

7.1 Tipificación fágica tradicional

Diapositiva 1:

Una aplicación biotecnológica tradicional de los fagos es su utilización para determinar la cepa específica de una bacteria aislada, así como detectar estas cepas en varias muestras.

Aquí se hablará sobre la estrategia original así como algunas de las adaptaciones utilizadas.

Diapositiva 2:

La tipificación microbiana es el principio de identificación de organismos a nivel de cepa y es importante para identificar cepas virulentas, confirmar brotes potenciales, determinar la fuente y ruta de infecciones, y seguir la contaminación cruzada de patógenos en el ámbito sanitario. Además, permite la evaluación de medidas de control para determinar su eficacia.

Se han desarrollado varias técnicas para permitir la tipificación y una de ellas utiliza la especificidad inherente de los fagos. De hecho, estos virus bacterianos solo se adhieren a e infectan cepas hospedadoras específicas; así, mediante la utilización de una librería de fagos se puede identificar un aislado bacteriano a nivel subespecífico.

Diapositiva 3:

Para conseguir esto, se plaquea un cultivo bacteriano en césped y sobre él se añaden gotas que contienen distintos fagos en zonas específicas. Si la infección tiene éxito, se formarán placas de lisis; como se utilizan distintos fagos, cada cepa dará lugar a un patrón específico de infección y esto permitirá la determinación del género bacteriano y la especie.

Sin embargo, un inconveniente de esta estrategia es que solo se pueden detectar bacterias cultivables y la velocidad de este diagnóstico está también limitada por la tasa de multiplicación del hospedador bacteriano, un factor que puede ser problemático para algunos patógenos tales como las micobacterias. Otro reto es la laboriosidad asociada a la tipificación fágica ya que requiere la producción continuada y el almacenamiento de fago en grandes cantidades.

Diapositiva 4:

A lo largo de los años se han desarrollado varias adaptaciones para solventar las limitaciones de esta estrategia.

La primera se conoce como ensayo de amplificación fágica, la cual es principalmente útil para la detección de bacterias de crecimiento lento, tales como las micobacterias. Para compensar la lenta tasa de crecimiento de este patógeno, se introduce un segundo paso que utiliza células sustitutas de crecimiento rápido. La muestra inicial sigue siendo infectada por fagos para detectar la presencia de patógenos específicos; sin embargo, en el siguiente paso se añade un viricida para destruir el exceso de bacteriófagos. Así, solo los fagos que están infectando la bacteria sobreviven y pueden dar lugar a una nueva progenie fágica. Una vez finaliza este ciclo infeccioso, se utiliza la nueva progenie para infectar las células sustitutas de crecimiento rápido. Se plaquean estas células para permitir el recuento de placas como indicación de la replicación del bacteriófago.

Diapositiva 5:

Una segunda adaptación se conoce como el ensayo del fago “chivato”. Esta estrategia evita la necesidad de la formación de placas, permitiendo un tiempo de detección más rápido. Con este fin, se modifican genéticamente los fagos para incluir una construcción “chivato”, estas construcciones pueden variar desde proteínas fluorescentes a enzimas específicos.

5.1: Una vez se inserta el genoma fágico en la célula diana durante la infección, se expresará el gen “chivato”.

5.2: Entonces, la señal del gen “chivato” podrá ser detectada y la intensidad de la señal tendrá correlación con el número de células diana presentes en la muestra.

5.3: Un ejemplo de un sistema de fago “chivato” es la utilización de la luciferasa para detectar micobacterias. Las células infectadas producirán luciferasa y mediante la adición de luciferina, se producirá una señal luminosa que podrá ser medida.

Diapositiva 6:

Una tercera estrategia es la tecnología de los dos fagos, que aumenta aún más la especificidad de la tipificación fágica. En esta estrategia se utilizan dos fagos, cada uno de los cuales codifica un gen de resistencia distinto que pueden transmitir por transducción a la célula diana. Además, estos fagos están unidos químicamente a anticuerpos que se unen a distintos epítomos del mismo antígeno, que deriva de patógenos específicos.

6.1: A continuación se mezclan ambos fagos con la muestra que potencialmente contiene el antígeno diana.

6.2: Entonces, se añaden las bacterias susceptibles para permitir la infección con los complejos fago-antígeno. Es importante mencionar aquí que solo los fagos unidos al mismo antígeno podrán coinfectar las bacterias.

6.3: Finalmente, se plaquean las células infectadas en un medio que contenga ambos antibióticos de selección para seleccionar las células coinfectadas. Así, el número de colonias que crezcan en la placa se correlacionará con el número de antígenos presentes en la muestra original.

Diapositiva 7:

Las siguientes referencias ofrecen una buena visión global del potencial de los fagos para la detección bacteriana. Este tema será tratado en más detalle en la próxima sección.