

## 7.2 Métodos emergentes en el diagnóstico bacteriano basado en fagos

### Diapositiva 1:

La utilización de métodos de diagnóstico basados en fagos va más allá de la tipificación y algunas técnicas ya tienen aplicaciones industriales. En esta presentación, hablaremos en detalle sobre algunas de las tecnologías basadas en fagos que ya están en uso para la detección de patógenos clínicos o alimentarios.

### Diapositiva 2:

Esta tabla resume los métodos de diagnóstico comerciales basados en fagos disponibles hasta el momento, que permiten el diagnóstico de cuatro patógenos: *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* y *Staphylococcus aureus*. Estas herramientas utilizan cinco estrategias principales para evaluar si los fagos podrían infectar con éxito al hospedador: 1. Amplificación del fago, 2. Expresión de un gen “chivato”, 3. Cuantificación de la amplificación del ADN genómico del fago, 4. Detección de la producción de la proteína estructural del fago mediante espectrometría de masas, y 5. Ensayo de hibridación en membrana “dot blot”.

Como se muestra en la tabla, cada herramienta tiene unas características determinadas de matriz de muestra, tiempo de detección y sensibilidad. La matriz puede ser desde muestras de sangre a células cultivadas, el tiempo de detección puede aún ser largo (unas 48 horas); sin embargo, varias técnicas de diagnóstico tienen tiempos de detección mucho más cortos, pudiendo reducirse a dos horas. Por último, la sensibilidad puede reducirse hasta 100 UFC/ml.

Estos parámetros muestran la rapidez y sensibilidad superiores que se pueden conseguir con métodos de diagnóstico basados en fagos, en comparación con los métodos tradicionales utilizados hasta el momento. Para más detalles acerca de estas herramientas, recomendamos el artículo de Shofield et al.

### Diapositiva 3:

Otra área de aplicación de los métodos de diagnóstico basados en fagos es la detección de patógenos en la industria alimentaria. Esta industria está sometida a estrictas regulaciones de calidad bacteriana para prevenir las intoxicaciones alimentarias, que constituyen un riesgo creciente debido al aumento en el consumo de comidas preparadas y la distribución a nivel mundial gracias a la globalización.

Sin embargo, los métodos convencionales para evaluar la calidad bacteriana de los productos alimentarios son a menudo lentos e ineficientes, por ejemplo, un recuento de microorganismos aerobios para la detección de patógenos puede llevar alrededor de 72 horas. Estos métodos lentos resultan en un retraso en la comercialización de los productos e ingredientes finales, lo que requiere la necesidad de una mayor capacidad de almacenamiento, así como repuestas más lentas frente a brotes potenciales. Además, estas técnicas son a menudo laboriosas, dependientes del operador y requieren mucho gasto de material fungible.

Los métodos de diagnóstico basados en fagos pueden proporcionar las herramientas para evitar algunos de estos problemas y permitir el diseño de procedimientos rápidos, robustos y fiables para detectar patógenos alimentarios importantes tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes*.

La tecnología VIDAS es un ejemplo de un procedimiento de este tipo, y ha sido utilizada para diseñar un sistema de detección automático para varios patógenos basado en la utilización de una proteína fágica recombinante.

#### Diapositiva 4:

La tecnología utiliza una proteína recombinante fágica fija que reconoce específicamente al patógeno diana. Esto permite atrapar al patógeno específico; en un segundo paso, otro anticuerpo conjugado con un enzima se une a otros antígenos de la bacteria diana. En un paso final, este enzima puede dar lugar a un producto de reacción detectable, cuya intensidad puede ser determinada para cuantificar el número de bacterias diana presentes en la muestra.

#### Diapositiva 5:

Esta estrategia ha sido incorporada en una tira de detección única que se muestra en la parte superior izquierda, en el centro se muestra una representación esquemática. Después de un paso inicial de enriquecimiento de unas 18-24 horas, se carga la muestra en la tira y después se utiliza una punta de pipeta que contiene los anticuerpos basados en fagos para recoger las potenciales células diana. Los siguientes slots se utilizan para lavar las células no unidas, añadir el anticuerpo secundario y permitir que tenga lugar la reacción enzimática. Finalmente, se mide el resultado; el proceso entero lleva unos 48 minutos, ya que esta técnica es más rápida, menos laboriosa y requiere menos material fungible que otros procedimientos.

#### Diapositiva 6:

Además de esta técnica, se están desarrollando otras tecnologías que dependen de la amplificación fágica o fagos "chivato", estos dos principios ya han sido comentados en el tema anterior. Otras opciones son la medida de la liberación de marcadores bacterianos relacionados con la infección (tales como la liberación de ATP que sigue a la lisis celular) o la utilización de fagos como componente de afinidad en aparatos biosensores. Para una visión más detallada de estas opciones, recomendamos el artículo de Schmelcher y Loessner.

#### Diapositiva 7:

Un componente fágico que puede utilizarse para detectar y reconocer bacterias gram positivas específicas son los dominios de unión a la pared celular de las endolisinas. El artículo que se discute aquí muestra la optimización de una librería de proteínas de fusión entre una proteína "chivato" fluorescente y dominios de unión a pared celular de diferentes clases de endolisinas frente a *Listeria*. Una vez construida, esta librería podrá detectar y diferenciar cepas específicas de *Listeria*, con este fin se determinó la afinidad de estas proteínas de fusión frente a distintas cepas. Entonces, las proteínas de fusión que muestran una alta afinidad y especificidad pueden mezclarse con cultivos heterogéneos para visualizar las distintas cepas presentes.

#### Diapositiva 8:

Para aquellos que quieran aprender más sobre métodos de diagnóstico basados en fagos, recomendamos los siguientes artículos. Este link muestra un vídeo sobre la utilización de la tecnología VIDAS.