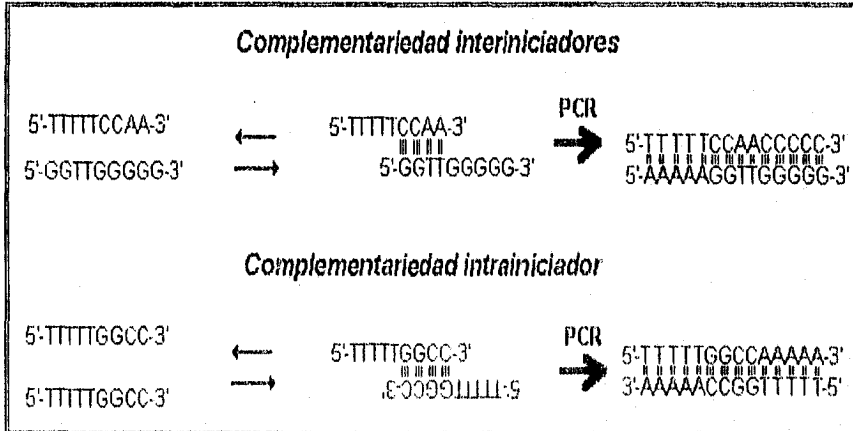
Los iniciadores no deben ser complementarios entre sí (para evitar estructuras secundarias) o complementarios con algún otro iniciado; del mismo modo, es preferible que no presenten series de

3 o más Gs o Cs en el extremo 3' y su contenido de GC debe ser similar al del DNA molde (consultar figura 8).

La formación de estructuras secundarias con forma de pasador de cabello (*hairpin*) o de tallo, debidas a hibridaciones intramoleculares de los iniciadores, así como la formación de DNA de doble cadena por unión de los iniciadores (hibridación intermolecular), son dos de las principales causas de la producción de artefactos que son, comúnmente, dímeros de iniciadores y se detectan como material muy brillante (en la electroforesis en gel de agarosa con EthBr) de bajo peso molecular⁵⁴.

Los dímeros pueden funcionar por sí mismos como molde y compiten con el DNA molde por la enzima, por los dNTPs y por los iniciadores, lo que resulta en una reducción en el rendimiento de los productos de amplificación deseados. El uso de técnicas de arranque en caliente de la PCR disminuye o elimina estos imponderables³⁴.

Figura 8. Estructuras secundarias indeseadas de los iniciadores



Si existen problemas de unión entre las bases del *primer* y el DNA molde, éstos deben ser mínimos para el extremo 3', puesto que es el sitio de unión de la DNA polimerasa⁴.

Como los iniciadores quedan incorporados en el producto de la PCR y existe cierta tolerancia de mal emparejamiento entre el DNA molde y el iniciador, se pueden incluir sitios de restricción en el iniciador, a fin de facilitar el clonado de los productos de amplificación, o mutaciones específicas, e incluso, elementos de regulación de la expresión genética. Asimismo, las marcas con las cuales se detectará el producto, pueden colocarse en el *primer*⁶.

La síntesis local de los iniciadores aporta al laboratorio la ventaja de obtener rápidamente el producto, así como la posibilidad de diseñar iniciadores acoplados a compuestos fluorescentes o radioactivos.

Para llevar a cabo análisis de rutina por PCR, una síntesis a escala de 40 nM rinde entre 80 y 120 µg de un iniciador de 20 nucleótidos de largo, el cual es suficiente para realizar cerca de 1,000 reacciones de PCR¹⁴.

Los iniciadores de PCR se almacenan en un amortiguador compuesto de Tris-Cl 10 mM (pH 8.3) y EDTA 0.1 mM a -20°C. En solución, el DNA se comporta como un ácido débil y los enlaces fosfodiéster se disocian en soluciones acuosas no amortiguadas. Al recibir los iniciadores, éstos se deben dividir en alícuotas y guardarse en congelación. Las alícuotas pueden descongelarse entre 5 y 10 ocasiones (como máximo), manteniéndose a 4°C durante su uso. Además, los iniciadores deben guardarse en congeladores separados para disminuir el riesgo de contaminar a los demás reactivos de PCR³⁴.

Debido a que en muchos casos es necesario diseñar *primers de novo*, la correcta selección de la secuencia de los iniciadores es fundamental en el análisis por PCR. El mejor método para

diseñarlos consiste en utilizar uno de los variados programas creados para dicho propósito, destacando los siguientes: **PrimerGen** (IBM) (ftp.bio.indiana.edu), **Primer** (Sun Sparcstations) (jmullins.stanford.edu), **PRIMER** (Unix) (primer@genome.wi.edu), **Amplify** (Macintosh) (sumex-aim.stanford.edu), y **OSP** (Unix).

En general, dichos programas identifican características críticas de diseño y permiten al investigador encontrar un par de iniciadores con propiedades conocidas y predictivas (consultar figura 9).

Entre la información que incluyen los programas se encuentra el tamaño esperado del producto, la temperatura óptima de alineamiento, el peso molecular, la localización y secuencia de cada iniciador. La mayoría de los programas determinan si el iniciador posee sitios de unión secundarios en cualquiera de las hebras de la secuencia seleccionada.

Figura 9. Programa de diseño de iniciadores

DNA file: C:\HUMBY.SEQ	
LOCUS	HUMBYH7 28438 bp ds DNA
30-JAN-1996	
Annealing temp. 57.0 °	Upper Oligo: Positive strand of C:\HUMBY.SEQ
Product Tm - Primer Tm 27.5 °	pos. 19778 (18-mer)
Primers difference in Tm 2.9 °	5'-GCC CCC AAC ATC CAT CAT-3'
Mr (U) : 5429 Mr (L) : 6383	
U : 19778 (18) L : 19970 (20)	
Product length 212 bp	Lower Oligo: Negative strand of C:\HUMBY.SEQ
Initial template conc. 0.244 pM	pos. 19970 (20-mer)
Salt concentration 50 mM	5'-GGG GAG ACT GTG GTG GGA AC-3'
Multiplication factor 4.00	
Upper/Lower dimer formation:	
5'-GCCCCCAACATCCATCAT-3' 3'-TGGTGTGACAGGGG-5'	

Los iniciadores se utilizan en concentraciones de 0.1 a 0.5 μM , ya que las que son mayores pueden promover una unión inadecuada al DNA molde y, por ende, la acumulación de productos inespecíficos que incrementan la probabilidad de generar artefactos⁶⁴.

DNA Polimerasa I termoestable

Los protocolos originales de PCR se desarrollaron utilizando al fragmento Klenow de la DNA pol I de *Escherichia coli*; dicha enzima presentaba actividad de exonucleasa en dirección 5'→3' pero, al no ser termoestable, se inactivaba durante la fase de desnaturalización, debiéndose añadir más enzima antes de la etapa de alineamiento. Este hecho, combinado con la baja temperatura requerida para la elongación, daba lugar a una reacción de baja eficiencia y especificidad⁷⁴.

En tal contexto, un descubrimiento técnico de gran importancia para la PCR fue el reemplazo de la enzima Klenow por una serie de DNA polimerasas termoestables⁷¹. La primera de estas enzimas en ser utilizada fue la *Taq* DNA polimerasa I (*Taq* pol I), obtenida de la bacteria Gram-negativa *Thermus aquaticus*. El gen estructural para la *Taq* pol I codifica para una proteína de peso molecular estimado de 93,910 daltons y se ha clonado y secuenciado debidamente.

La *Taq* pol I altamente purificada tiene una temperatura óptima (T_{opt}) de 70° a 80°C con una V_{max} máxima a los 180 nucleótidos/segundo/molécula de enzima (nt/s), cifra que supera a los 16 a 20 nt/s de la *E. coli* DNA pol I²³.

La concentración a la cual se utiliza la *Taq* pol I es de 1.0 a 2.5 unidades⁴². Cuando la concentración es muy alta se pueden acumular productos inespecíficos de fondo; en contraste, cuando

es muy baja suele obtenerse una cantidad insuficiente del producto deseado.

Desoxirribonucleótidos

La síntesis de DNA requiere desoxirribonucleótidos trifosfato libres (dNTPs); la concentración de cada uno debe de ser 200 μM , para lograr la especificidad y fidelidad óptima de la PCR. En todo caso, los cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) deben utilizarse en concentraciones equivalentes, a fin de minimizar los errores en la incorporación³³, mismos que pueden interferir durante la hibridación DNA-DNA, ocurrida entre el producto de la amplificación y las sondas marcadas empleadas en el diagnóstico de las diversas enfermedades.

Basta una concentración 20 μM de cada uno de los dNTPs, en un volumen de reacción de 100 μL , para sintetizar 2.6 μg de una secuencia de 400-bp de DNA⁵⁴.

Así las cosas, se prepara una solución patrón (*stock*) de cada uno de los dNTPs, en concentraciones de 5 ó 2.5 mM (determinada espectrofotométricamente), a pH 7.0 utilizando agua destilada; dichas soluciones se conservan en el congelador (-20°C), pero se recomienda tomar alícuotas pequeñas para disminuir el riesgo de contaminación⁷⁰ y evitar el descongelamiento repetido de la totalidad de la solución patrón de dNTP, pues esto último disminuye su vida en anaquel. La solución de trabajo de cada dNTP se prepara a una concentración 1 mM.

¹ Una concentración final total de dNTPs mayor a 50 mM en la mezcla de reacción de PCR inhibe la actividad de la Taq DNA pol I.

Iones magnesio

Uno de los ingredientes más importantes en la reacción de PCR es el ión Mg^{2+} , ya que su concentración afecta el alineamiento de los iniciadores, la temperatura de fusión del DNA y la actividad enzimática de la *Taq* DNA pol I³⁴. El intervalo óptimo se localiza entre 0.5 - 4.0 mM.

Evidentemente, la presencia de EDTA o de otros agentes quelantes en la mezcla de reacción puede disminuir la concentración de magnesio. Además, es conveniente determinar la concentración óptima de dicho ión para cada par de iniciadores, lo cual se logra mediante corridas simultáneas en las que se varía el factor en cuestión.

La *Taq* DNA pol I requiere de iones magnesio libres para poder unir al DNA molde, los iniciadores y los dNTPs; en la mayoría de las identificaciones de bacterias patógenas por PCR, la concentración óptima de $MgCl_2$ es de 2.5 mM.

Amortiguador de reacción

La solución amortiguadora recomendada para realizar la PCR es de Tris-Cl de 10 a 50 mM a pH 8.3 a 8.9. En la mayoría de los casos, el empleo adecuado del medio de reacción incrementa la especificidad y el rendimiento de los productos de amplificación⁵⁴; por ejemplo, el incremento de la concentración de Tris-Cl a 50 mM (pH 8.9), aunado a una concentración de KCl 50 mM, facilita el alineamiento específico de los iniciadores, lo que se traduce en una mayor especificidad de la reacción. No obstante, también se debe considerar que una concentración de KCl mayor a 50 mM inhibe la actividad de la *Taq* DNA pol I³⁴.

Adicionalmente, para estabilizar la actividad de la *Taq* DNA pol I, se puede utilizar gelatina o albúmina sérica bovina (100 µg/mL) junto con detergentes no iónicos como el *Tween* 20 o el *Laureth* 12 (0.05-0.1%); es importante mencionar que si se utiliza gelatina, ésta debe esterilizarse adecuadamente, ya que existen casos de resultados falsos-positivos de detección de ciertas bacterias tales como *E. coli*, debido a que contaminan a dicha proteína⁷⁰.

Cosolventes

Cuando el DNA molde contiene estructuras secundarias fuertes, o se utiliza un iniciador que se une en las proximidades de una estructura de "pasador", es oportuno utilizar un cosolvente como el dimetilsulfóxido (DMSO) al 1-10%. De igual forma, la adición de glicerol al 5-20% incrementa el rendimiento de la reacción de amplificación para fragmentos de DNA molde mayores a 2.5 kbp.

Cubierta de aceite mineral

Frecuentemente, es necesario utilizar una cubierta de 50 a 80 µL de aceite mineral en la superficie de la mezcla de reacción, a fin de prevenir la evaporación del líquido. Dicha cubierta también estabiliza la temperatura y puede llegar a incrementar hasta 5 veces el rendimiento de la reacción. Actualmente, el uso de aceite mineral se ha reemplazado por el de parafina para evitar la contaminación del producto y la necesidad de purificarlo mediante extracción con cloroformo. Sin embargo, cabe subrayar que en algunos de los termocicladores más recientes existe un mejor control de la temperatura, por lo que el tiempo total requerido para la PCR es tan corto que la cubierta se vuelve innecesaria⁴.

Parámetros de reacción

A) Desnaturalización del DNA (94°C)

Una de las fallas más frecuentes en la amplificación por PCR se debe a una desnaturalización incompleta del DNA molde. En la etapa inicial de la desnaturalización se somete el DNA a 94°C durante 3 a 5 minutos, mientras que en los ciclos subsecuentes es suficiente un período de 20 a 30 segundos. La temperatura de la reacción debe medirse mediante una termopar de poca masa, colocada en un tubo de reacción, con un volumen de aceite mineral similar a la mezcla de reacción utilizada; con ello se verifica que la solución alcance en realidad la temperatura requerida para la desnaturalización⁴.

Las fases de desnaturalización con temperaturas muy altas o tiempos muy prolongados suelen ocasionar pérdidas innecesarias en la actividad de la enzima. El tiempo de vida media de la actividad enzimática de la *Taq* DNA pol I es mayor de 2h, 40 minutos y 5 minutos a 92.5°, 95° y 97.5°C, respectivamente³⁴.

B) Alineamiento de los iniciadores (1 minuto)

La temperatura y el tiempo requeridos para lograr el alineamiento de los iniciadores dependen de la composición, tamaño y concentración de los mismos. La temperatura se calcula mediante la expresión $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$, sin embargo, el ajuste de la misma corresponde a un proceso empírico, pues, en ocasiones, se utiliza por arriba o por debajo de la T_m estimada para el par de iniciadores; esto, en parte, se debe a que en la expresión no se toma en consideración la concentración de Mg^{2+} .

La T_m debe calcularse para cada iniciador y la etapa de alineamiento se programa a una temperatura 5°C inferior de la menor T_m estimada⁴.

Si existen problemas con productos inespecíficos de amplificación se puede llevar a cabo el alineamiento y la extensión en un solo paso, entre los 60° y 72°C. Como es sabido, el aumento de la temperatura aumenta las condiciones de estrictancia⁵⁴.

C) Extensión de los iniciadores (72°C)

El tiempo requerido para la extensión o elongación depende de la longitud y la concentración de la secuencia "blanco", así como de la temperatura de operación. Tradicionalmente se desarrolla a 72°C durante 1 minuto por cada 1,000 bp del producto deseado.

Si el producto es menor de 200 bp, se puede omitir el paso de extensión, ya que la *Taq* DNA pol I es lo suficientemente activa a baja temperatura como para completar la reacción durante la transición entre las temperaturas de alineamiento y de desnaturalización del siguiente ciclo. La velocidad estimada de incorporación de nucleótidos de la *Taq* DNA pol I a 72°C varía entre 35 y 100 nucleótidos/segundo, dependiendo del amortiguador, pH, concentración de las sales y naturaleza del DNA molde³⁴.

D) Número de ciclos (25 a 30)

El número adecuado de ciclos depende principalmente de la concentración inicial de DNA "blanco", una vez optimizados los parámetros restantes. Al finalizar los ciclos de amplificación, la reacción se incuba a 72°C por 3 a 5 minutos para asegurar que el DNA amplificado se encuentre completamente sintetizado⁴.

Cuando se requieren más de 40 ciclos para amplificar un gen de copia única, es muy probable que esté ocurriendo algún problema con la reacción de PCR; generalmente, un programa con

numerosos ciclos incrementa la cantidad y la complejidad de los productos inespecíficos de la reacción¹⁴.

Por otra parte, cuando no se obtiene ningún producto de amplificación bajo los parámetros descritos, significa que existe algún error en el diseño experimental. Antes de tratar de optimar la reacción, se debe revisar en busca de algún error eventual, particularmente en relación con el diseño de los iniciadores (principalmente con la orientación 3'-OH), o la T_m (bajo las condiciones de concentración salina de la reacción). Las condiciones inadecuadas de temperatura, dentro del ciclo de amplificación, son la causa más frecuente de error y, adicionalmente, las más fáciles de corregir⁴.

Aunque la PCR es una reacción muy compleja (con al menos 13 componentes diferentes), los parámetros que influyen en el rendimiento y la eficiencia pueden ajustarse en forma sistemática. Las principales variables a controlar son: A) la concentración de los iniciadores y del DNA molde; B) la concentración de Mg^{2+} ; C) la concentración de los dNTPs; D) la temperatura de alineamiento y el programa de temperaturas del termociclador⁵⁴.

Controles

Dado el gran alcance de amplificación que reside en una sola copia del DNA "blanco", es de extrema importancia evitar cualquier traza de contaminación con DNA que contenga la secuencia objetivo⁷⁰. Cualquier contaminación de la reacción de amplificación, ya sea con productos de reacciones previas de PCR (acarreo), con ácidos nucleicos exógenos provenientes del medio ambiente del laboratorio, con la piel del personal, o contaminación cruzada entre muestras, pueden generar resultados falsos positivos.

Es fundamental contar con muestras "control" apropiadas en la realización de cada corrida de PCR en la que se analicen muestras "problema". Para detectar la posibilidad de contaminación de los reactivos de la PCR con DNA "blanco", se debe amplificar una muestra control que no contenga DNA molde y, se examinan los productos de la reacción en un gel teñido con EthBr⁴.

De igual forma, se pueden correr periódicamente diluciones seriadas de los microorganismos "problema" obtenidos a partir de cultivos puros, iniciando con una concentración de 10^4 células que se mezclan con la muestra biológica a analizar en el futuro inmediato; esto facilita determinar la sensibilidad de la técnica y permite detectar la presencia de eventuales agentes inhibitorios en la propia muestra.

Entre las medidas preventivas para evitar la contaminación de la reacción de PCR destacan las siguientes:

1. Trabajar en campanas de flujo laminar.
2. Utilizar guantes desechables, evitando tocar el interior de los tubos de reacción y sus tapas. Además, en algunos laboratorios utilizan cofia y cubreboca para reducir la contaminación debida al personal.
3. Contar con micropipetas de desplazamiento positivo.
4. Utilizar puntas de micropipeta con barreras, para prevenir la contaminación del barril de la micropipeta.
5. Utilizar micropipetas específicas para las diferentes fases de la reacción, que sólo se utilicen para esos fines.
6. Preparar alícuotas de los reactivos y el amortiguador de reacción, de modo que sólo se utilicen una vez.
7. Separar físicamente la zona de preparación de la reacción, en relación al área de análisis de los productos de la amplificación.

8. Utilizar controles negativos, controles sin iniciadores y controles sin DNA (para evidenciar la contaminación), en cada corrida de PCR.
9. Evitar la reamplificación de productos primarios de amplificación.

Para prevenir la amplificación de contaminantes se han desarrollado varios procedimientos^{4,25,70}, entre los cuales figuran la exposición de la mezcla de reacción a radiaciones ultravioleta ($\lambda = 254$ nm, durante 5 a 20 minutos), previa a la adición de la muestra y de la *Taq* DNA pol I, u opcionalmente, el tratamiento de la mezcla de reacción con 0.5 a 1.0 U de DNAsa; la muestra y la *Taq* DNA pol I se agregan después de la inactivación correspondiente.

Limitaciones de la PCR

Sin lugar a dudas, una de las principales limitaciones de la PCR, es el efecto de meseta o *Plateau*; es decir, las reacciones de PCR continúan hasta cierto punto y, de pronto, se detienen. En la mayoría de los casos, después de 20 a 40 ciclos, la reacción entra en una fase lineal donde disminuye la acumulación exponencial del producto¹⁴.

Dicha disminución ocurre cuando el producto alcanza una concentración 10^{-8} M (aproximadamente 10^{12} moléculas en un volumen de reacción de 100 μ L); a ello se le denomina efecto de meseta.

La mayor limitante de la PCR es la cantidad presente de la *Taq* DNA pol I. En una mezcla de reacción típica, 2.5 U de AmpliTaq DNA polimerasa (Perkin-Elmer Corp.) son aproximadamente 10^{-9} M, lo cual representa un exceso inicial de la enzima de 200,000

veces, en relación a las moléculas del DNA "molde"; por su parte, el exceso de cada iniciador es de 2×10^7 y 4×10^{10} de cada dNTP.

Si se asume que la eficiencia de una reacción de PCR de 20 ciclos es del 85% y que el proceso inició con 300,000 moléculas de DNA "molde", la concentración de éstas también será de 10^{-9} M¹⁴.

En el momento en el que el número de moléculas del DNA "molde" excede al de moléculas de la enzima, la reacción se volverá lineal. Como la cantidad de enzima se reduce (por inactivación térmica después de cada paso de desnaturalización) y la eficiencia del alineamiento de los iniciadores también disminuye (a causa del aumento constante de la competencia por los iniciadores, al disminuir estos últimos y existir, en contraste, un mayor número de secuencias "blanco"), la reacción se termina.

Protocolo básico para la PCR

A continuación se describe una reacción de amplificación catalizada por la *Taq* DNA pol I, utilizando el equipo de PCR AmpliTaq (Perkin-Elmer Corp.), el cual incluye un amortiguador de reacción previamente preparado, cuya composición es la siguiente:

Amortiguador de Reacción 10 x

50 mM KCl

10 mM Tris-Cl (pH 8.4)

1.5 mM MgCl₂

0.01% [p/v] Gelatina estéril

Generalmente, se usa una cantidad de DNA suficiente para obtener 10^5 a 10^6 moléculas de la secuencia "blanco"; en este sentido, es útil contar con las siguientes equivalencias:

10.0 ng de DNA de levadura equivalen a 3×10^5 blancos

1.0 ng de DNA de *E. coli* equivale a 3×10^5 blancos

1.0% de una placa de M13 equivale a 10^6 blancos

Las cantidades que se indican en el protocolo se encuentran estandarizadas para preparar una mezcla de reacción de PCR de 50 μ L, mediante la cual se obtiene suficiente cantidad de producto para la mayoría de las aplicaciones; sin embargo, es posible escalar las cantidades para reacciones de 100 μ L ó 25 μ L.

1.- Retirar los reactivos (alícuotas de los mismos) del congelador de -20°C y colocarlos en un recipiente con hielo, dentro de la campana de extracción.

2.- Descongelar por completo los reactivos, agitándolos ligeramente con el Vórtex y centrifugándolos después por 1 a 2 segundos en microcentrifuga (lo que ayuda a reducir la contaminación); colocarlos nuevamente en el baño de hielo.

3.- Preparar la mezcla maestra (*Master mix*) agregando los reactivos a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, en el siguiente orden: H_2O , amortiguador 10x y dNTPs; la cantidad debe ser suficiente para el número de muestras a analizar más los controles. No agregar los iniciadores, ni la muestra de DNA o la enzima.

El volumen de la mezcla puede variar en cada experimento, debido a que los volúmenes del DNA "molde" y de los iniciadores pueden ser diferentes. El volumen final de la reacción se ajusta con el agua que se añade a la mezcla maestra.

Si se van a utilizar diferentes volúmenes de DNA y de iniciadores en una sola PCR, el agua se agregará en forma individual, para ajustar cada tubo de reacción.

Es conveniente tomar en cuenta que la mayoría de las presentaciones comerciales de *Taq* DNA pol I se envían en glicerol al 50%, el cual es extremadamente viscoso; por ello, se debe tener precaución al medir con precisión la cantidad de volumen de enzima a utilizar.

4.- Distribuir la mezcla maestra en porciones equivalentes, en un número de tubos de reacción estériles igual al número de muestras a procesar (incluyendo los controles). Una vez añadida dicha mezcla, los tubos deben mantenerse cerrados en todo momento, excepto cuando se agregan la muestra de DNA y la polimerasa. Este último paso puede llevarse a cabo a temperatura ambiente.

5.- Someter los tubos a radiación U.V. ($\lambda=254$ nm por 5 a 20 minutos) para eliminar la posible presencia de DNA contaminante.

6.- Agregar la muestra de DNA al tubo correspondiente, tratando de evitar la formación de aerosoles que pudieran generar contaminación cruzada con otras muestras. Asegurarse de que el DNA se deposita completamente, al mezclar con ayuda de la micropipeta. Utilizar una punta nueva para cada muestra.

7.- Añadir los iniciadores a la mezcla de reacción, evitando el contacto de la punta de la micropipeta con las paredes del tubo (para evitar la contaminación).

En caso de duda, es conveniente utilizar una punta nueva. Cabe subrayar que cuando no se pretenda someter la mezcla maestra a luz U.V., los iniciadores se pueden incorporar a la mezcla antes de su distribución en los diferentes tubos de reacción.

Tabla 4. Composición típica de una reacción de PCR

Componente	Solución patrón	Volumen (μL)	Concentración Final
Amortiguador de reacción*	10 x	5	1 x
MgCl ₂	25 mM	3	1.5 mM
dGTP	10 mM	2	200 μM
dATP	10 mM	2	200 μM
dTTP	10 mM	2	200 μM
dGTP	10 mM	2	200 μM
Iniciador 1	50 pmol/ μL	1	1.0 pmol/ μL
Iniciador 2	50 pmol/ μL	1	1.0 pmol/ μL
DNA molde	0.01 -1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	5	
Taq DNA pol I	5 U/ μL	0.25	2.5 U Total

Nota: El amortiguador 10x contiene Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, y KCl 500 mM.

8.- Agregar la Taq DNA pol I a cada tubo de reacción, mezclando con ayuda de la micropipeta; descartar la punta utilizada y colocar una nueva para cada muestra.

9.- Mezclar completamente la reacción utilizando el Vórtex y centrifugar brevemente en microcentrífuga.

10.- Cubrir el contenido de la reacción con aceite mineral, usando por lo menos 40 μL (para prevenir la evaporación). En este punto, se debe recordar que existen algunos termocicladores diseñados para trabajar sin la adición de barreras contra la evaporación.

11.- Colocar los tubos de reacción en el termociclador e iniciar el programa de amplificación. Un programa típico de amplificación es el siguiente:

A) Desnaturalización: 96°C, 3 minutos

B) 25 a 35 ciclos de PCR con el siguiente perfil:

Desnaturalización: 94°C, 15 segundos

Alineamiento de iniciadores: 55°C, 30 segundos

Extensión de los iniciadores: 72°C, 1.5 minutos

El programa debe concluir con una extensión final a 72°C, 5 minutos

Las reacciones se detienen al enfriar a 4°C y se mantienen a dicha temperatura hasta su análisis.

Es importante señalar que los tubos de reacción deben identificarse previamente para evitar confusiones, utilizando un marcador indeleble para marcar en dos posiciones diferentes del tubo; también es recomendable anotar todos los datos en una bitácora (fecha, procedencia de las muestras, tipo de muestra, paciente, número de tubo asignado, cálculos de la mezcla maestra, iniciadores utilizados y el programa de amplificación de PCR.).

Organización en el laboratorio

La tecnología de PCR se ha convertido rápidamente en una parte esencial de los laboratorios de Biología Molecular, habiéndose requerido en todo ellos de una considerable inversión de dinero, tiempo y espacio. Sin lugar a dudas, la inversión a realizar debe relacionarse con las necesidades experimentales.

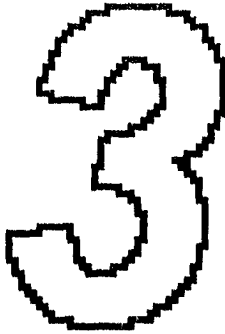
Los iniciadores se almacenan separados de los demás reactivos (amortiguador 10x, MgCl₂, dNTPs, Taq DNA pol I); se sugiere filtrar el agua que se va a utilizar en la reacción, con filtros MilliQ, esterilizarla en autoclave y mantenerla en congelación a -20°C en alícuotas de 1.0 mL (de uso único).

Es recomendable trabajar en una campana de flujo laminar, equipada con luz ultravioleta, respetando los procedimientos de esterilidad. La campana deber contener una microcentrífuga, guantes desechables, un juego de micropipetas específicas para la PCR, una cantidad adecuada de puntas para micropipeta y otros suministros que sean necesarios.

Las puntas y guantes usados se depositan en un contenedor desechable, el cual debe retirarse después de mezclar las reacciones. Las lámparas de luz U.V. se mantienen encendidas cuando la campana no esté en uso.

Las reacciones de PCR deben realizarse y analizarse en áreas físicamente separadas del lugar en donde se almacenan los reactivos y se mezclan las reacciones. Como premisa, debe considerarse que todos los equipos y suministros de dicho laboratorio están contaminados, por lo que se mantienen alejados de las áreas de mezclado y almacenamiento.

CAPÍTULO **Identificación y análisis del DNA amplificado.**



Una de las principales decisiones del usuario de la PCR consiste en establecer el método adecuado para detectar el producto amplificado. De hecho, entre los métodos disponibles existen diferencias significativas en términos de sensibilidad, especificidad, dificultad y costo.

Como el producto primario de la PCR es una molécula dúplex de DNA lineal, de longitud predeterminada y secuencia definida, el método de detección ideal debería permitir una determinación precisa del tamaño y de la pureza del producto amplificado.

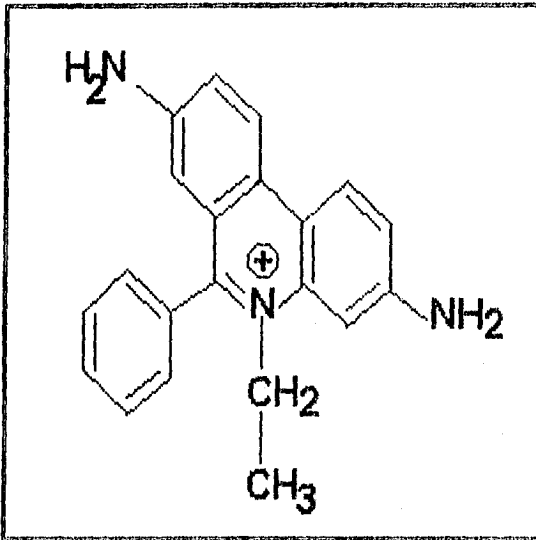
En ese sentido, la PCR ha impulsado el desarrollo de un sinnúmero de técnicas asociadas al análisis de los productos de la reacción, existiendo desde las que se basan en el uso de simples geles de agarosa hasta las que realizan la secuenciación del DNA y pueden ser utilizadas en la mayoría de los laboratorios de Biología Molecular²⁴.

Geles de agarosa-bromuro de etidio

Uno de los métodos de detección más sencillos involucra el uso de geles de agarosa que contienen bromuro de etidio (EthBr). Este es un tinte fluorescente que se intercala entre las bases apiladas del DNA y provoca su fluorescencia al exponerse a luz U.V.

El análisis por electroforesis (en geles de agarosa o poliacrilamida) de los productos de la PCR es particularmente útil y representa el método más utilizado en los laboratorios, ya que aporta una evaluación rápida y semicuantitativa de la reacción, con una capacidad de detección entre 1.0 a 5.0 ng de DNA, mediante el uso del EthBr (consultar figura 10).

Figura 10. Molécula de etidio (EthBr)



Por otra parte, debe tenerse en mente las limitaciones relacionadas con los principios del funcionamiento de las unidades de electroforesis en gel, las cuales son circuitos eléctricos simples y que pueden esquematizarse mediante dos expresiones matemáticas usadas para describir la electricidad: La ley de Ohm, $V=IR$, declara que el campo eléctrico V (medido en voltios) es proporcional al producto de la corriente I (medida en miliamperes) por la resistencia R (medida en ohms).

! Es importante recordar que en la electroforesis se utilizan voltajes totalmente elevados. Debido al potencial riesgo, es conveniente usar aparatos con blindaje adecuado, una fuente de poder regulable conectada apropiadamente a tierra.

En este contexto, cuando se aplica un determinado voltaje al circuito, fluye una cantidad constante de corriente a través de todos los elementos, aún cuando éstos generan cierta resistencia. Para un segmento del gel, la resistencia es inversamente proporcional al área transversal y la fuerza iónica del amortiguador; usualmente, el gel genera casi toda la resistencia del circuito, puesto que tiene la menor área transversal. Consecuentemente, el voltaje aplicado al gel será igual al voltaje total aplicado al circuito, como lo indica la fuente de poder².

Si se disminuye el grosor del gel (y de la capa de amortiguador que lo cubre), o la fuerza iónica del amortiguador, aumentarán tanto la resistencia como el gradiente de voltaje a lo largo del gel, lo que incrementará la movilidad electroforética de la muestra.

El límite superior de voltaje utilizable dependerá de la capacidad del aparato para disipar el calor. La expresión $P=I^2 R$ indica que la potencia producida por el sistema P (medida en watts), es proporcional al producto de la resistencia por el cuadrado de la corriente.

La potencia generada se manifiesta como calor y los equipos de electroforesis tan sólo pueden disipar una fracción limitada de la potencia sin incrementar la temperatura del gel. Por arriba de este punto, cualquier aumento en el voltaje puede ocasionar un incremento significativo y potencialmente perjudicial, en la temperatura del gel.

Tomado en cuenta lo expuesto anteriormente, la electroforesis en gel de agarosa puede usarse para separar y purificar fragmentos de DNA de longitudes comprendidas entre 0.5 y 25 Kb, variando únicamente la concentración de agarosa:

Tabla 5. Concentración apropiada de agarosa para separar fragmentos de DNA de diferente tamaño

% de Agarosa	Intervalo efectivo de resolución de fragmentos lineales de DNA (Kb)
0.5	30 a 1
0.7	12 a 0.8
1.0	10 a 0.5
1.2	7 a 0.4
1.5	3 a 0.2

El gel se prepara mezclando el amortiguador de electroforesis y la agarosa; la mezcla se derrite en un horno de microondas o en el autoclave, se agita hasta lograr su homogeneización, se enfría a 55°C y se adicionan 0.5 µg/mL de EthBr^k. Posteriormente, se vierte en la plataforma de moldeado (también llamada porta gel, la cual está sellada en sus extremos) y el peine se coloca en posición. El gel se deja solidificar a temperatura ambiente.

Una vez que solidifica el gel, se retiran con cuidado los sellos del porta geles y el peine. El gel se coloca con todo y porta gel en el tanque de electroforesis, cubriéndolo con suficiente amortiguador de electroforesis hasta 1 mm por encima de la superficie del gel, con lo cual queda listo para cargarlo con las muestras del producto amplificado.

Por su parte, los tubos de microcentrifuga que contienen el producto de la reacción de PCR se centrifugan durante 10 segundos en una microcentrifuga clínica y se toman 10 µL, por debajo de la capa de aceite mineral. Las muestras de DNA se preparan para cargarlas en el gel al mezclarlas con 2 µL de amortiguador de carga 10x, el cual contiene los colorantes azul de bromofenol y cianol-xileno; el azul de bromofenol co-emigra con los fragmentos de aproximadamente 0.5 kb, mientras que el

^k El bromuro de etidio es potencialmente carcinógeno. Se debe usar guantes para su manejo.

cianol-xileno corre un 50% menos rápido que el azul de bromofenol y facilita el control de corridas electroforéticas prolongadas (con un % de agarosa elevado).

Se conectan las terminales de la fuente de poder, de tal modo que el DNA emigre al ánodo (+) y se aplican de 1 a 10 Volts/por cm de gel, hasta que el azul de bromofenol haya emigrado una distancia suficiente para lograr la separación de los fragmentos de DNA.

Para fotografiar el gel de agarosa se coloca en un transiluminador U.V. ($>2,500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) utilizando un filtro rojo y película a blanco y negro (como la *Polapan Pro 100* de *Polaroid*), o bien, con un filtro naranja y un filtro transparente bloqueador de luz U.V., con película a blanco y negro de ASA elevada (como la *Polaroid 667 ASA 3,000*).

Southern blot y sondas radioactivas

Una vez que se ha separado la mezcla de PCR por electroforesis en gel, se puede identificar un fragmento específico del DNA mediante la técnica de **Southern blot**. En esta técnica, se transfieren los fragmentos de DNA contenidos en el gel, a una membrana de nylon y la secuencia de interés se identifica por hibridación con una sonda de oligonucleótidos marcada².

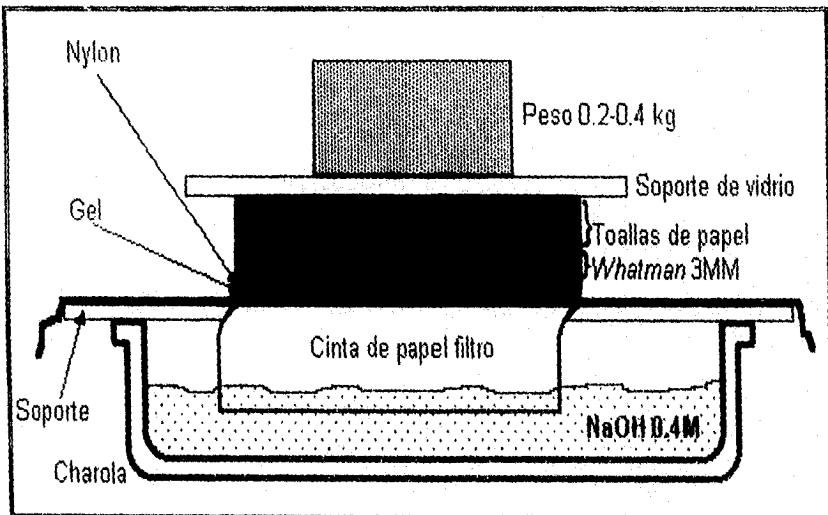
La sonda marcada posee una secuencia específica (que no es complementaria a la secuencia de los iniciadores), localizada dentro del fragmento del DNA amplificado; generalmente, dicha sonda es de 18 a 50 nucleótidos de largo.

¹ Tener precaución al trabajar con luz U.V. ya que puede dañar los ojos y la piel expuesta; se debe usar lentes o careta protectora.

Después de la electroforesis, el gel se cubre completamente con 500 mL de HCl 0.2 N durante 10 minutos^m y se lava varias veces con H₂O^m. Por otro lado, se recorta una pieza de membrana de nylon, de modo que sea 3 mm menor que las dimensiones del gel de agarosa, se humedece en un recipiente con agua durante 1 minuto y, después, se coloca en una charola con NaOH 0.4 M por espacio de 5 a 10 minutos.

Posteriormente, se cortan entre 3 y 5 hojas de papel filtro *Whatman* 3MM, en piezas 7 mm menores (en ambas dimensiones) que la membrana de nylon. Además, se prepara una cinta de papel filtro ~2 cm más ancha que el ancho del gel y entre 30 y 40 cm de largo, la cual se humedece en la charola con NaOH 0.4 M. Se ubica una placa de vidrio sobre la charola y se coloca la cinta sobre ella (consultar figura 11). Es importante retirar las burbujas de aire que se formen entre la cinta y la placa de vidrio.

Figura 11. Transferencia del DNA para Southern blot



^m Agitar suavemente, levantando un extremo del recipiente, con movimiento basculante.

El gel se retira del agua y se acomoda encima de la cinta de papel filtro, retirando cualquier burbuja de aire. Después, se dispone cuidadosamente la membrana de nylon, exactamente sobre el gel (una vez colocada no debe moverse) y sin que se quede aire atrapado.

Se humedece una pieza de papel *Whatman* 3MM en NaOH 0.4 M, y se coloca encima de otro papel seco, para retirar el exceso de NaOH. El papel húmedo se sitúa sobre la membrana de nylon, de modo que la cubra exactamente y sin capturar aire.

Encima del papel húmedo se emplaza una pila de papel *Whatman* 3MM, de aproximadamente 1 cm de altura y, sobre de ésta, se colocan toallas de papel hasta alcanzar entre 2 a 3 cm de altura. Finalmente, se cubre con una placa de vidrio y se hace presión sobre el sistema, mediante un objeto que pese entre 0.2 y 0.4 Kg (consultar figura 15).

Los extremos de la charola se cubren con el plástico autoadherente y se realiza la transferencia durante 2 a 12 horas; transcurrido dicho tiempo, se retira el dispositivo y se marca la posición del primer pozo en la esquina superior derecha de la membrana (con una pluma azul de punto rodante). Se retira la membrana de nylon y se introduce durante 5 minutos en solución salina de citrato de sodio (SSC) al 2x y, aún húmeda, se le cubre con una capa de plástico auto adherente (*Reynolds Wrap*)ⁿ.

Se coloca la membrana de nylon dentro del transiluminador U.V. (con el DNA hacia arriba) durante un período óptimo, determinado empíricamente. Los lapsos de exposición muy largos pueden dañar al DNA y producir una hibridación muy pobre con la sonda marcada.

ⁿ Mantenga la membrana de nylon húmeda para reducir la radioactividad de fondo.

Posteriormente, se retira el plástico de la membrana y ésta se coloca en una bolsa de cierre hermético para pre-hibridarla con 6 a 10 mL de solución de pre-hibridación, durante 3 a 6 h, a una temperatura de 37° a 42°C.

La sonda marcada se prepara previamente al hervir una cantidad aproximada de 500,000 cuentas por millón/mL, en 6 a 10 mL de solución de hibridación, durante 5 minutos y, una vez completada la pre-hibridación, se desecha la solución de pre-hibridación y se coloca la solución de hibridación-sonda marcada durante 6 hr, a la misma temperatura a la cual se realizó la pre-hibridación.

Una vez terminada la hibridación, se retira la membrana de la bolsa y se lava con agitación con las siguientes soluciones, como se indica a continuación:

SSC 2x/SDS 0.1% - 5 minutos, a temperatura ambiente

SSC 2x/SDS 0.1% - 15 minutos, a temperatura ambiente

SSC 0.5x/SDS 0.1% - 15 minutos, a temperatura ambiente

SSC 0.1x/SDS 0.1% - 15 minutos, a temperatura ambiente

SSC 0.1x/SDS 0.1% - 30 minutos, a 42°C

Finalmente, se deja secar la membrana al ambiente y se le expone una película de rayos-X, en un cassette metálico con pantalla intensificadora, durante 24 h.

Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP)

Otro concepto importante relacionado con el uso de sondas para identificar especies bacterianas, es el polimorfismo de longitud en los fragmentos de DNA cortados mediante enzimas de restricción.

La mayoría de los genomas microbianos poseen regiones que presentan una variabilidad muy grande; es decir, en ciertas partes del genoma, algunas secuencias de oligonucleótidos tienden a variar de una cepa a otra, aunque no dentro de una cepa determinada.

Esta variabilidad puede ser observada cuando el DNA cromosomal es purificado y separado en varios fragmentos con endonucleasas de restricción (enzimas que cortan el DNA en fracciones específicas de nucleótidos). Consultar tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de reconocimiento^o de algunas enzimas de restricción

Microorganismo	Nombre de la enzima	Secuencia de reconocimiento
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	G↓AATTC
<i>Escherichia coli</i>	EcoRII	↓CCAGG (secuencia no palindrómica)
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindII	GTPy↓PuAC
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	AAG↓CTT
<i>Bacillus subtilis</i>	BsuRI	GG↓CC
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	T↓CGA

Nota: Las flechas indican los sitios de ataque enzimático. Las negritas señalan sitios de metilación (modificación); Pu=cualquier purina; Py=cualquier pirimidina. A=adenina; T=timina; G=guanina; C=citosina. Sólo se muestra la secuencia de 5'→3'.

Una vez digerido el DNA con la enzima de restricción correspondiente, los fragmentos se separan mediante una electroforesis en gel de agarosa; la distancia emigrada por cualquiera de las bandas del DNA en dicho gel, puede

^o Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción son de 4 a 6 nucleótidos de largo; generalmente, se encuentra un número limitado de dichas secuencias en una pieza de DNA.

relacionarse con la longitud del fragmento, al calibrar el sistema de electroforesis con moléculas de DNA de tamaño conocido^p.

Cuando se segmenta el DNA de dos cepas diferentes y se separa a los fragmentos mediante electroforesis, es posible distinguir a simple vista las diferencias en el patrón de bandeo. En ocasiones, dichas diferencias pueden ser muy sutiles y difíciles de discernir; sin embargo, al emplear sondas que hibridan específicamente dentro de las regiones de alta variabilidad, se acentúan las diferencias y se facilita el reconocimiento.

El patrón de bandas obtenido mediante la digestión con distintas enzimas de restricción y el posterior análisis mediante *Southern-blot* (proceso conjunto denominado **mapa de restricción**), es único para cada cepa, puesto que es el producto de la hibridación de la sonda a los fragmentos de restricción de diferentes tamaños (polimorfismo) creados por la variabilidad en los sitios de reconocimiento de las enzimas. Esto permite tipificar con exactitud las diferentes cepas^{q2} (consultar figura 12).

Las enzimas de restricción deben almacenarse a -20°C y, mientras se están utilizando, mantenerse en baño de hielo. El amortiguador puede almacenarse a -20°C en soluciones patrón al 10x, hasta por un año. Se debe procurar no contaminar las soluciones con DNA de plásmidos, otras enzimas de restricción o DNAsa I.

La digestión completa del DNA se realiza (por separado) en diferentes tubos de microcentrífuga, a 37°C durante 1 h^q utilizando diferentes enzimas de restricción; por ejemplo: *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *KpnI*, *SallI* y *XhoI*.

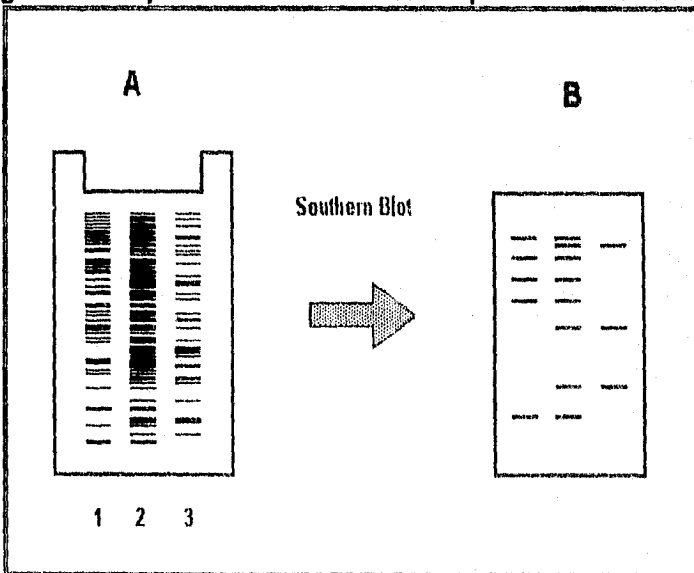
^p Calibrador de peso molecular: puede tratarse de fragmentos sintéticos de DNA de tamaño conocido, como las escaleras (por ejemplo *Ladder 100 bp*), o ácidos nucleicos de virus conocidos, que se han cortado con enzimas de restricción, como el Fago λ /HindIII.

^q 1U de enzima de restricción digiere completamente 1 μ g de DNA en 60 minutos.

Para detener la reacción se agregan 5 μ L (20% del volumen total) de amortiguador de carga al 10x; alternatively, puede inactivarse la enzima por calentamiento. Se toma una alícuota del DNA digerido y se separa mediante electroforesis en gel, determinando el número de sitios de corte para cada endonucleasa.

Posteriormente, se transfiere una alícuota de cada una de las muestras a sus respectivos tubos (por separado) y se fragmenta con una segunda enzima; habiendo terminado la electroforesis, se comparan los fragmentos resultantes de la digestión con: (1) la primera enzima únicamente; (2) dos enzimas; y (3) la segunda enzima solamente.

Figura 12. Mapa de restricción obtenido por análisis de RFLP



(consultar figura 12

El anterior procedimiento se repite hasta que pueda determinarse un mapa de restricción con sitios de corte categóricos y consistentes².

El análisis de DNA cromosomal por RFLP's se ha utilizado exitosamente para tipificar diferentes especies bacterianas; en este procedimiento, el paso clave radica en la obtención de DNA de alto peso molecular. Sin embargo, la técnica depende de la capacidad del investigador para discernir las posibles diferencias, aún cuando el análisis por *Southern blot* facilita la interpretación.

Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)

El análisis de SSCP permite identificar mutaciones puntuales y deleciones en una molécula de DNA amplificada por PCR. La técnica se fundamenta en el principio teórico de que una hebra sencilla de DNA no asume una conformación espacial aleatoria en soluciones hidrofílicas, sino que cada molécula existe en una configuración específica de menor energía, donde el reemplazo de un par de bases puede alterar considerablemente la conformación final. Dichas diferencias conformacionales derivan en movilidades electroforéticas distintivas para moléculas de DNA que difieren, aún en un sólo par de bases, en su secuencia¹⁴.

En una PCR-SSCP, el producto de la amplificación se calienta para obtener hebras sencillas de DNA (ssDNAs), se enfría rápidamente la muestra en hielo y las ssDNAs se fraccionan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturante (en condiciones no desnaturantes).

Los métodos de detección pueden incluir la autorradiografía, la tinción con plata y el uso de iniciadores marcados con compuestos fluorescentes, entre otros.

La presencia de bandas de ssDNA, en diferentes posiciones dentro del gel, indican una secuencia diferente; la PCR-SSCP es capaz de detectar más del 90% de las mutaciones puntuales en fragmentos de 200 bp⁸⁹.

En un estudio realizado por Widjoatmodjo⁸⁹ se amplificó una secuencia altamente conservada, la 16S rRNA, que se encuentra presente en todos los microorganismos procariotes y, además, contiene regiones variables; esto permitió a los investigadores discriminar entre géneros y especies, mediante el análisis de los patrones electroforéticos obtenidos de diferentes bacterias.

Suelen emplearse de 1 a 10 μ L del producto de PCR, mezclados con 3 μ L de amortiguador de secuencia (5 mM EDTA, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de xilen-cianol en formamida), los cuales se calientan a 95°C por 5 minutos. El DNA desnaturalizado se coloca directamente en hielo por 10 minutos, antes de cargarlo al gel, para lo cual se toman 6 μ L de cada muestra.

El mini-gel de poliacrilamida se prepara al 6.0% (conteniendo 10% de glicerol y 0.005% de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) y se usa un amortiguador de Tris/ácido bórico/EDTA (TBE) al 0.6x para correr la electroforesis, durante 3 a 14 h (dependiendo del tamaño del DNA), a corriente constante (usualmente entre 3 y 5 watts), de forma tal que la temperatura del gel no se eleve mucho por encima de la temperatura ambiente.

Después de la electroforesis, el SSCP puede detectarse mediante una tinción con plata, mediante el método de Bassam⁵, donde se fija el gel en una solución de ácido acético al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lava 3 veces con agua desionizada durante 2 minutos. La impregnación de color se

logra al colocar el gel en una solución de nitrato de plata al 0.1% y formaldehído al 0.056% durante 30 minutos.

El gel se lava con agua desionizada por 20 segundos y se desarrolla el color mediante una mezcla de 30 g de carbonato de sodio por litro, formaldehído al 0.056% y 2 mg de tiosulfato de sodio por litro (durante 2 a 10 minutos); se detiene la tinción agregando ácido acético al 10%.

Marcaje con biotina o digoxigenina (DIG) y detección inmunoenzimática

Dado que la amplificación por PCR produce grandes cantidades de DNA, es posible utilizar marcas no radioactivas para intentar la detección de las secuencias de interés. Dichas marcas pueden incorporarse directamente en el producto de PCR, mediante el empleo de nucleótidos trifosfato modificados o iniciadores marcados en su extremo 5'.

Alternativamente, la PCR puede desarrollarse con los iniciadores y nucleótidos convencionales y detectar posteriormente el producto mediante el uso de sondas marcadas no radioactivas⁹¹.

Las marcas no radioactivas son preferibles que las radioactivas, ya que son estables por períodos considerables (por ejemplo 1 año) y tienen un margen de seguridad más amplio.

Las principales marcas localizadas en el extremo 5' de los iniciadores son el hapteno biotina (vitamina H) y una gran variedad de compuestos fluorescentes^{10,81}.

Por otra parte, entre las sondas de mayor sensibilidad, se encuentran los conjugados entre oligonucleótidos y enzimas tales

como la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés), la fosfatasa alcalina o la β -galactosidasa (consultar figura 13).

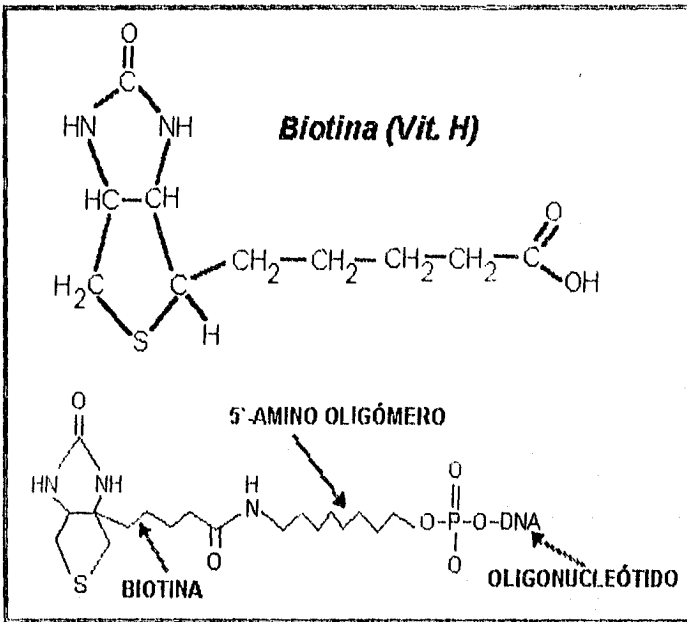
En la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés), los iniciadores marcados migran más lentamente que los no marcados, excepto cuando la marca posee un fuerte carácter aniónico.

Similarmente, es posible obtener sondas marcadas con biotina cuando se incluyen nucleótidos modificados como la biotina-11-dUTP (en una reacción previa de PCR) utilizando como DNA molde a dicho oligonucleótido. La biotina-11-dUTP se comercializa en forma de polvo (*Sigma Chemical Co.*) por lo que se requiere su disolución previa en Tris 100 mM + EDTA 0.1 mM a pH 7.5; cabe señalar que dicha marca se usa en una proporción de 3:1 (en relación con la concentración de dTTP) para lograr una incorporación del 25 al 30%.

Otro procedimiento que involucra marcar directamente al producto de una PCR es el siguiente: se añade a la mezcla de reacción biotina-11-dUTP o digoxigenina-11-dUTP (DIG, *Boehringer Mannheim Biochemicals*) en una proporción de 3:1, respecto a la concentración de dTTP o dCTP, según el caso (junto con los otros dNTPs)⁵³.

Como resultado de la amplificación se obtiene DNA marcado, debido a la incorporación al azar del nucleótido modificado; en este procedimiento se deben purificar las muestras marcadas para retirar la biotina o la DIG no incorporada, mediante el uso de un microconcentrador como el *Centricon*TM 10 (Amicon) y amortiguador TE a pH 7.5.

Figura 13. Sonda marcada con biotina



Una vez que se ha amplificado y marcado el DNA, éste se puede analizar mediante un ensayo de captura por hibridación en *sandwich*, con una sonda inmovilizada a algún soporte sólido, se trate de una membrana de nylon o de una microplaca de poliestireno³⁹.

La sonda inmovilizada es un oligonucleótido de secuencia complementaria al DNA amplificado y marcado (consultar figura 14), que posee un extremo homopolímero terminal de dT, denominado "cola poli-dT", de 100 a 150 nucleótidos de longitud. El mencionado homopolímero terminal de dT se forma durante la síntesis de la sonda por acción de la enzima desoxirribonucleotidiltransferasa (TdT) terminal⁸⁶.

La sonda se puede subclonar en un plásmido si antes se digiere con una enzima de restricción y se trata con DNA ligasa; el plásmido que contiene la sonda capturadora se fija por transferencia pasiva a la microplaca de poliestireno (mediante una modificación del método desarrollado por Nagata⁵⁹ para la fijación no covalente del plásmido al pozo de la microplaca) con la participación de un amortiguador de unión compuesto por KH_2PO_4 25 mM, pH 7.2 y MgCl_2 200 mM. Posteriormente, se lavan los pozos y se bloquean los sitios de unión restantes con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) al 1% en amortiguador salino de fosfatos 1x con pH 7.2.

Las placas se lavan y se secan, e inclusive, pueden almacenarse a temperatura ambiente en bolsas selladas térmicamente. Para su uso, las placas se pre-hibridan a 42°C por 30 minutos con amortiguador de hibridación.

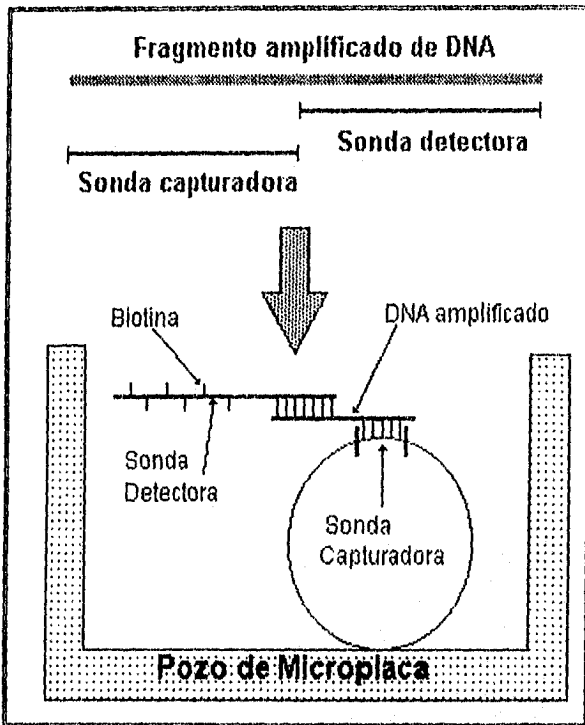
Una vez pre-hibridadas, se recoge una alícuota (de 5 a 10 μL) de la muestra de PCR, se diluye con Tris 10 mM (pH 8.0) + EDTA 2 mM hasta un volumen final de 10 μL y se mezcla con 2 μL de la sonda detectora. La hibridación se desnaturaliza agregando 2 μL de NaOH 2.5 M y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos, deteniendo la reacción con 15 μL de HEPES^s 2 M. A la mezcla se añaden 100 μL de amortiguador de hibridación y se coloca en la microplaca, una vez eliminada la reacción de pre-hibridación.

Las muestras se hibridan a 42°C durante 4 h y se lavan 4 veces con 200 μL de SSC al 2x. Los espacios libres se bloquean con 200 μL de BSA al 3% durante 10 minutos y se lavan los pozos con amortiguador de lavado, para agregar 100 μL del conjugado estreptavidina-peroxidasa (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en BSA al 3%).

^s Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etansulfónico

Finalmente, se lavan los pozos con 200 μL de amortiguador de lavado, y la reacción se revela con 300 μL del reactivo de color tetrametilbencidina durante 30 minutos; el revelado se detiene con 100 μL de H_2SO_4 al 2 N y se obtiene una coloración amarilla, la cual se mide a $\lambda=450$ nm contra un pozo control.

Figura 14. Captura por hibridación en sandwich



La estreptavidina es un tetrámero de subunidades idénticas que liga biotina con gran afinidad ($K_a=10^5$); de hecho, se une a 4 moléculas de biotina, mediante interacciones no covalentes que son esencialmente irreversibles. Se obtiene en forma recombinante a partir de *Streptomyces avidinii* y se conjuga con diversas enzimas o fluorocromos tales como el Cy-3, el cual tiene un máximo de excitación a 554 nm y emite entre los 568 y 574 nm.

Actualmente, se cuenta con estreptavidina conjugada a ***Isoluminol*** (*Sigma Chemicals*), que es un compuesto que presenta quimioluminiscencia.

Esta técnica de análisis por hibridación en *sandwich* es casi tan sensible como el *Southern-blot* tradicional, pero tiene la ventaja de ser más rápida y conveniente, puesto que no usa radioisótopos y permite utilizar el equipo estándar de ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzima (ELISA), presente en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico.

CAPÍTULO

La PCR en el diagnóstico de enfermedades bacterianas del humano**4**

El análisis por PCR permite detectar con una elevada sensibilidad y especificidad, a diversos patógenos presentes en las muestras clínicas.

Evidentemente, cada vez son más numerosos los reportes que difunden las ventajas asociadas a esta metodología^{1,15,19,22,44,92}, entre las cuales destaca la reducción del tiempo de identificación del agente etiológico, en relación con el cultivo convencional. En este sentido, la PCR es una herramienta particularmente útil para identificar patógenos cuyo cultivo *in vitro* es difícil, imposible o prolongado^{40,62}.

Tradicionalmente, la estrategia utilizada en la identificación de la mayoría de los patógenos involucra un cultivo de enriquecimiento, el aislamiento del microorganismo en medios selectivos y, finalmente, la realización de diversas pruebas bioquímicas⁹.

Dichas técnicas microbiológicas son laboriosas, con frecuencia requieren de varios días a semanas, e inclusive, algunos de los protocolos suelen fallar en la detección de ciertas cepas de bacterias virulentas que alcanzan cantidades poco abundantes.

Inclusive, algunas de dichas cepas no son capaces de competir por sus requerimientos nutricionales de mayor demanda, por lo que en muchas ocasiones llegan a ser encubiertos por los miembros de la flora habitual del humano. Aún actualmente, no existen numerosas técnicas económicas y satisfactorias para identificar algunos patógenos importantes, incluyendo a las cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*, por lo que no es fácil discriminar entre éstas y las no patógenas. Adicionalmente, cabe

considerar que las condiciones de selección de los cultivos convencionales pueden conducir a la pérdida de los plásmidos implicados en la producción de las toxinas^{60,67}.

Por tales motivos, en las últimas décadas se continúan añadiendo métodos de diagnóstico que detecten patógenos por ensayos inmunológicos y vía el uso de sondas de ácidos nucleicos^{43,63,64}. Sin embargo, en los ensayos inmunológicos influye la variabilidad de la expresión genética y de la respuesta inmune; además de la posibilidad de que ocurra alguna reactividad cruzada de los sueros anti-específicos.

En numerosos casos, los Ac's dirigidos contra Ag's de superficie permiten una identificación confiable hasta el nivel de género, pero es necesario realizar pruebas bioquímicas a los microorganismos aislados para confirmar su especie.

Por otra parte, cuando la muestra contiene bajas concentraciones de toxinas, otros factores químicos pueden llegar a ocultar su presencia en los ensayos inmunológicos, obteniéndose falsos negativos.

Adicionalmente, existen evidencias de que la producción de enterotoxinas por parte de algunos patógenos, tales como *Staphylococcus aureus*, se puede perder cuando éste se cultiva en los medios sintéticos usados dentro del laboratorio²⁹.

Finalmente, la limitada disponibilidad de reactivos asociados a la serología impide el uso generalizado de esta metodología.

Así las cosas, como las sondas de ácidos nucleicos se relacionan directamente con el material genético, las pruebas basadas en la técnica de *Southern-blot* generalmente son más específicas y confiables que los ensayos inmunológicos^{46,50}. Sin embargo, las técnicas moleculares frecuentemente requieren que la muestra contenga entre 10^5 y 10^6 copias de la secuencia

blanco, para generar una señal positiva fiable⁶. En este sentido, dicho espécimen podría incubarse durante horas a fin de que la reproducción de los microorganismos se tradujera en un número adecuado de secuencias blanco, de esta manera, los ensayos de hibridación tradicionales resultarían exitosos, aunque el tiempo requerido para el diagnóstico se incrementaría notablemente³⁰.

En este contexto, destaca la incuestionable importancia de la PCR en la detección de patógenos microbianos, que incluye ventajas como las que se señalan a continuación:

A) La posibilidad de obtener resultados en corto tiempo, lo que se refleja en beneficio de los pacientes y en una reducción de los costos asociados al personal del laboratorio clínico.

B) La detección de microorganismos cuyos cultivos *in vitro* son difíciles o imposibles.

C) Disponibilidad de los reactivos de PCR, los cuales se almacenan con menor dificultad que los utilizados en los procedimientos serológicos.

D) No requiere de modelos animales.

E) La elección de los iniciadores determina la especificidad del método, lo que contrasta con la frecuente reactividad cruzada de los sueros usados en los inmunoensayos.

F) En general, no se requieren complicados equipos de diagnóstico, lo que aumenta su flexibilidad respecto a la elección del espacio en donde se realiza la PCR, con sólo eliminar los problemas de acarreo y contaminación de las muestras.

G) Los modernos termocicladores automatizados dan lugar a una excelente relación costo/eficiencia.

Adicionalmente, otros avances favorecen indirectamente a la PCR; por ejemplo, el uso de sondas radioactivas en el *Southern-blot*, se ha venido reemplazando en forma gradual por equipos de marcaje no radioactivo, sin que ello afecte la sensibilidad de la técnica, ya que se pueden detectar cantidades de DNA del orden de 50 a 100 ng, utilizando conjugados con biotina-estreptavidina o digoxigenina⁷².

Inclusive, las sondas de DNA para *Southern-blot* podrían resultar innecesarias, debido a que las moléculas generadas por la amplificación son de tamaño uniforme y se encuentran presentes en cantidades adecuadas para ser identificadas por electroforesis en gel de agarosa.

Otro aspecto digno de mención radica en el hecho de que, en la mayoría de los estudios que reportan el uso de la PCR aplicada al diagnóstico de enfermedades bacterianas, las muestras no requirieron de tratamientos especiales: un alto porcentaje de ellas utilizaron la técnica de congelamiento/ebullición para liberar y desnaturalizar los ácidos nucleicos de las bacterias, usando el termociclador para este fin.

En contraste, ocasionalmente la Taq DNA Polimerasa I puede llegar a ser inhibida por compuestos presentes en las muestras, en consecuencia, la extracción y purificación del DNA (previa a la amplificación por PCR) es muy útil en numerosos casos.

Algunas bacterias tales como *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Vibrio vulnificus* pueden entrar en un estado no cultivable (de estrés), aunque estén viables; a este respecto, es preciso subrayar que la PCR sólo depende de la presencia del DNA "blanco" en la muestra (y no de la existencia de células cultivables) para detectar a dichos microorganismos⁵¹.

Evidentemente, el uso simultáneo de más de un par de iniciadores cuidadosamente diseñados, en la mezcla que se somete a amplificación por PCR (variación denominada **PCR Múltiple**) permite la identificación simultánea de varias bacterias en un sólo ensayo^{8,88}. En el citado estudio de Bej y cols, se identificó a *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella sonnei*, *Acinetobacter spp*, *Flavobacterium spp*, *Providencia spp*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas spp*, a partir de una muestra de agua a la que se le determinó su calidad microbiológica.

A continuación se señalan aspectos particulares de la PCR, aplicadas a varios agentes etiológicos de enfermedades bacterianas que afectan al humano, haciendo referencia a las principales características de dichas bacterias, a los métodos convencionales del diagnóstico de las afecciones correspondientes y a las limitaciones de estos últimos.

Bordetella pertussis

El principal agente causal del síndrome tosferina, es un cocobacilo capsulado Gram negativo no invasivo, pero se fija al tracto respiratorio superior causando tos "paroxística" convulsiva, mediante la acción de tres toxinas (el pertusígeno, una exotoxina y una endotoxina) que paralizan los cilios y dañan el tejido traqueo-bronquio-pulmonar, causando severas reacciones de inflamación. Su crecimiento es lento (las colonias aparecen en 48 a 72 h en medio *Bordet-Gengou*) y requiere de medios nutricionalmente complejos para retener sus Ag's de fase 1 (fase infecciosa). Generalmente se le diagnostica mediante inmunofluorescencia, a partir de exudados nasofaríngeos, con Ac's dirigidos contra un lipopolisacárido de su pared celular, denominado Ag bactericida, o bien, por contraínmuno-electroforesis (CIEF).

La tosferina dura entre 15 y 20 días y puede resultar mortal, afecta principalmente a niños menores de 10 años de edad y su diagnóstico serológico no es útil en la fase aguda de la enfermedad³.

En el estudio desarrollado por Bäckman y cols³ se realizó una PCR "en nido", en la cual se amplificó el DNA en un primer paso, con un juego de iniciadores externos a la secuencia "blanco", seguido por la amplificación "anidada" con un par de iniciadores que cubrían la secuencia seleccionada dentro del producto de amplificación primario.

Una de las ventajas de dicho método reside en que el material original se diluye en forma significativa, lo que disminuye a las sustancias inhibitorias. El nivel de detección (sensibilidad) del método es de 10 bacterias/mL de muestra (8 secuencias blanco/10 μ L de muestra); en este sentido, el diagnóstico por amplificación "en nido" condujo a la detección del patógeno en 18 muestras de un total de 196 (9.18%) que habían resultado negativas por cultivo microbiológico; con ello, su sensibilidad fue del 100%, contra el 86% obtenido mediante el método convencional.

Staphylococcus aureus

Es un coco Gram positivo no capsulado cuyos principales Ag's corresponden a los ácidos teicoicos de la pared celular y a la proteína A, la cual interacciona inespecíficamente con la porción Fc de la IgG; se identifica en el laboratorio con base en la detección de la coagulasa, previo aislamiento en medios selectivos tales como el S110 y el manitol-sal-agar (MSA).

Produce dos tipos de enfermedad:

A) La invasiva, provocando abscesos superficiales (forúnculos), que pueden conducir a septicemia y causar lesiones metastásicas tales como la endocarditis, artritis, meningitis, pielonefritis y cistitis.

B) La toxigénica, mediante las exotoxinas A, B, C₁, C₂, D, E, y F, destacando las intoxicaciones alimentarias que cursan con vómito en proyectil y diarrea; por otra parte, la dermonecrotoxina presenta acción exfoliativa, causando el síndrome de la piel escaldada (SEPE), que se manifiesta como una gruesa descamación dérmica.

Adicionalmente, puede producir el síndrome del shock tóxico, el cual está relacionado con el uso de tampones superabsorbentes contaminados con *S. aureus*; la síntesis de las toxinas F y A, que son absorbidas hacia la circulación, llega a causar fiebre, cefalea, diarrea, hipotensión, inconsciencia y trastornos renales, pulmonares y cardíacos.

En un estudio de identificación rápida de bacterias por PCR-SSCP, diseñado por Widjoatmodjo⁸⁹, se emplearon iniciadores específicos para amplificar una región conservada del genoma, común a todos los procariotes, perteneciente a la secuencia 16S rRNA; dicho gen también contiene secuencias variables que permiten la discriminación entre los diferentes géneros y especies bacterianos.

Mediante tal técnica se logró obtener el patrón específico de amplificación de *S. aureus* en menos de 20 h (2.5 h para la PCR y 15 h para el SSCP, más 1.5 h para la tinción con sales de plata). Por tal motivo, los investigadores recomiendan su uso para el análisis de muestras de sangre y de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con meningitis.

Streptococcus pyogenes

Se trata de un coco Gram positivo que posee una pared celular constituida por 3 capas, de las cuales la intermedia es un carbohidrato denominado "C" y cuya composición es específica del grupo; este microorganismo es β -hemolítico y frecuentemente se asocia a padecimientos de las vías aéreas superiores, tales como la faringitis y la amigdalitis.

Se le clasifica mediante pruebas microbiológicas y/o serológicas, con base en el carbohidrato "C" (según Rebeca Lancefield). Su principal factor de virulencia es la proteína M, que impide la fagocitosis y promueve la agregación de plaquetas y leucocitos.

Entre sus toxinas extracelulares se encuentran las estreptolisinas O (cardiotóxica) y S (necrosante); *S. pyogenes* ocasiona reacciones autoinmunes tales como la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda o la artritis crónica. Además, elabora la toxina eritrogénica, causante de la fiebre, erupción y shock asociados a la escarlatina y la erisipela.

Las enfermedades ocasionadas por esta especie se diagnostican eventualmente en el laboratorio mediante las técnicas de inmunofluorescencia o titulación de antiestreptolisina O y, aunque es una bacteria muy delicada y exigente se puede cultivar en agar sangre de carnero y se le puede identificar fácilmente con la prueba de la bacitracina (0.02 U).

John Welsh y Michael McClelland del Instituto de Investigaciones Biológicas de California⁸⁸ lograron obtener la "huella digital" del DNA de *S. pyogenes*, mediante una amplificación por PCR al azar, es decir, utilizando un par de iniciadores arbitrarios y condiciones de baja estringencia. Con este método fue posible distinguir 11 cepas bacterianas distintas,

requiriendo un mínimo de aplicaciones de la bioquímica o biología molecular asociadas a la especie.

Streptococcus pneumoniae

Es una bacteria lanceolada, α -hemolítica, que se agrupa en pares; produce hemólisis parcial (verdosa) en gelosa sangre, por acción de una neumolisina, y es sensible a 5 U de optoquina. Su pared celular es susceptible a la acción de una enzima autolítica que se activa en presencia de sales biliares.

El neumococo es uno de los principales causantes de neumonía en adultos, puede llegar a presentar reacción cruzada con otros géneros y se tipifica mediante reacción de *quellung*.

Se identifica con base en su sensibilidad a la optoquina y su solubilidad en sales biliares, empero, en el caso de meningitis, el diagnóstico se realiza por CIEF, utilizando como muestra LCR.

Según el reporte de Hassan-King³², el hemocultivo realizado a un grupo de pacientes con neumonía causada por *S. pneumoniae* resultó positivo sólo en un 30% de los casos, debido posiblemente a que los pacientes no estaban bacterémicos al momento del muestreo, o bien, se encontraban bajo terapia con antibióticos.

En dicho estudio se amplificó el gen que codifica para la autolisina y se analizaron 12 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*, obteniéndose un límite de sensibilidad de 0.05 pg, el cual se determinó mediante diluciones seriadas del extracto de DNA. Lo anterior contrasta en comparación con las 3 unidades formadoras de colonias (UFC), obtenidas por diluciones seriadas de la muestra y el subsecuente cultivo en placas de agar sangre. Adicionalmente, mediante PCR resultaron positivas 4 de 9 muestras que fueron negativas vía su cultivo.

Listeria monocytogenes

Es un bacilo Gram positivo con flagelación peritrica que causa septicemia con manifestaciones clínicas variables, pero también afecta al hígado, bazo y sistema nervioso central (SNC) y produce inflamaciones purulentas en membranas mucosas, hinchazón glandular y monocitosis.

Afecta principalmente a recién nacidos y lactantes; puede inclusive ocasionar abortos en mujeres embarazadas. Se diagnostica mediante cultivo y examen microscópico de extendidos (frotis).

A menudo no se detecta o se le clasifica erróneamente (obteniéndose resultados falsos positivos y negativos), puesto que las reacciones de aglutinación entre los Ac's séricos de los pacientes y los Ag's somáticos y flagelares presentan reacciones cruzadas con Ag's enterocóccicos y estafilocóccicos. Este microorganismo se ha identificado con éxito mediante análisis por PCR-SSCP, distinguiéndose los patrones de amplificación de 7 cepas diferentes⁸⁹.

Neisseria meningitidis

Son cocos Gram negativos que se disponen en pares y presentan sus lados adyacentes aplanados, por lo que morfológicamente semejan riñones. Son capsulados y aerobios; requieren de nutrientes complejos (como los contenidos en el medio Thayer Martin modificado) y su crecimiento se inhibe por los ácidos grasos libres y diversos metales incluidos como contaminantes en diversas peptonas o en el agar comercial.

Este microorganismo se identifica poniendo de manifiesto sus polisacáridos capsulares o mediante pruebas bioquímicas

(citocromo oxidasa y oxidación de carbohidratos), apoyándose en frotis teñidos, cultivos de 48 h obtenidos a 35°C en atmósfera de 5 a 10% de CO₂ o mediante CIEF empleándose Ac's anticapsulares.

De inicio produce faringoamigdalitis, la cual posteriormente puede evolucionar a meningococcemia y, finalmente, a meningitis. En los países sajones figura entre los 3 principales agentes causales de meningitis infantil (en niños de 3 meses a 2 años de edad), que cursa con fiebre elevada, cefalea, vómito y rigidez de nuca.

De acuerdo con un estudio efectuado en el Departamento de Microbiología Aplicada de la Universidad Lund, en Suecia⁶⁸, se realizó la detección simultánea de *N. meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, mediante PCR "en nido", a partir de una muestra patológica de LCR. En este sentido, cabe recordar que la meningitis bacteriana aguda se diagnostica rutinariamente mediante microscopía directa y cultivos en medios específicos (lo que requiere de 48 a 72 h), con un alto índice de falsos negativos, debido a los antibióticos que suelen administrarse antes de la recolección de la muestra.

El diagnóstico por PCR demostró una sensibilidad del 98% (detectándose al meningococo en 130 de 133 casos totales) y una especificidad del 96% sin ocurrencia de resultados falsos positivos. Los investigadores refieren que los falsos negativos se debieron probablemente a muy bajas concentraciones de la bacteria en la muestra.

Enterobacterias

La familia Enterobacteriaceae se integra principalmente por los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* y *Providencia*. Son bacilos Gram negativos morfológicamente indistinguibles entre sí, que se

diferencian macroscópicamente mediante el uso de medios diferenciales (ENDO, EMB, SS, XLD, VB, McConkey, Hecktoen y Tergitol 7) y se identifican vía pruebas bioquímicas.

Su pared celular es rica en lipopolisacáridos (LPS), los cuales poseen algunas de las propiedades tóxicas y biológicas de estos microorganismos; los Ag's O (LPS), K (polisacáridos capsulares) y H (flagelares) son fundamentales para su serotipificación. La mayoría de estos bacilos son patógenos oportunistas que causan, entre otras enfermedades, septicemia e infecciones urinarias. Aunque no son exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales y desarrollan en medios sencillos, su identificación suele requerir un lapso mínimo de 48 h.

En ese sentido, Bej⁷ reportó un método de detección de coliformes en agua, mediante la amplificación por PCR y la posterior identificación con sondas gen-específicas; el investigador justifica la aplicación de dicha metodología con base en algunos problemas de la técnica convencional, entre los cuales destacan la dificultad para mantener la viabilidad de las bacterias durante la recolección y la presencia de microorganismos viables que en ocasiones no crecen *in vitro*. Mediante la PCR se ha logrado detectar entre 1 a 10 fg de DNA genómico de *E. coli* (lo cual representa entre 1 y 5 bacterias/100 mL de H₂O).

Por lo que respecta al tiempo, en un estudio posterior realizado por el mismo autor⁸ se comprobó el contraste entre las 48 a 72 h que requiere el análisis convencional con filtración en membrana y cultivo en tubos de fermentación, contra las 6 h que resultan suficientes mediante PCR, empleándose sondas no-radioactivas.

Escherichia coli

Es el principal agente etiológico de infecciones urinarias, septicemia, meningitis y neumonía, e inclusive, figura entre los

más frecuentes causantes de diarrea en infantes. Por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénica (ECET) produce dos tipos de toxinas: la termo estable (ST) y la termo lábil (LT); ésta actúa estimulando la adenilatociclasa en las células epiteliales del intestino.

La identificación de ECET es compleja y se realiza mediante inmunoensayos y bioensayos que generalmente sólo se practican en laboratorios de investigación. Entre estos últimos ensayos se encuentran el análisis de la influencia de la toxina sobre la morfología de células suprarrenales o del ovario de hámster, o bien, la observación de la acumulación de líquido de ascitis, posterior a la inyección intraperitoneal de la muestra en ratones recién nacidos.

Por su parte, la ECEI y ECEH se diferencian principalmente de acuerdo con los serotipos que abarcan cada una.

Existen numerosos estudios relacionados con la detección por PCR de cepas de *E. coli* productoras de diarrea^{49,61,77}, en los cuales se han amplificado directamente los genes que codifican para la síntesis de toxinas u otras proteínas, obteniéndose una sensibilidad de hasta 10^2 UFC/g de heces; es decir, no se requiere del previo aislamiento de las bacterias ni la purificación del DNA.

Salmonella typhi

Causante de gastroenteritis y, principalmente, de fiebre tifoidea; este es un microorganismo invasivo que penetra a través de la mucosa del intestino delgado, se multiplica en los ganglios locales y se disemina por vía sanguínea, estableciéndose en bazo, hígado y vesícula biliar.

S. typhi se clasifica inmunológicamente con base en sus Ag's H, O y Vi y se clasifica en el laboratorio mediante pruebas bioquímicas.

El hemocultivo dista de ser el recurso más sensible y eficaz, ya que tan sólo detecta entre el 45 y 70% de los casos y requiere hasta de 72 h.

Si bien el uso de sondas de DNA mejoró la capacidad de detección de *S. typhi*, esta técnica necesita de un mínimo de 500 bacterias en la muestra, cuando los pacientes con fiebre tifoidea usualmente contienen menos de 15 bacterias/mL de sangre⁸³. Este problema se resolvió mediante la amplificación por PCR de la secuencia que codifica para la síntesis de flagelina⁷⁹, ya que se alcanzó una sensibilidad del orden de 40 fg de DNA de *S. typhi* (correspondiente a 10 bacterias).

Shigella dysenteriae

Es una de las especies causantes de la disentería bacteriana, la cual provoca al invadir la mucosa del íleon terminal y el colon, originando ulceraciones que dan lugar a que las evacuaciones contengan moco y sangre.

Shigella se identifica por pruebas bioquímicas y aglutinación con suero anti O; cabe subrayar que es muy delicado y pierde fácilmente su viabilidad en las muestras de materia fecal.

Matthew P. Jackson³⁵ reportó la detección de *S. dysenteriae* Tipo 1, productor de toxina *Shiga*, mediante PCR, con incorporación de DIG-11dUTP, utilizando como revelador un Ac anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina; esta metodología resulta más adecuada para los laboratorios clínicos.

Vibrio cholerae

Son bacterias curvas o en forma de coma, Gram negativas, con singular movilidad gracias a un largo flagelo polar ondulante; poseen Ag's flagelares proteicos termolábiles (H) y somáticos (O) constituidos por polisacáridos termoestables.

Este microorganismo atraviesa la barrera gástrica y llega al intestino delgado, en donde se fija a la mucosa y libera la enterotoxina (denominada colerágeno) que estimula a la adenilato ciclasa, provocando la eliminación de líquido isotónico (diarrea de aspecto similar al agua de arroz) que puede conducir a un shock hipovolémico.

El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante un previo enriquecimiento en caldo peptonado alcalino, seguido por el cultivo en medios selectivos (TCBS o GTT), pruebas bioquímicas y serología. Actualmente, se puede realizar el diagnóstico por PCR mediante la amplificación del gen que codifica para la síntesis del colerágeno^{26,78}.

Pseudomonas aeruginosa

Son bacilos Gram negativos productores de dos pigmentos característicos, la piocianina y la fluoresceína, que confieren un color verde a la colonia; es β -hemolítico y sus colonias suelen desprender un olor particular.

Se asocia, entre otras afecciones a infecciones intrahospitalarias, sepsis post-quemaduras, ulceraciones de la córnea (por acción de proteasas) e infecciones de meninges y pulmones¹⁸; el diagnóstico correspondiente se realiza por cultivo y pruebas bioquímicas.

En un estudio desarrollado por Khan⁴¹ se amplificó por PCR el gen que codifica para la síntesis de la exotoxina A, lográndose una especificidad y sensibilidad del 100 y 96%, respectivamente, en la detección del microorganismo en las muestras clínicas.

Dicho ensayo fue capaz de evidenciar la presencia de entre 5 a 10 bacterias/mL de muestra (0.1 pg de DNA de *P. aeruginosa* en 5 µL de la mezcla de reacción), revelándose al material amplificado por una simple electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (en tan sólo 6 h).

Haemophilus influenzae

Son cocobacilos Gram negativos que en ocasiones semejan diplococos y en condiciones desfavorables se alargan, apareciendo filamentosos. Presentan cápsulas de polisacáridos, las cuales se pierden y pasan al medio líquido del cultivo después de 24 h. Su crecimiento requiere de los factores X y V, presentes en la sangre, los cuales utiliza para la biosíntesis de citocromos respiratorios y en otros procesos de óxido-reducción.

El factor X se obtiene al calentar la sangre (obteniéndose el medio gelosa chocolate), mientras que el factor V (NAD⁺) se agrega purificado o se provoca que lo aporte la especie *S. aureus*, dando lugar al fenómeno de satelitismo.

H. influenzae es el principal agente causal de la meningitis en niños entre los 3 meses y 2 años y se asocia a cuadros de septicemia y epiglotitis. Al parecer, este microorganismo es extremadamente lábil y con facilidad pierde su viabilidad en las muestras clínicas.

Se le identifica (previo aislamiento) por pruebas bioquímicas o biológicas, demostrando su dependencia de los factores X y V, o

por reacción de *Quellung* o CIEF con suero anti-capsular específico.

De acuerdo con un estudio efectuado por Radström et al⁶⁸, se realizó la detección simultánea de *N. meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, mediante PCR "en nido", a partir de una muestra patológica de LCR. El diagnóstico por PCR demostró una sensibilidad del 98% y una especificidad del 96%, sin ocurrencia de resultados falsos positivos. Los investigadores refieren que los falsos negativos se debieron probablemente a muy bajas concentraciones de la bacteria en la muestra.

Mycobacterium tuberculosis

Es un microorganismo delgado, pleomórfico, de pared celular gruesa, rica en lípidos (como el ácido micólico) y ácido-alcohol resistente, que crece con lentitud en medios tales como el *Lowenstein-Jensen*, llegando a requerir incubaciones de hasta 8 semanas a 37°C, debido a que su tiempo de generación es de 20 a 24 h.

Aún cuando son fácilmente fagocitados por macrófagos, se multiplican intracelularmente gracias a la acción del factor "cordón", que es leucotóxico; *M. tuberculosis* sobrevive a la respuesta inmune en los lugares con alta presión parcial de oxígeno (como en el pulmón) y donde permanece en forma latente sin manifestar síntomas en el paciente, excepto por la seroconversión a tuberculina positiva.

Cuando el proceso infeccioso progresa a tuberculosis, un estudio radiológico revela sitios de calcificación en el área apical y subapical de los pulmones que se conjuntan a la expectoración de líquido caseoso, fiebre moderada, hemóptisis, astenia y malestar general.

La tuberculosis frecuentemente se diagnostica por baciloscopia del esputo, cultivo y pruebas bioquímicas; la serotipificación no diferencia las diferentes cepas del complejo de *M. tuberculosis*, según lo refiere Linton⁴⁸.

Esta falta de marcadores específicos para las diferentes cepas de *M. tuberculosis* ha dificultado los estudios epidemiológicos asociados a la tuberculosis; por tal razón, Linton diseñó un método de amplificación al azar, con un subsecuente análisis del polimorfismo del DNA amplificado (RAPD, por sus siglas en inglés).

De esta manera, el autor diferenció con éxito 14 cepas distintas en aproximadamente 8 h; no obstante, la principal ventaja del método de RAPD reside en que no requiere del conocimiento genético previo del microorganismo "blanco".

Borrelia burgdorferi

Es el agente causal de la enfermedad de Lyme, se transmite principalmente por un vector artrópodo: la garrapata *Ixodes scapularis* y su clasificación es imprecisa, debido en parte a que no se ha logrado cultivar consistentemente *in vitro*.

Se trata de microorganismos helicoidales puntiagudos (espiroquetas), que se evidencian previa tinción de Giemsa; fue reconocida por primera vez en la ciudad de Lyme, Conn. U.S.A, siendo identificada hasta 1982 por Willy Burgdorfer y, desde entonces, se le ha encontrado en diversas partes del mundo. La enfermedad inicia con la aparición de un eritema pronunciado en el sitio de la mordida de la garrapata (denominado *eritema migrans*), que no genera prurito ni dolor, pero se expande gradualmente, semejando una diana o blanco de tiro.

Dicha lesión desaparece en el transcurso de algunas semanas quedando en su lugar algunos síntomas similares a los del catarro común: escalofríos, fiebre, fatiga, dolor en músculos y articulaciones, y pérdida del apetito.

No obstante, las espiroquetas se diseminan por vía hematógena y pueden ocasionar daños neurológicos, tales como parálisis facial parcial, meningitis, encefalitis, sueño y pérdida de la memoria. Adicionalmente, el microorganismo causa problemas cardíacos, destacando un bloqueo atrio-ventricular que se refleja como una arritmia. Estos síntomas disminuyen, sin embargo, en pacientes sin ningún tratamiento, después de 6 meses aproximadamente, se manifiesta una artritis franca de las articulaciones, con inflamación en una de las rodillas (asimétrica) a diferencia de la artritis normal que generalmente afecta ambas articulaciones.

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme es muy difícil, dado que muchos pacientes no muestran el rash característico y debido a que los síntomas iniciales semejantes al catarro pueden tener otros orígenes.

El inmunodiagnóstico vía la detección de Ac's específicos por la técnica de ELISA sólo resulta evidente varios meses después del inicio del cuadro, por lo que el reconocimiento lo realiza el médico, con base en el cuadro clínico.

Recientemente, se estableció un método diagnóstico a partir de muestras de orina, realizándose la amplificación por PCR en nido del gen que codifica para la flagelina (*fla*)³⁸. De esta manera se detectó la presencia del microorganismo, tanto en portadores asintomáticos como en enfermos.

Mycoplasma pneumoniae

Son los organismos de vida libre más pequeños que se conocen (aún más pequeños que algunos virus), carecen de pared celular, son esféricos, aunque poseen una estructura terminal filiforme y son patógenos de las vías respiratorias del humano.

Además, presentan algunos glucolípidos inmunogénicos que fijan complemento y dan lugar a reacciones cruzadas con Ag's del tejido cerebral humano.

Los micoplasmas se multiplican a menor velocidad que otras bacterias, pues su tiempo medio de generación es de 6 a 9 h; una teoría establece que estos microorganismos se fijan a los receptores del ácido neuramínico, presentes en la superficie de las mucosas de tráquea y bronquios, a las cuales después daña por medio de un factor tóxico que activa el complemento.

M. pneumoniae causa neumonía, traqueobronquitis, bronquiolitis y otros padecimientos menos severos, afectando principalmente a niños de 4 a 12 años. Generalmente, su diagnóstico se realiza mediante pruebas serológicas, pues su cultivo llega a requerir de 4 a 21 días; no obstante, las pruebas inmunológicas son positivas en tan sólo el 80% de los casos.

Recientemente se ha identificado a una proteína denominada P1, que funge como adhesina y en un estudio realizado por Ursi⁸⁴ se logró evidenciar la presencia del microorganismo en muestras de aspirados nasofaríngeos provenientes de pacientes pediátricos, precisamente mediante la amplificación del gen que codifica para la síntesis de P1 y su detección por electroforesis en gel de agarosa con EthBr.

Chlamydia trachomatis

Las clamidias poseen una envoltura celular semejante a la pared celular de las bacterias Gram negativas y son susceptibles a la tetraciclina y la eritromicina; sin embargo, exhiben algunas características excepcionales, tales como la de ser parásitos energéticos, debido a que no producen ATP (emplean el ATP de la célula hospedadora) y la de presentar un ciclo vital con dos diferentes formas celulares: (A) el cuerpo elemental o CE, correspondiente a una bacteria esférica (de hasta 0.4 μm de diámetro), que actúa como forma infectante mediante una adhesina que promueve su fagocitosis no profesional, por parte de las células del hospedador y (B) el cuerpo reticular o CR (de hasta 1 μm de diámetro), que representa la forma metabólicamente activa (capaz de reproducirse por fisión binaria) y se localiza en el interior de la célula hospedadora; después de 22 h, los CR se convierten en CE, los cuales se liberan al destruirse la célula que los alberga, en aproximadamente 48 h.

C. trachomatis posee dos variedades de importancia clínica para el humano: La variedad LGV, responsable del linfogranuloma venéreo y la variedad TRIC (de mayor importancia en salud pública); en cuanto a esta última, los serotipos A, B, Ba y C ocasionan conjuntivitis por inclusión, cervicitis y uretritis no gonocócica, entre otros padecimientos; mientras que los serotipos de la D a la K producen el tracoma (padecimiento considerado como la principal causa de ceguera previsible en el mundo), que cursa con lagrimeo, fotofobia, sensación de cuerpo extraño y secreción purulenta, hasta la etapa crónica, en la que ocurren la deformidad del párpado, neovascularización, *pannus* y ceguera⁹³.

El diagnóstico tradicional de la clamidiasis se realiza principalmente mediante el cultivo de muestras de exudados en líneas celulares, tales como la McCoy (fibroblastos de ratón) o la HeLa 229 (células cancerígenas de cérvix humano), incubadas por

48 h (para los casos de cervicitis, faringitis, proctitis, tracoma y conjuntivitis por inclusión); los exudados se recolectan mediante hisopos de dacrón o algodón, con aplicadores de plástico (debido a que los aplicadores de madera y los hisopos de alginato son tóxicos para *Chlamydia*)⁹³.

Dentro de los métodos empleados con mayor frecuencia para lograr la detección de *C. trachomatis* se encuentran las técnicas de tinción (para observar las inclusiones intracitoplásmicas) empleando lugol o Giemsa y la detección directa de Ag's clamidiales, destacando la inmunofluorescencia directa y los ensayos inmunoenzimáticos⁴³; cabe señalar que los CE de *C. trachomatis* constituyen la forma que se detecta mediante las técnicas inmunocitoquímicas⁹³.

En un estudio desarrollado por Claas¹⁶ se evaluó la importancia diagnóstica de la PCR en la detección de *C. trachomatis*, comparándola con la técnica de cultivo. Para ello, utilizaron muestras de exudado genital, a partir de las cuales se extrajo el DNA mediante fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y la subsecuente precipitación en etanol. Posteriormente, se realizó la amplificación por PCR, empleándose dos pares diferentes de iniciadores: uno de ellos amplificó la región género-específica del 16S rRNA y, el otro, amplificó un plásmido endógeno característico de la especie. De esta forma, la PCR mostró una especificidad del 100% y una sensibilidad del 108%; además, la PCR resolvió un falso-negativo obtenido por el método de cultivo, mismo que se debió a que la terapia con antimicrobianos había iniciado antes de la recolección de la muestra.

Por su parte, Domeika²¹ comparó la técnica de ELISA con la PCR, analizando muestras de sedimento urinario (correspondientes a la primera orina de la mañana) de 184 pacientes masculinos; para ello, amplificó el gen que codifica para la síntesis de una de las principales proteínas de la envoltura

externa de *C. trachomatis*, obteniendo los resultados señalados en la tabla 7.

Tabla 7. Comparación de la PCR con la prueba de ELISA en el diagnóstico de la clamidiasis

	ELISA	PCR
Sensibilidad	85.3 %	100 %
Especificidad	100 %	100 %
Valor predictivo positivo	100 %	100 %
Valor predictivo negativo	77.5 %	100 %

De esta forma, los investigadores concluyeron que la PCR representa un método diagnóstico altamente sensible y específico para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

NOTA:

La información acerca de los iniciadores utilizados para el reconocimiento de los microorganismos antes señalados, así como el gen amplificado en cada caso, las condiciones de reacción y la metodología involucrada se cita en las tablas siguientes.

Tabla 8. Bacterias patógenas para el hombre: Secuencias de iniciadores para PCR, DNA blanco, tamaño del producto amplificado y método de detección

Bacteria	Iniciadores	DNA "blanco"	Tamaño del producto amplificado (bp)	Análisis del producto amplificado	# Ref. bibliográfica
<i>Bordetella pertussis</i>	1: 5'-GAC TTC GTC TTC GTG GCC AT-3' 2: 5'-GTA CAG CGC GCC CGA TGC CT-3' 3: 5'-CGC GTG GCC TTC ACC GAC AT-3' 4: 5'-GGG CGG TAA GGT CGG GTA AA-3'	IS480	205 por PCR "en nido"	RFLP con endonucleasa <i>MvaI</i> en gel de agarosa al 3%	3
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1: 5'-CGT CTG TCT CCA AGA TAT GTT-3' 2: 5'-CAA CCT CGT TGG GTT CTA CTT-3'	gen de flagelina (fla)	240	Secuenciación de DNA	38
<i>Borrelia burgdorferi</i>	OspA2: 5'-GTT TTG TAA TTT CAA CTG CTG ACC-3' OspA4: 5'-CTG CAG CTT GGA ATT CAG GCA CTT-3'	gen de proteína superficial I (ospA)	156	Electroforesis en gel de agarosa con EthBr y confirmación por <i>Southern Blot</i> 32P-Osp3	66
<i>Clostridium difficile</i>	1: 5'-TAA TAG AAA ACA GTT AGA AA-3' 2: 5'-TCC AAT CCA AAC AAA ATG TA-3'	gen de la toxina B	301	Ensayo inmunomagnético (MIPA)	90
<i>Escherichia coli enterotoxigénica (ECET)</i>	1: 5'-TTA CGG CGT TAC TAT CCT CTC TA-3' 2: 5'-GGT CTC GGT CAG ATA TGT GAT TC-3'	gen LT1	275	Electroforesis en gel de agarosa y <i>Southern Blot</i>	28

Bacteria	Iniciadores	DNA "blanco"	Tamaño del producto amplificado (bp)	Análisis del producto amplificado	# Ref. bibliográfica
<i>Clostridium</i> spp <i>Listeria</i> spp <i>Pseudomonas</i> spp <i>Enterobacter</i> spp	P13P: 5'-AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC-3' P11P: 5'-GAG GAA GGT GGG GAT GAC GT-3' ER10: 5'-GGC GGA CGG GTG AGT AA-3' ER11: 5'-ACT GCT GCC TCC CGT AG-3'	gen 16S rRNA en regiones V1 y V2	216 255	SSCP en gel de poliacrilamida teñido con sales de Plata.	89
<i>Escherichia coli</i>	ZL1675: 5'-ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC-3' ZR2548: 5'-CAC CAT GCC GTG GGT TTC AAT ATT-3' BL4899: 5'-GGA TAT TTC TGG TCC TGG TGC CGG-3' BR5452: 5'-ACT TGG TGC CGT TGT CGT TAT CCC-3'	lacZ lamB	876 554	Electroforesis en gel de agarosa -EthBr al 1% y <i>Southern Blot</i> con sondas ³² P-LZ-1 y ³² P-LB-1	7
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH).	1: 5'-GAC AGG ATT TGT TAA CAG G-3' 2: 5'-TTC CAG TTA CAC AAT CAG GC-3'	gen de toxina <i>Shiga-like</i> (slt-IA)	680	Inmunodetección de producto marcado por incorporación de DIG-11-dUTP en <i>Southern Blot</i>	35

Bacteria	Iniciadores	DNA "blanco"	Tamaño del producto amplificado (bp)	Análisis del producto amplificado	# Ref. bibliográfica
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	LT-A1: 5'-GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC-3' LT-A2: 5'-CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC-3'	gen de toxina termolábil (LT-A) y termoestable (ST)	696	<i>Southern Blot</i> con sondas marcadas con digoxigenina (DIG) y radioactivas con ³² P	77
	ST1a-1: 5'-TCT GTA TTA TCT TTC CCC TC-3' ST1a-2: 5'-ATA ACA TCC AGC ACA GGC-3'		186		
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	LTL: 5'-AGA GAT ACA CGT ATG CCT CG-3' LTR: 5'-AAC GCC GTT AGT CAT ACC-3'	gen de toxina termolábil (LT)	322	Electroforesis en gel de agarosa al 3% con EthBr y confirmación por <i>Southern</i> con sonda conjugada a fosfatasa alcalina.	61
<i>Helicobacter pylori</i>	HPU1: 5'-GCC AAT GGT AAA TTA GTT-3' HPU2: 5'-CTC CTT AAT TGT TTT TAC-3'	Gen ureasa A	411	Electroforesis agarosa al 1.5% y <i>Southern</i> para detectar iniciador ³² P-5'-HPU1, confirmando por sitios de restricción con <i>Hinf</i> I y <i>Alu</i> I amplificados.	17

Bacteria	Iniciadores	DNA "blanco"	Tamaño del producto amplificado (bp)	Análisis del producto amplificado	# Ref. bibliográfica
<i>Helicobacter pylori</i>	3: 5'-TGG CGT GTC TAT TGA CAG CGA GC-3' 4: 5'-CCT GCT GGG CAT ACT TCA CCA TG-3'	Gen proteína antigénica específica	298	Electroforesis en gel de agarosa 3%-EthBr	31
<i>Helicobacter pylori</i>	JW21: 5'-GCG ACC TGC TGG AAC ATT AC-3' JW22: 5'-CGT TAG CTG CAT TAC TGG AGA-3'	gen 16S rRNA	119	Comparación entre un <i>Western Blot</i> , un ensayo inmunoenzimático (EIA) y PCR- <i>Southern Blot</i> con sonda radioactiva ³² P	87
<i>Legionella pneumophila</i>	1: 5'-GGC CAA TAG GTC CGC CAA CG-3' 2: 5'-GGT GAC TGC GGC TGT TAT GG-3'	gen (mip)	630	<i>Southern</i> con sonda conjugada a biotina y revelado con sistema estreptavidina-fosfatasa alcalina con substrato cromógeno BCIP	47

Bacteria	Iniciadores	DNA "blanco"	Tamaño del producto amplificado (bp)	Análisis del producto amplificado	# Ref. biblio gráfica
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lis-1: 5'-GCA TCT GCA TTC AAT AAA GA-3' Lis-2: 5'-TGT CAC TGC ATC TCC GTG GT-3'	gen de Listerio-lisina O (hlyA)	174	Electroforesis en gel de agarosa con EthBr	20
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Bateria de 40 iniciadores diferentes de 10 a 20 nucleótidos de longitud. Selección de 4 iniciadores que generan patrones de bandeo discriminatorios: IS986-FP, IS986-RP, INS-2 y MTBC-RP	¿?	¿?	Análisis por RAPD: <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Iniciadores arbitrarios) en gel de agarosa al 2%	48
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Iniciador seleccionado en base a la secuencia conocida del gen P1: OJPU4: 5'-GGC CAT GAC CGC GAA CTA TCC G-3'	gen de adhesina o factor de virulencia (P1)	¿?	" <i>PCR-Fingerprinting</i> " por electroforesis en gel de agarosa al 1% con EthBr	84
<i>Neisseria meningitidis</i>	NM: 5'-TGT TGG GCA ACC TGA TTG-3' ru8: 5'-AAG GAG GTG ATC CAA CCG CAG GTT C-3'	gen 16S rRNA	700	Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% con EthBr.	68

Bacteria	Iniciadores	DNA "blanco"	Tamaño del producto amplificado (bp)	Análisis del producto amplificado	# Ref bibliográfica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ETA1: 5'-GAC AAC GCC CTC AGC ATC ACC AGC-3' ETA2: 5'-CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGC GCT-3'	gen de exotoxina A (ETA)	396	RFLP con endonucleasa <i>PvuI</i> en gel de agarosa-EthBr y sonda marcada con DIG por <i>Southern</i>	41
<i>Salmonella typhi</i>	ST1: 5'-ACT GCT AAA ACC ACT ACT-3' ST2: 5'-TTA ACG CAG TAA AGA GAG-3' ST3: 5'-AGA TGG TAC TGG CGT TGC TC-3' ST4: 5'-TGG AGA CTT CGG TCG CGT AG-3'	gen de flagelina	458 343	PCR en nido, electroforesis en agarosa y <i>Southern Blot</i> con sonda radioactiva ³² P	79
<i>Shigella dysenteriae</i> Tipo 1	1: 5'-GAC AGG ATT TGT TAA CAG G-3' 2: 5'-TTC CAG TTA CAC AAT CAG GC-3'	gen de toxina <i>Shiga</i> (<i>stxA</i>)	680	Inmudetección de producto marcado por incorporación de DIG-11-dUTP en <i>Southern Blot</i>	35
<i>Shigella spp</i>	Shig-1: 5'-TGG AAA AAC TCA GTG CCT CT-3' Shig-2: 5'-CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT-3'	plásmido de antígeno invasivo H (<i>ipaH</i>)	422	Electroforesis en gel de agarosa al 3% con EthBr.	49

Bacteria	Iniciadores	DNA "blanco"	Tamaño del producto amplificado (bp)	Análisis del producto amplificado	# Ref. bibliográfica
<i>Staphylococcus aureus</i>	SEA-1: 5'-TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA-3' SEA-2: 5'-GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA-3'	gen de enterotoxina A (sea)	120	Electroforesis en gel de agarosa con EthBr	37
<i>Staphylococcus spp</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Iniciadores arbitrarios: Kpn-R: 5'-CCA AGT CGA CAT GGC ACT TGT ATA CAT ATG TAA C-3' pBS: 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA-3'	¿?	¿?	"PCR-Fingerprinting" por electroforesis en gel de agarosa al 1% con EthBr	88
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SP1: 5'-ATG GAA ATT AAT GTG AGT A-3' SP2: 5'-AGG TCT CAG CAT TCC A	gen de autolisina lyt	247	Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% EthBr y confirmación por Southern con sonda γ - ³² P-5-SP3	32
<i>Streptococcus spp</i>	STREP: 5'-GTA CAA CGA GTC GCA AGC-3' ru8: 5'-AAG GAG GTG ATC CAA CCG CAG GTT C-3'	gen 16S rRNA	300	Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% con EthBr.	68
<i>Vibrio cholerae 01</i>	1: 5'-CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG-3' 2: 5'-TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG-3'	gen de toxina colérica (ctx)	302	Electroforesis en gel de agarosa y Southern Blot	78

Bacteria	Iniciadores	DNA "blanco"	Tamaño del producto amplificado (bp)	Análisis del producto amplificado	# Ref. bibliográfica
<i>Vibrio cholerae</i> 01	CTX2: 5'-CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G-3' CTX3: 5'-CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC-3'	subunidad de toxina colérica A (ctxA)	564	Electroforesis en gel de agarosa con EthBr	26
<i>Chlamydia trachomatis</i>	R1: 5'-GTG GAT AGT CTC AAC CCT AT-3' R2: 5'-TAT CTG TCC TTG CGG AAA AC-3'	16S rRNA	208	Electroforesis en gel de agarosa al 2% e identificación por Southern-blot	16

Tabla 9. Parámetros de PCR para amplificar secuencias únicas de DNA para la detección de bacterias patógenas

Bacteria	Iniciadores	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos totales	# Ref. bibliográfica
<i>Bordetella pertussis</i>	1 y 2 3 y 4	2 min 94°C idem	2 min 50°C idem	2.5 min 72°C idem	20 30	3
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1 y 2	15s 96°C	15s 52°C	4min 60°C	25	38
<i>Borrelia burgdorferi</i>	OspA2 y OspA4	2 min 94°C	1 min 61°C	1 min 72°C	25	66

Bacteria	Iniciadores	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos totales	# Ref. bibliográfica
<i>Clostridium difficile</i>	1 y 2	5 min 95°C y ciclos 1 min 94°C	1 min 50°C	1 min 72°C	35 a 40	90
<i>Clostridium spp</i> <i>Listeria spp</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Enterobacter spp</i>	P13P y P11P ER10 y ER11	1 min 94°C idem	1 min 55°C idem	10s 72°C idem	30 idem	89
<i>Escherichia coli</i>	ZL1675 y ZR2548 BL4899 y BR5452	0.5-1 min 94°C idem	0.5-1 min 40°C 0.5-1 min 50°C	1-2 min 72°C idem	25 a 40 idem	7
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	1 y 2	10 min 95°C para lisar y ciclos de 1 min 94°C	2 min 55°C	2 min 72°C	30	35
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	LT-A1 y LT-A2 ST1a-1 y ST1a-2	1 min 95°C idem	1 min 43°C idem	2 min 72°C idem	35 idem	77
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	LTL y LTR	10 min 95°C y ciclos 1.5 min 93°C	1.5 min 55°C	2 min 72°C	30	61
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	LT1 y LT2	1 min 94°C	1 min 55°C	1 min 72°C	35	28

Bacteria	Iniciadores	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos totales	# Ref. bibliografica
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI y ru8	6 min 94°C y ciclos 1 min 94°C	1 min 55°C	2 min 72°C	25	68
<i>Helicobacter pylori</i>	HPU1 y HPU2	5 min 95°C y ciclos por 1.0 min 94°C	1 min 45°C	1 min 72°C	35	17
<i>Helicobacter pylori</i>	3 y 4	10 min 98°C y ciclos de 1 min 68°C y 30s 92°C	1 min 68°C	2 min 72°C	44	31
<i>Helicobacter pylori</i>	JW21 y JW22	5 min 95°C y ciclos 1 min 95°C	1 min 55°C	1 min 72°C	35	87
<i>Legionella pneumophila</i>	1 y 2	5 min a 95°C y ciclos 1 min 95°C	1 min 62°C	2 min 72°C	40	47
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lis-1 y Lis-2	4 min 95°C y ciclos 45s 95°C	45s 60°C	1 min 72°C	2 rondas de 35 ciclos	20
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Diversos (RAPD)	3 min a 94°C y ciclos 20s 94°C	1 min 36°C	1 min 72°C	40	48
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	OJPU4	1 min 94°C	1 min 36°C	2 min 72°C	35	84
<i>Neisseria meningitidis</i>	NM y ru8	6 min 94°C y ciclos 1 min 94°C	1 min 55°C	2 min 72°C	25	68

Bacteria	Iniciadores	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos totales	# Ref. bibliográfica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ETA1 y ETA2	1 min 94°C	1 min 68°C	1 min 72°C	25 a 35	41
<i>Salmonella typhi</i>	ST1 y ST2	1 min 94°C	1.25 min 55°C	3 min 72°C	40	79
	ST3 y ST4	idem	1.25 min 68°C	idem	idem	
<i>Shigella dysenteriae</i> Tipo 1	1 y 2	10 min 95°C para lisar y ciclos de 1 min 94°C	2 min 55°C	2 min 72°C	30	35
<i>Shigella spp</i>	Shig-1 y Shig-2	3 min 93°C y ciclos 30s 94°C	30s 55°C	20s 72°C	35	49
<i>Staphylococcus aureus</i>	SEA-1 y SEA-2	2 min 94°C	2 min 55°C	1 min 72°C	No Reportado	37
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SP1 y SP2	2 min 94°C	2 min 55°C	2 min 72°C	35	32
<i>Streptococcus spp</i>	STREP y ru8	6 min 94°C y ciclos 1 min 94°C	1 min 55°C	2 min 72°C	25	68
<i>Vibrio cholerae</i> 01	1 y 2	1 min 94°C	1.5 min 60°C	1.5 min 72°C	25	78
<i>Vibrio cholerae</i> 01	CTX2 y CTX3	5 min 94°C y ciclos 1 min 95°C	1 min 60°C	1 min 72°C	25	26
<i>Chlamydia trachomatis</i>	R1 y R2	1 min 94°C	2 min 42°C	3 min 74°C	40	16

Conclusiones

- (1) En relación con las muestras clínicas a analizar, la PCR requiere la presencia de una pequeña cantidad de DNA perteneciente al agente etiológico, sin importar que este último se encuentre viable (lo cual es indispensable en los métodos microbiológicos clásicos).
- (2) En la mayoría de los casos, el DNA a amplificar no requiere de purificación previa: la simple lisis de las bacterias por congelamiento/descongelamiento libera el material genético, que se somete directamente a la PCR.
- (3) Dado que la PCR genera múltiples copias a partir de una sola molécula de DNA molde, es importante evitar la contaminación con material que contenga la secuencia "blanco".
- (4) El empleo de controles apropiados resulta fundamental, tanto para la PCR como para la técnica complementaria involucrada en la identificación del DNA amplificado.
- (5) El método más sencillo, rápido y económico para identificar el DNA amplificado por PCR, es el de electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio. Éste llega a detectar entre 1.0 y 5.0 ng de DNA.
- (6) La PCR confiere al diagnóstico de las enfermedades una elevada sensibilidad y especificidad, y los resultados se obtienen en mucho menor tiempo que el requerido mediante el cultivo de los especímenes.

- (7) La PCR es particularmente útil en la identificación de patógenos cuyo cultivo es difícil, prolongado o imposible. En este sentido, también es exitosa cuando las muestras clínicas son recolectadas después de que el paciente ha iniciado algún tratamiento con antibióticos.
- (8) La variante PCR-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*) se emplea para detectar la presencia de microorganismos de los que se desconoce la información genética necesaria para llevar a cabo la amplificación de un gen característico. En este caso, la identificación se fundamenta en la obtención de un patrón de bandeo (del producto amplificado) asociado a un par de iniciadores elegidos de manera arbitraria.
- (9) El uso de sondas de oligonucleótidos conjugadas a enzimas o compuestos fluorescentes permite la identificación del DNA amplificado en forma sensible y confiable, prescindiendo de sustancias radioactivas.
- (10) Entre los principales contratiempos asociados a la PCR destacan la posibilidad de una amplificación inespecífica o nula y, sobre todo, la inevitable tarea de estandarizar todas las condiciones de reacción para lograr obtener resultados confiables.

Referencias bibliográficas

1. **Altwegg M, Hickmann-Brenner F W, Farmer J J.** Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. *J Infect Dis* 1989; 160 (1) : 145 - 149.
2. **Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K** (Eds). Short protocols in molecular biology. 2nd ed. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons. New York, 1992.
3. **Bäckman A, Johansson B, Olcén P.** Nested PCR optimized for detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal samples. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (10) : 2544 -2548.
4. **Bangham C R M.** The polymerase chain reaction : getting started. En *Methods in molecular biology*, Vol. 9: Protocols in human molecular genetics. Mathew C (Ed.). The Humana Press Inc. Clifton, NJ. 1991. Cap.1 : 1-28.
5. **Bassam B J, Caetano-Anollés G, Gresshoff P M.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem* 1991; 196 : 80 - 83.
6. **Bej A K, Mahbubani M H, Atlas R M.** Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; 26 (3) : 301-334.
7. **Bej A K, Steffan R J, DiCesare J, Haff L, Atlas R M.** Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56 (2) : 307 - 314.

8. **Bej A K, McCarty S C, Atlas R M.** Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: Comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57 (2) : 2429 - 2432.
9. **Bernard Henry J (Ed.).** Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9a ed. Masson-Salvat Medicina. México 1993. Parte VI, Caps. 41- 44 Microbiología Médica : 1053 -1128.
10. **Bertin B, VanHoegaerden M.** Colorimetric detection of yeasts by in vitro amplification of DNA, incorporation of biotin-labeled deoxynucleotide, and hybridization. *Methods Mol Cell Biol* 1991; (2) : 112.
11. **Border P, Howard J, Plastow G, Siggins K.** Detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1990; 11 (3) : 158-162.
12. **Braude A I, Davis C E, Fierer J (Eds.).** Microbiología Clínica. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina 1984.
13. **Brock T D, Madigan M T.** Biology of the microorganisms. 6th ed. Prentice Hall. New Jersey 1991. Cap.13, Clinical and diagnostic microbiology : 469 - 495.
14. **Carleton, Stephen.** The PCR: applications in genomic analysis. En *Human chromosomes: principles and techniques*. Verma R. & Babu A. Eds. Mc Graw Hill, 2nd. ed. U.S.A. 1995.
15. **Cartwright C P, Nelson N A, Gill V J.** Development and evaluation of a rapid and simple procedure for detection of *Pneumocystis carinii* by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (7) : 1634 - 1638.

16. Claas H C J, Wagenvoort J H T, Niesters H G M, Tio T T, Van Rijsoort-Vos J H, Quint W G V. Diagnostic value of the polymerase chain reaction for *Chlamydia* detection as determined in a follow-up study. *J Clin Microbiol* 1991; 29 (1) : 42 - 45.
17. Clayton C L, Kleanthous H, Coates P J, Morgan D D, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (1) : 192 - 200.
18. Correa C M, Tibana A, Gantijo-Filho P. Vegetables as a source of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital of Rio de Janeiro. *J Hosp Infect* 1991; 18 : 301 - 306.
19. Coyle M B, Groman N B, Russell J Q, Harnish J P, Rabin M, Holmes K K. The molecular epidemiology of three biotypes of *Corynebacterium diphtheriae* in the Seattle Outbreak 1972-1982. *J Infect Dis* 1989; 159 (4) : 670 - 679.
20. Deneer H, Boychuk I. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57 (2) : 606-609.
21. Domeika M, Bassiri M, Mardh P A. Diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic males by testing urine by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (10) : 2350 - 2352.
22. Dular R, Kajloka R, Kasatiya S. Comparison of gen-probe kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26 (5) : 1068-1069.
23. Eckert K A, Kunkel T A. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 1990; 18 (13) : 3739 - 3744.

24. **Eisenstein B I.** The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 322 (3) : 178 - 183.
25. **Erlich H A, Gelfand D, Sninsky J J.** Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; 252 : 1643 -1651.
26. **Fields P, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O.** Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin America cholera epidemic. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (8) : 2118-2121.
27. **Finegold S M, Baron E J.** Bailey and Scott's Diagnostic microbiology. 7th ed. The C. V. Mosby Company. St. Louis, Missouri. 1986.
28. **Furrer B, Candrian U, Lüthy.** Detection and identification of *E.coli* producing heat-labile enterotoxin type 1 by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. *Lett Appl Microbiol* 1990; 10 (1) : 31-34.
29. **Gómez-Lucía E, Goyache J, Orden J A, Blanco J L, Ruiz-Santa-Quiteria J A, Domínguez L, Suárez G.** Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55 (6) : 1447-1451.
30. **Granato P A, Roefaro F M.** Evaluation of a prototype DNA probe test for the noncultural diagnosis of gonorrhea. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (4) : 632-635.
31. **Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadström T, O'Toole P W.** Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (1) : 54 - 58.

32. Hassan-King M, Baldeh I, Secka O, Falade A, Greenwood B. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (7) : 1721 - 1724.
33. Innis M A, Myambo K B, Gelfand D H, Brown M A. DNA amplification with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 : 9436 - 9440.
34. Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T T. PCR Protocols. A Guide to methods and applications. Academic Press Inc. San Diego, California. 1990.
35. Jackson M P. Detection of shiga toxin-producing *Shigella dysenteriae* Type 1 and *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction with incorporation of digoxigenin-11-dUTP. *J Clin Microbiol* 1991; 29 (9) : 1910 - 1914.
36. Jawetz E, Melnick J L, Adelberg E A, Brooks G F, Butel J S, Ornston L N. Microbiología Médica. 12a ed. Manual Moderno. México 1987.
37. Johnson W M, Tyler S D, Ewan E P, Ashton F E, Pollard D R, Rozee K R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29 (3) : 426-430.
38. Karch H, Huppertz H, Böhme M, Schmidt H, Wiebecke D, Scharzkopf A. Demonstration of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples from healthy humans whose sera contain *B. burgdorferi*-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (9) : 2312 - 2314.
39. Keller G H, Huang D, Shih W, Manak M M. Detection of Hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (6) : 1411 - 1416.

40. **Khalifa K E S, Roth A, Roth B, Arasteh K N, Janitschke K.** Value of PCR for evaluation occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (11) : 2813 - 2819.
41. **Khan A A, Cerniglia C E.** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60 (10) : 3739 - 3745.
42. **Lawyer F C, Stoffel S, Saiki R K, Myambo K B, Drummond R, Gelfand D H.** Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* 1989; 264 : 6427 - 6437.
43. **LeBar W, Herschman B, Jemal C, Pierzchala J.** Comparison of DNA probe, monoclonal antibody enzyme immunoassay, and cell culture for the detection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (5) : 826-828.
44. **Lee A B, Cooper T A.** Improved direct PCR screen for bacterial colonies: Wooden toothpicks inhibit PCR amplification. *BioTechniques* 1995; 18 (2) : 225 - 226.
45. **Li H, Gyllensten U B, Cui X, Saiki R K, Erlich H A, Arnheim N.** Amplification and analysis of sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* (London) 1988; 335 : 414 - 417.
46. **Liebl W, Rosenstein R, Götz F, Schleifer K H.** Use of staphylococcal nuclease gene as DNA probe for *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 44 : 179-184.
47. **Lindsay D S J, Abraham W H, Fallon R J.** Detection of *mip* gene by PCR for diagnosis of legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (12) : 3068 - 3069.

48. Linton C J, Jalal H, Leeming J P, Millar M R. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (9) : 2169 - 2174.
49. Lüscher D, Altwegg M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. *Mol Cell Probes* 1994; 8 : 285 - 290.
50. Macario A J L, Conway de Macario E C (Eds). Gene probes for bacteria. Academic Press Inc. San Diego, California. 1990.
51. Mahbubani M H, Bej A K, Perlin M, Schaefer M, Jakubowski W, Atlas R M. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57 (12) : 3456-3461.
52. Mahbubani M H, Bej A K, Perlin M, Schaefer M, Jakubowski W, Atlas R M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (1) : 74-78.
53. Mahbubani M H, Bej A K. Applications of the polymerase chain reaction methodology in clinical diagnostics. in *PCR Technology : current innovations*, Griffin H G & Griffin A M (Eds). CRC Press, 1994. Cap. 31 : 307-326.
54. McPherson M J, Quirke P, Taylor G R. PCR: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, England 1991. Cap.1 : 1-8.
55. Melchers W J G, Verweij P E, Hurk P, Belkum A, De Pauw B E, Meis J F G M. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (7) : 1710 - 1717.

56. **Muir P, Nicholson F, Jhetam M, Neogi S, Banatvala J E.** Rapid diagnosis of Enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of Enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (1) : 31 - 38.
57. **Mullis K B, Faloona F A.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155 : 335-350.
58. **Mullis K B.** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262 (4) : 56-65.
59. **Nagata Y, Yokota H, Kosuda O, Yokoo K, Takemura K, Kikuchi T.** Quantification of picogram levels of specific DNA immobilized in microtiter wells. *FEBS Lett* 1985; 183 : 379 - 382.
60. **Nishibuchi M, Arita M, Honda T, Miwatani T.** Evaluation of a nonisotopically labeled oligonucleotide probe to detect the heat-stable enterotoxin gene of *Escherichia coli* by the DNA colony hybridization test. *J Clin Microbiol* 1988; 26 (4) : 784-786.
61. **Olive D M.** Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with thermostable DNA polymerase. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (2) : 261-265.
62. **Ou C, Kwok S, Mitchell S W, Mack D H, Sninsky J J, Krebs J W, Feorino P, Warfield D, Schochetman G.** DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239 : 295-297.
63. **Owen R J, Beck A, Dayal P A, Dawson C.** Detection of genomic variation in *Providencia stuartii* clinical isolates by analysis of DNA restriction fragment length polymorphisms containing rRNA cistrons. *J Clin Microbiol* 1988; 26 (10) : 2161-2166.

64. **Pasculle A W, Veto G E, Krystofiak S, McKelvey K, Vrsalovic K.** Laboratory and clinical evaluation of a commercial DNA probe for the detection of *Legionella* spp. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (10) : 2350 - 2358.
65. **Pelczar Jr M J, Chan E C S, Krieg N R.** Microbiology. concepts and applications. McGraw Hill, USA 1993. Cap.3 Characterization of microorganisms: 80-101.
66. **Persing D H, Telford S R, Rys P N, Dodge D E, White T J, Malawista S E, Spielman A.** Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in Museum Specimens of *Ixodes dammini* Ticks. *Science* 1990; 249 : 1420 - 1423.
67. **Pollard D R, Johnson W M, Lior H, Tyler S D, Rozee K R.** Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29 (11) : 2517-2521
68. **Radström P, Bäckman A, Qian N, Kragstbjerg P, Pahlson C, Olcen P.** Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococci* using a seminested PCR strategy. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (11) : 2738 - 2744.
69. **Rawn, J D.** Bioquímica. Interamericana-McGraw Hill. España 1989, Vol.2 Cap. 22 y 23 : 665-736.
70. **Rys P N, Persing D H.** Preventing false positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (9) : 2356 - 2360.
71. **Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239 : 487-491.

72. **Samadpour M, Moseley S L, Lory S.** Biotinylated DNA probes for exotoxin A and pilin genes in the differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Clin Microbiol* 1988; 26 (11) : 2319-2323.
73. **Sanger F, Nicklen S, Coulson A R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74 (12) : 5463-5467.
74. **Saunders J R, Saunders V A.** Genotypic and Phenotypic methods for the detection of specific released microorganisms. in *Monitoring genetically manipulated microorganisms in the environment*. Edwards C (Ed). John Wiley & Sons. Great Britain 1993. Cap.2 : 27-59.
75. **Schober A, Walter N G, Tangen U, Strunk G, Ederhof T, Dapprich J, Eigen M.** Multichannel PCR and serial transfer machine as a future tool in evolutionary biotechnology. *BioTechniques* 1995; 18 (4) : 652 - 660.
76. **Schochetman G, Ou C, Jones W K.** Polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1988; 158 (6) 1154-1157.
77. **Schultsz C, Pool G J, Ketel R, Wever B, Speelman P, Dankert J.** Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (10) : 2393 - 2397.
78. **Shirai H, Nishibuchi M, Ramamurthy T, Bhattacharya S K, Pal S C, Takeda Y.** Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* 1991; 29 (11) : 2517-2521.
79. **Song J, Cho H, Park M Y, Sun Na D, Moon H B, Hyun Pai C.** Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (6) : 1439 - 1143.

80. **Stull T L, LiPuma J J, Edlind T D.** A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: Ribosomal RNA. *J Infect Dis* 1988; 157 (2) : 280-286.
81. **Swaminathan B, Prakash G (Eds).** Nucleic acid and monoclonal antibody probes. Applications in diagnostic microbiology. Marcel Dekker Inc. New York, 1989.
82. **Tenover F C.** Molecular methods for the clinical microbiology laboratory. En *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. Balows A et al (Eds) American society for microbiology. Washington, D.C. 1991. Cap.17 : 119-127.
83. **Tompkins L S, Troup N, Labigne-Roussel A, Cohen M L.** Cloned, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. *J Infect Dis* 1986; 154 (1) : 156-162.
84. **Ursi D, Ieven M, Van Bever H, Quint W, Niesters H G M, Goossens H.** Typing of *Mycoplasma pneumoniae* by PCR-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (11) : 2873 - 2875.
85. **VanDemark P J, Batzing B L.** The Microbes: An introduction to their nature and importance. Benjamin/Cummings Publishing Company, U.S.A. 1987.
86. **Wahl G M, Berger S L, Kimmel A R.** Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods Enzymol* 1987; 152 : 399-407.
87. **Weiss J, Mecca J, Da Silva E, Gassner D.** Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (7) : 1663 - 1668.
88. **Welsh J, McClelland M.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18 (24) : 7213 - 7218.

89. **Widjoatmodjo M N, Fluit A C, Verhoef J.** Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (12) : 3002 - 3007.
90. **Wolfhagen M J H M, Fluit A C, Torensma R, Poppelier M J J G, Verhoef J.** Rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile* in fecal samples by magnetic immuno PCR assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (7) : 1629 -1633.
91. **Yamamoto N, Okamoto T.** A rapid detection of PCR amplification product using a new fluorescent intercalator; the pyrylium dye, P2. *Nucleic Acids Res* 1995; 23 (8) : 1445 - 1446.
92. **Yuk-Fong P, Lau Y, Hu B, Shir J, Cheung M, Shi Z, Tsai W.** Use of PCR to study epidemiology of *Serratia marcescens* isolates in nosocomial infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (8) : 1935 - 1938.
93. **Garza Velasco R.** Bacterias patógenas; parte I. *Departamento de Biología. Facultad de Química UNAM* 1995; Cap. 2 : 15 - 27.

Apéndice

A) Definición de términos

Ácidos nucleicos

Existen, principalmente, dos tipos de ácidos nucleicos en la mayoría de los organismos: el DNA y el RNA. El DNA nativo es una molécula de doble cadena en forma de hélice, compuesta por un esqueleto de ésteres de azúcar-fosfato con pares de bases nitrogenadas unidas por puentes de hidrógeno.

El DNA es el principal almacén de información genética en las células, mientras que el RNA, que se presenta con diversas formas dentro de la célula, está involucrado en el complejo proceso de traducir la información codificada en el DNA para sintetizar proteínas.

El DNA se constituye por nucleótidos de adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C), los cuales se unen específicamente, de forma complementaria, en pares de bases: A-T, C-G. El RNA es normalmente una molécula de cadena sencilla, de composición química similar al DNA excepto que las moléculas de timina están remplazadas por uracilo (U). (consultar figura 15)

Anticuerpos monoclonales

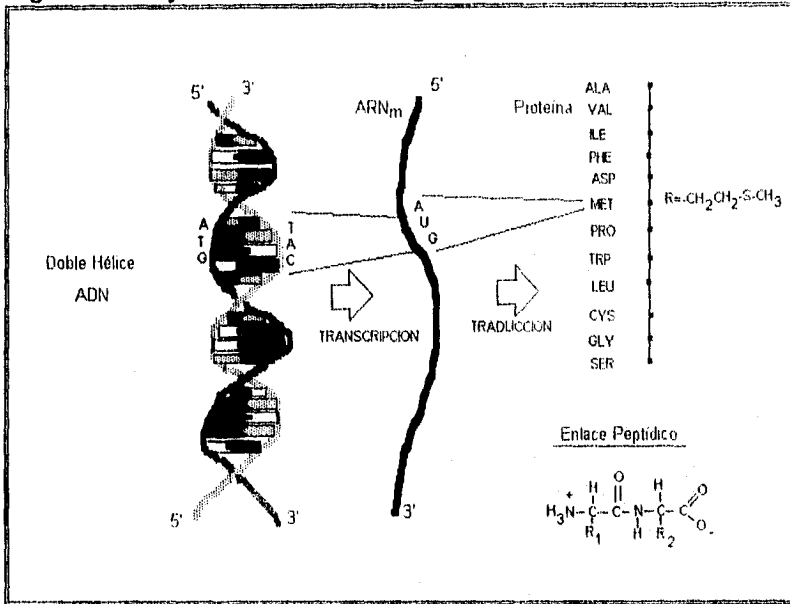
Son proteínas producidas por hibridomas originados de la hibridación entre una célula plasmática normal productora de Ac's y una célula de mieloma; la característica de dichos hibridomas es producir indefinidamente una sola clase de Ac's dirigidos contra un determinante antigénico único. Se emplean en investigación, diagnóstico y tratamientos específicos.

Amortiguador

Es una solución que resiste cambios en el pH tras la adición de un ácido o base fuerte. Se preparan mezclando un ácido débil y su

sal conjugada (ej. - ácido acético y acetato), donde el pH de acción está dentro de ± 1 pH del valor de pK_a del ácido débil.

Figura 15. Flujo de la información genética



Clonación

Es un método de amplificación de material genético específico, el cual se inserta a un plásmido mediante el uso de enzimas de restricción y éste, a su vez, se introduce a una bacteria para generar mayores cantidades de cDNA.

Codón

Unidad fundamental del código genético, conformado por la secuencia lineal de tres nucleótidos en el RNAm, leídos en dirección $5' \rightarrow 3'$ y que codifica para la síntesis de un aminoácido. Existen en total 64 codones, de los cuales UAG, UGA y UAA son codones de terminación de síntesis proteica.

Complementariedad de bases

Es el apareamiento idóneo entre A-T y C-G por las características químicas de las bases, es decir, la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos ceto y amino de los anillos púricos y pirimídicos por ordenación estable de los protones. Por lo tanto, la secuencia de bases en una hebra del DNA determina la secuencia de la hebra con la cual se une complementariamente.

Conjugado

En la mayoría de los casos, es un Ac al cual se le une covalentemente una enzima cuya actividad está inhibida por impedimento estérico. Cuando el Ac se une al antígeno (Ag) existe un cambio estructural que permite a la enzima actuar sobre su sustrato y, como resultado de esta interacción, se forma un producto fácilmente observable. Existen conjugados en los cuales un átomo se ha substituido por un isótopo radioactivo, o bien, están unidos a sustancias que fluorescen bajo la luz U.V. Los más recientes usan sustancias quimioluminiscentes.

Desnaturalización

Las dos hebras del DNA pueden separarse, o desnaturalizarse, por calentamiento o por la acción de bases fuertes. Este es el primer paso en las reacciones de hibridación que involucran DNA de doble cadena (con *primers* o iniciadores de DNA de cadena sencilla), en la PCR y en la identificación de segmentos específicos mediante sondas de oligonucleótidos. Como el DNA es más estable en forma de doble hélice, cuando dos moléculas complementarias están próximas una a la otra, se recombinan para formar una estructura dúplex.

Cadenas sencillas de DNA y RNA también pueden formar híbridos estables si poseen secuencias complementarias (en este supuesto, la adenina se une al uracilo).

Enzimas de restricción

Son enzimas bacterianas que presentan la capacidad de hidrolizar enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos, pero sólo en secuencias

específicas, generalmente de 4 a 6 pares de bases. Dichas secuencias difieren para cada endonucleasa y presentan simetría palindrómica. Las bacterias se protegen de sus propias enzimas de restricción metilando uno o más nucleótidos en secuencias limitantes con los sitios de corte. Algunas enzimas como la EcoR1 deja extremos "cohesivos" de modo que el DNA cortado puede unirse fácilmente a otra molécula cortada con la misma enzima, lo cual se emplea para insertar fragmentos de DNA en los plásmidos.

Estringencia

Un concepto crítico para comprender el proceso de hibridación es la estringencia o condiciones de rigor en la reacción. Se refiere al número de bases mal apareadas que pueden ser toleradas entre dos hebras de DNA, o entre una hebra de DNA y otra de RNA, para formar una molécula dúplex. La estringencia se determina mediante la temperatura, la fuerza iónica, la longitud de la sonda, o la presencia de agentes desnaturizantes (como la formamida) en el amortiguador utilizado para la reacción de hibridación.

En condiciones de baja estringencia, una sonda que es sólo parcialmente complementaria a su secuencia blanco u objetivo, puede llegar a unirse y formar un híbrido estable; Sin embargo, en condiciones de alta estringencia, dicha sonda no podría formar una molécula dúplex estable.

En términos prácticos, esto significa que una sonda dirigida contra el DNA de *Staphylococcus aureus* puede unirse en condiciones de baja estringencia a DNA de *Staphylococcus epidermidis* o *Staphylococcus saprophyticus* y formar un híbrido estable, mientras que en condiciones de alta estringencia, la sonda se uniría exclusivamente al DNA de *S. aureus* y no al DNA de las otras especies.

Gen

Secuencia de nucleótidos en el DNA que codifican para un RNAm y éste, a su vez, para la síntesis de una proteína. Ocupa una posición específica dentro de los cromosomas denominada *locus*.

Genoma

Es el total de la información genética de un organismo, almacenada en el DNA.

Hibridación

Es la unión de un fragmento de DNA o RNA con un gen que presenta una secuencia complementaria, mediante el apareamiento específico de bases complementarias.

Incubación

Es el proceso de someter los cultivos de microorganismos a condiciones favorables para su crecimiento: temperatura, humedad, tiempo y tensión de oxígeno, entre otras.

Inmunofluorescencia

Es una técnica inmunocitoquímica en la cual los Ac's se encuentran conjugados con un fluorocromo (como el isotiocianato de fluoresceína), y permite la localización de antígenos en la superficie y dentro de las células al examinar la preparación en un microscopio de luz U.V. La técnica puede ser directa o indirecta dependiendo de si el Ac marcado reacciona directamente contra el Ag o contra un primer Ac.

Northern-blot

Es una técnica desarrollada por J.C. Alwine, D.J. Kemp y G.R. Stark, donde se digiere RNA con endonucleasas de restricción y los fragmentos generados se resuelven mediante electroforesis en gel, de forma similar a la técnica de *Southern*.

Nucleótido

Unidad estructural de los ácidos nucleicos y una de las principales formas de almacenamiento de energía en las células. Están compuestos por una base nitrogenada (púrica o pirimídica), un monosacárido (ribosa o desoxirribosa) y de uno a tres grupos fosfato (consultar figura 16).

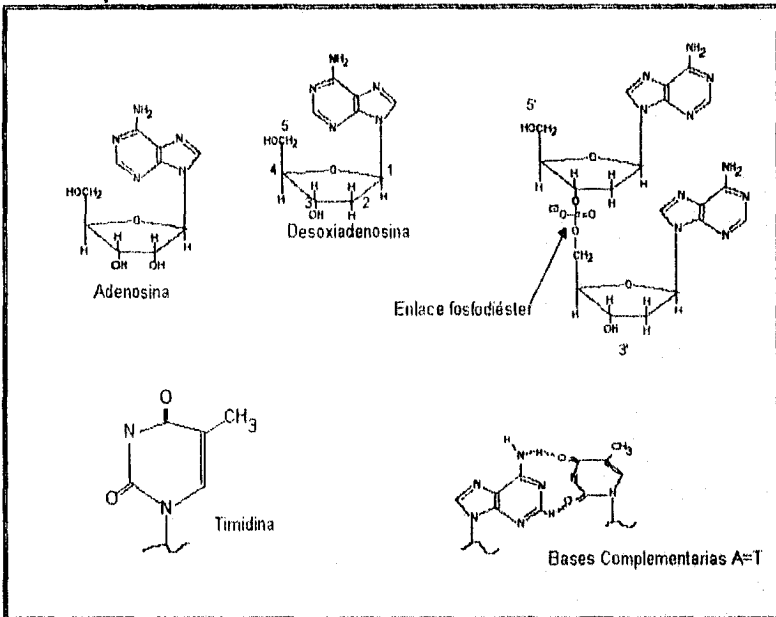
Patógeno

Es un microorganismo capaz de producir enfermedad.

Plásmidos

Son moléculas de DNA extracromosómico, pequeñas y de estructura circular, presentes en las bacterias y que contienen información genética variada, como la resistencia a antibióticos. Tienen la propiedad de poder replicarse asincrónicamente a la división cromosómica.

Figura 16. Bases nitrogenadas, enlace fosfodiéster y complementariedad^a



Primer, cebador, iniciador o amplimero

Es un oligonucleótido de cadena corta que al unirse por complementariedad de bases a una hebra sencilla de DNA molde,

^a Modificado de Rawn⁶⁹ figs.22-3 y 22-4, p.667 y 668.

actúa como punto de inicio para la síntesis de la cadena complementaria dirigida por la DNA polimerasa.

Pruebas bioquímicas

Son una serie de ensayos realizados en el laboratorio para determinar la actividad metabólica de los microorganismos. En ellas se adiciona un compuesto al medio de cultivo y éste es convertido a otra sustancia por la acción metabólica del microorganismo, lo cual se pone de manifiesto con ayuda de algún indicador o revelador.

Reacción cruzada

Es la unión de un Ac a dos Ag's distintos, debido a que éstos contienen determinantes antigénicos comunes o muy similares.

Replicación

Es un proceso mediado por enzimas donde el DNA se abre a modo de cierre de cremallera a lo largo de su eje, separándose las bases apareadas. A medida que los enlaces de hidrógeno se separan, se forman nuevas cadenas complementarias usando como molde a la hebra original del DNA. De esta manera, se producen dos réplicas exactas de la molécula.

Secuenciación

Es la determinación del ordenamiento lineal de los nucleótidos en una hebra de DNA mediante las técnicas de degradación química o terminación de cadena. Ambas se fundamentan en el principio de que dos moléculas de DNA sencillo que difieren en longitud por sólo un nucleótido pueden ser separadas en bandas distintivas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Sensibilidad

Es la capacidad de respuesta de un instrumento analítico o de una técnica determinada en relación a la detección o medición del analito.

Sonda de ácidos nucleicos

Segmento de DNA o RNA que puede "buscar" su secuencia complementaria y unirse a ella para formar una nueva molécula dúplex. Las sondas suelen encontrarse marcadas con radio isótopos, enzimas o moléculas quimioluminiscentes, de modo que la formación de las moléculas dúplex puede detectarse fácilmente. Las sondas pueden ser diseñadas para ser específicas de género, especie, e incluso, cepa-específica, al variar la secuencia de nucleótidos utilizada (consultar figura 17).

Virtualmente, todos los microorganismos contienen algunas secuencias de nucleótidos únicas en sus genomas, que pueden ser utilizadas como "huellas digitales" para su identificación.

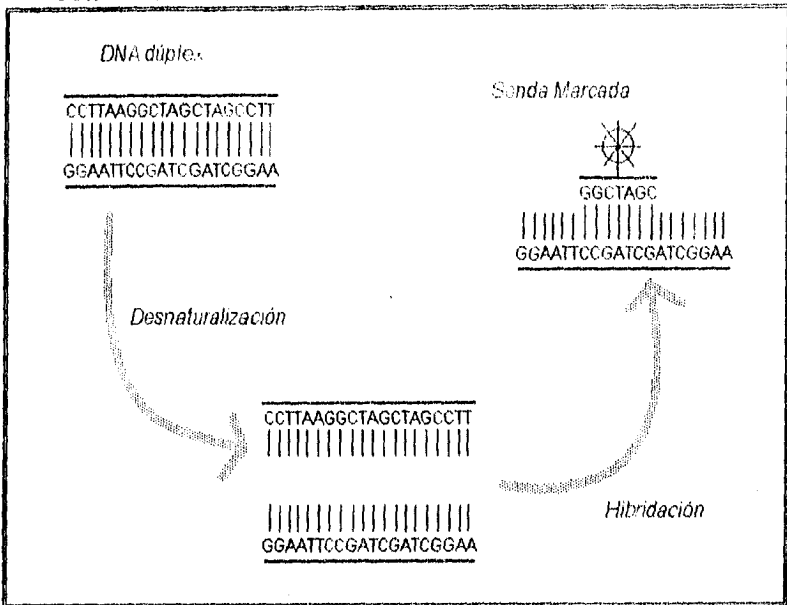
Southern-blot

Es una técnica de análisis de DNA mediante la cual éste es digerido con enzimas de restricción y se separa mediante electroforesis en gel de agarosa. El DNA se desnaturaliza *in situ*, introduciendo el gel en NaOH, y se transfiere por capilaridad a una membrana de nylon utilizando una solución de alta concentración salina.

El DNA se une covalentemente a la membrana por calor o radiación U.V. y, posteriormente, se hibrida con una sonda marcada en condiciones de estringencia deseadas.

La sonda no unida se elimina por lavado y la reacción se revela para determinar la posición en la que se unió la sonda marcada. Su utilidad se basa en la obtención del mapa de restricción del DNA y la identificación de la secuencia de interés.

Figura 17. Identificación de secuencias específicas mediante sondas marcadas^b



Prueba de susceptibilidad

Es un ensayo destinado a determinar la capacidad de un antimicrobiano para inhibir el crecimiento de un microorganismo, mediante el método de difusión en agar. El medio de cultivo se inocula con el microorganismo en estudio y se colocan discos de papel filtro que contienen concentraciones conocidas de diferentes antimicrobianos.

Previo incubación aparecen halos de inhibición alrededor de los discos, indicando probable sensibilidad.

^b Modificado de Tenover^{B2} fig. 1, p. 120

Tipificación

Es la determinación del tipo al cual corresponde un microorganismo, dentro de un género específico, mediante técnicas inmunológicas (serotipo) o microbiológicas (biotipo).

Traducción

Mejor conocida como síntesis de proteínas, consiste en la transferencia de la información genética, desde los codones hasta los aminoácidos sintetizados. Tiene lugar en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Las subunidades del ribosoma se ensamblan en la cadena del RNAm por su extremo 5' y los codones se leen mediante los RNAt (que poseen en su estructura el anticodón), mientras que las enzimas ribosomales establecen los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que transportan los RNAt hasta llegar al codón de terminación.

Transcripción

Es la copia del DNA a una molécula de RNAm, RNAt o RNAr por acción de la RNA polimerasa, con base en el principio de apareamiento de bases. El RNAm es copia fiel del DNA genético. El RNAt es el diccionario para traducir los tripletes de nucleótidos en aminoácidos y, el RNAr, junto con diversas proteínas, se ensamblan para formar los ribosomas donde se efectúa la traducción.

B) Reactivos y soluciones

Este apéndice incluye las fórmulas para los reactivos y amortiguadores utilizados en la tesis. Las soluciones se listan en orden alfabético. Todos los reactivos se preparan usando agua destilada y desionizada.

Concentraciones de los ácidos y bases de uso común					
Reactivo	PM	δ (g/mL) 20°C	% Peso aprox.	Molaridad	V, mL (*)
Acido acético	60.05	1.05	99.8	17.45	57.3
EDTA	60.10	0.899	100	15.0	66.7
HCl	36.46	1.19	37.2	12.1	82.5
H ₂ SO ₄	98.08	1.84	96.0	18.0	55.8
NaOH	40.00	1.54	50.5	19.4	51.5

(*) V, mL = volumen en mililitros necesarios para preparar 1 Litro de solución 1 M.

Acetato de sodio, 3M

Disolver 408g de acetato de sodio·3H₂O en agua; ajustar el pH a 5.2 con ácido acético 3M y añadir H₂O para 1 L.

Agarosa, Gel de

Añadir la agarosa en polvo (de grado electroforético) al amortiguador 1x (TAE o TBE) y derretir en baño maría (o mediante un horno de microondas); se debe derretir la agarosa por completo. Una vez homogeneizada se le puede añadir el bromuro de etidio (0.5 µg/mL) para facilitar la visualización de los fragmentos de DNA durante la electroforesis.

Albúmina sérica bovina (BSA), 0.5 mg/mL

La concentración de BSA se determina usando la relación $A_{280}=6.6$ para una solución de BSA de 10 mg/mL en una celda de 1 cm. de diámetro.

Biotina-11-dUTP, 0.5 mM

Preparar una solución 0.5 mM, a partir de la biotina-11-dUTP patrón (liofilizada), usando Tris-Cl 20 mM, a pH 7.5. Ajustar el pH con algunos microlitros de Tris-Cl 1 M, pH 7.5. Almacenar a -20°C.

Carga, amortiguador de, 10x

20% Ficoll 400

0.1 M Na₂EDTA, pH 8.0

1.0% SDS

0.25% [p/v] azul de bromofenol

0.25% [p/v] xilen cianol

H₂O para 1 L**Desnaturalización, solución de**

87.75 g NaCl (1.5M final)

20.0 g NaOH (0.5M final)

H₂O para 1 L**DTT, 1M**

(di-Tiotreitol) PM. 180.2

Disolver 15.45 g DTT en 100 mL de H₂O. Almacenar a -20°C.**EDTA, 0.5 M**

(Ac. etilendiaminotetraacético) PM. 292.2

Disolver 186.1 g Na₂EDTA·2H₂O en 700 mL de H₂O. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 M (~50 mL) y añadir H₂O hasta 1 L.**Etidio, bromuro de. Solución patrón de 0.5 mg/mL (1000x)**

(Bromuro de 2,7-Diamino-10-etil-9-fenil-fenantridinio) PM. 394.3

Disolver 50 mg de EthBr en 100 mL de agua. La solución de trabajo es de 0.5 µg/mL, por lo que se debe diluir el patrón 1:1000 para usarlo en el gel de agarosa.

Hibridación, solución deCombinar los ingredientes de la solución de pre-hibridación (descrita posteriormente) a excepción del H₂O. Añadir 50 g de dextran sulfato (para una concentración final 10%) y mezclar por 12 hrs. Llevar el volumen a 500 mL con H₂O.

HCl, 1 M

(Ác. clorhídrico). Mezclar en el siguiente orden:
913.8 mL de H₂O con 86.2 mL de HCl concentrado.

H₂SO₄, 1 N

(Ác. sulfúrico)

Esta solución contiene 49.0388 g de ácido por litro. Vaciar lenta y cuidadosamente 30 mL de ácido sulfúrico concentrado (densidad 1.84) en 3 o 4 volúmenes de agua. Enfriar la mezcla en un baño de hielo y llevar el volumen a 1 litro.

MgCl₂, 1 M

(Cloruro de magnesio) PM. 203.3

Disolver 20.3 g de MgCl₂·6H₂O en 100 mL de H₂O.

NaCl, 5 M

(Cloruro de sodio) PM. 58.44

Esta solución contiene 292 g de NaCl por litro de H₂O.

NaOH, 10 M

(Hidróxido de sodio) PM. 40.00

Disolver 400 g de NaOH en 450 mL de H₂O y ajustar el volumen a 1 L.

PBS, 10x (Solución amortiguada de fosfatos)

80 g NaCl

2g KCl

11.5 g Na₂HPO₄·7H₂O

2 g KH₂PO₄ y H₂O para 1 L

Pre-hibridación, solución de

12.5 mL KPO₄, pH 7.4 (25 mM final)

125 mL 20x SSC (5x final, descrita posteriormente)

25 mL de leche en polvo descremada, reconstituida

5 mL 5 mg/mL DNA de esperma de salmón (50 µg/mL final)

250 mL formamida 100% (50% final)

82.5 mL H₂O

Restricción, amortiguador de

100 mM Tris-Cl, pH 7.5

100 mM MgCl₂

10 mM DTT

1 mg/mL BSA

0, 0.5, 1.0 ó 1.5 M NaCl

SDS/solución de hibridación

Añadir 10% de dextran sulfato a la solución SDS/pre-hibridación descrita a continuación.

SDS/solución de pre-hibridación

Añadir SDS 1% a la solución de pre-hibridación descrita anteriormente.

SSC, 20x

3M NaCl (175 g/Litro)

0.3M Na₃Citrato·2H₂O (88 g/Litro)

Ajustar a pH 7.0 con HCl 1M

TAE, amortiguador de electroforesis

Solución patrón 50x, pH ~8.5

242 g Tris base

57.1 mL ác. acético glacial

37.2 g Na₂EDTA·2H₂O

H₂O para 1 L

TBE, amortiguador de electroforesis

Solución patrón 10x

108 g Tris base (PM. 121.1)

55 g ác. bórico (PM. 61.83, $\delta=1.437$)

40 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0

H₂O para 1 L

Tris-Cl, 1M

Disolver 121 g de Tris base (*Trizma Base, Sigma*) en 800 mL de H₂O. Ajustar al pH deseado con HCl concentrado, mezclar y añadir suficiente H₂O para 1 L.

TTS

(Tris-Tritón-Sacarosa)

50 mM Tris-Cl, pH 8.0

0.1 % *Triton X-100*

0.5 M Sacarosa (PM. 342.3)

Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad. Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra.

T. H. Huxley, 1887