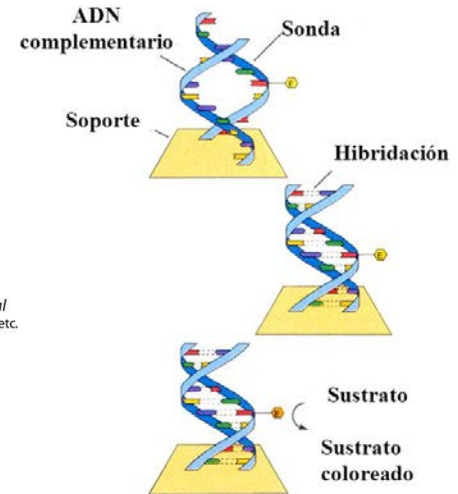
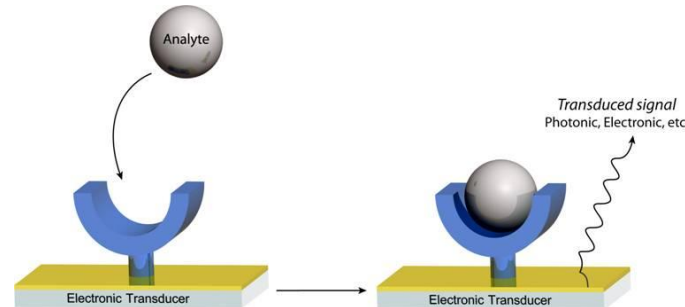


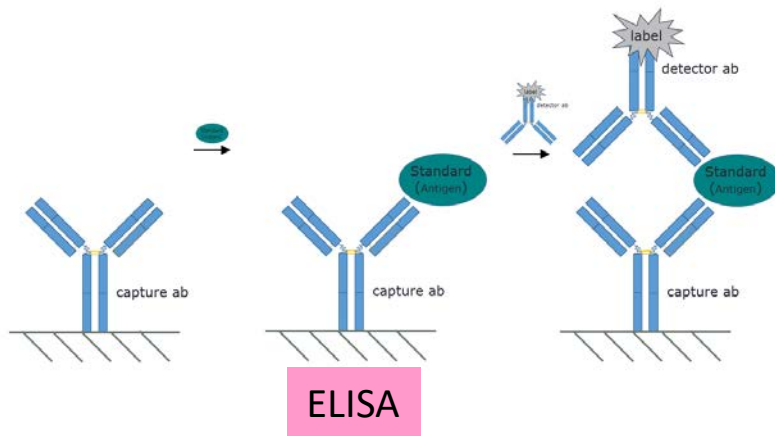
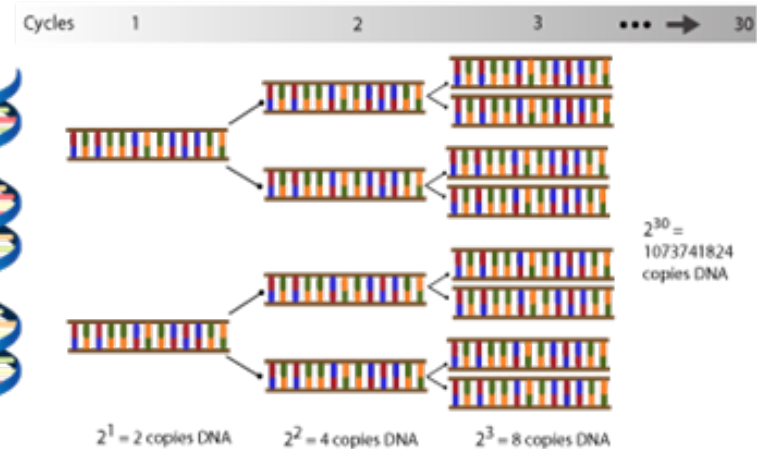
Práctica de Aula 4 y 5.- MÉTODOS RÁPIDOS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA: MÉTODOS INMUNOLÓGICOS MÉTODOS GENÉTICOS. OTROS MÉTODOS RÁPIDOS

Aglutinación de partículas, análisis inmunoenzimáticos y otras técnicas inmunológicas. Métodos basados en la hibridación de ácidos nucleicos. Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos. Citometría de flujo. Análisis impedimétrico. Bioluminiscencia de ATP. Biosensores.



HIBRIDACIÓN

PCR amplification



ELISA

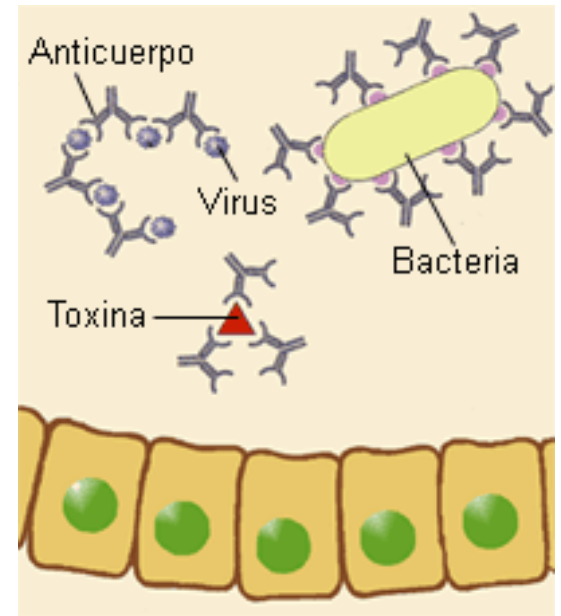
MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Fundamento: Reacción antígeno anticuerpo *in vitro*

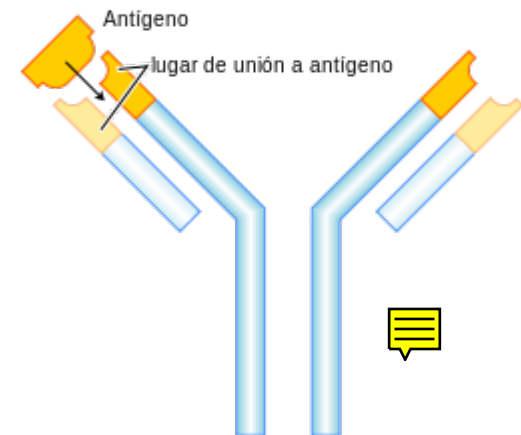
- **Antígenos:** microorganismos (incluido virus) y sus toxinas
- **Anticuerpos:** producidos por vertebrados frente a una sustancia extraña (antígeno). Reconocen y se unen específicamente a los antígenos frente a los que han sido producidos.

Características:

- **Ventajas:** Separan, identifican y cuantifican microorganismos y sus toxinas de forma rápida
- **Inconveniente:** las reacciones ocurren tanto con microorganismos vivos como muertos

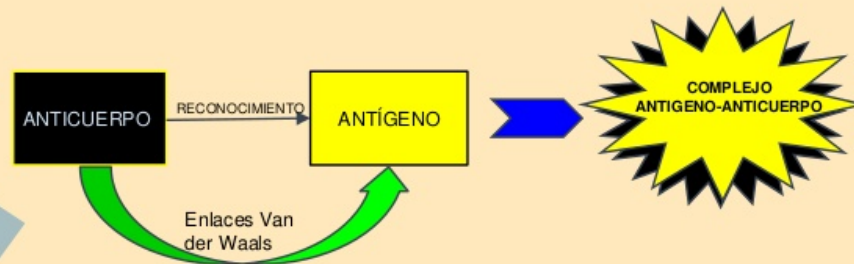


Antígenos



Anticuerpo

REACCIÓN ANTICUERPO-ANTIGENO



AGLUTINACIÓN DE PARTÍCULAS

- Debido a la unión antígeno anticuerpos se forman agregados denominados inmunocomplejos.
- Cuando el inmunocomplejo incluye células se denomina reacción de **aglutinación** en la que se forman **agregados** o **grumos** que **pueden verse a simple vista**.
- Una variante es la aglutinación de látex que utiliza **esferas de látex sensibilizadas con anticuerpos** para favorecer la visualización del aglutinado.
- Otra variante es la Aglutinación Pasiva con Partículas de Látex en Fase reversa (RPLA) que usa **esferas de látex sensibilizadas con antitoxinas** y sirven para detectar **toxinas**

Principio de aglutinación

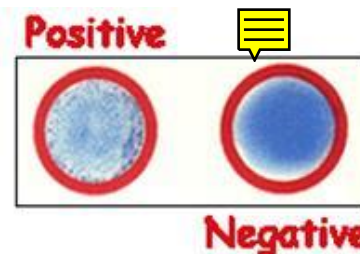
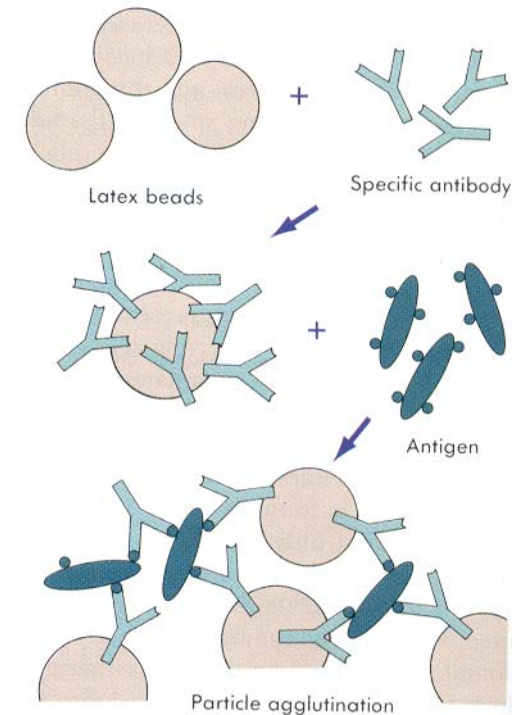
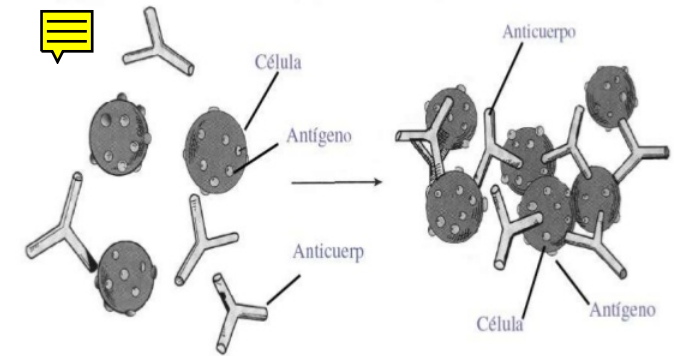


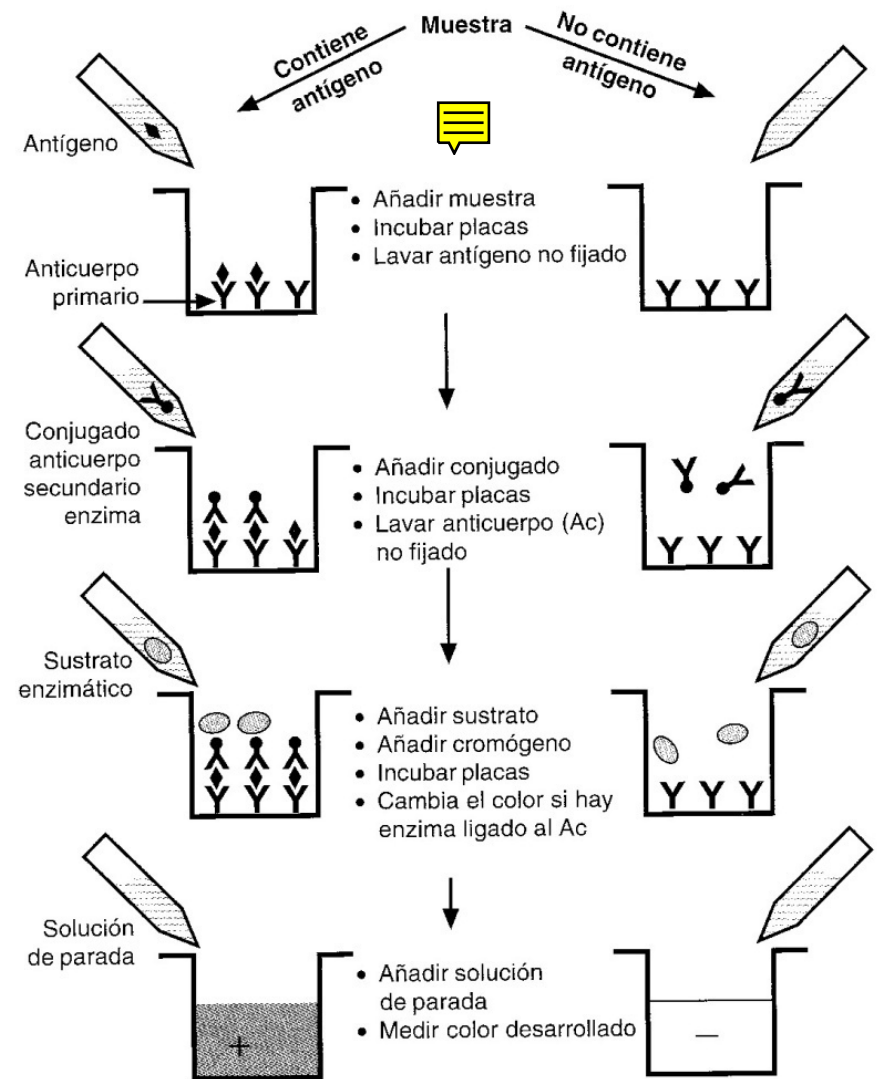
FIGURE 13-5 Alignment of antibody molecules bound surface of a latex particle and latex agglutination reaction

ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO (ELISA; Enzyme Linked immunosorbent assay)

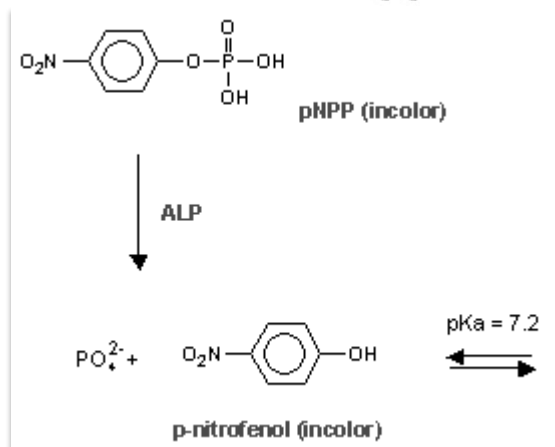
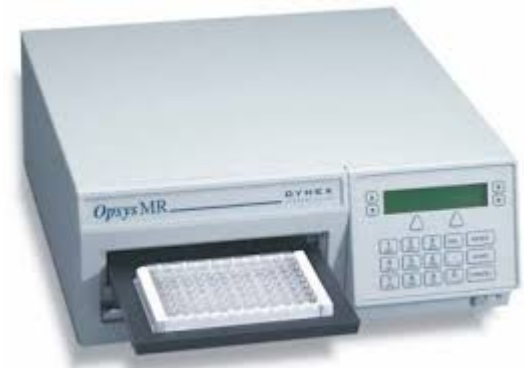
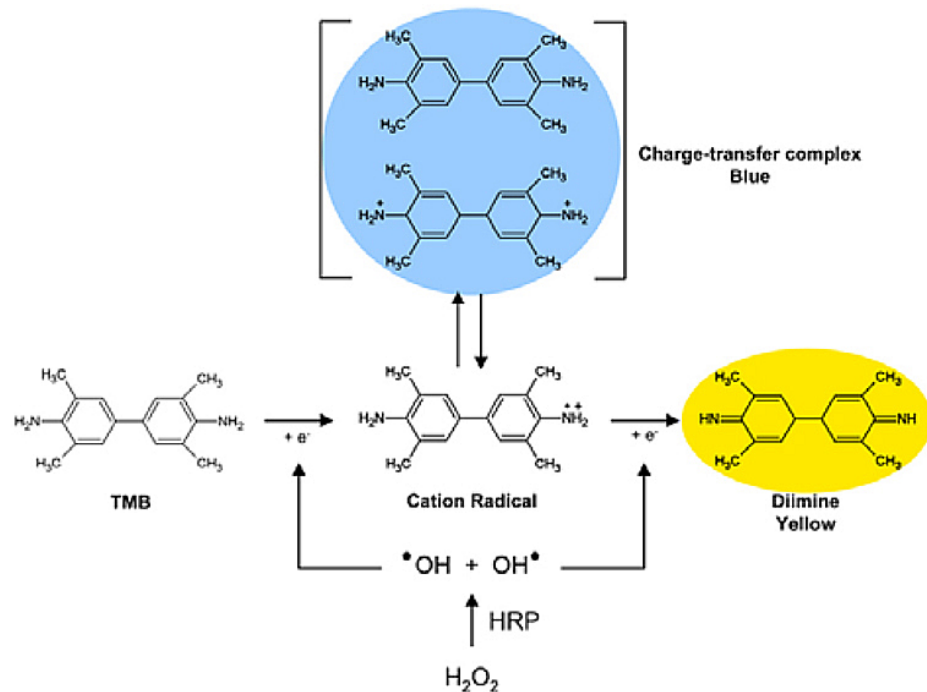
- Se utiliza el ELISA en **sandwich**
- Detecta microorganismos o toxinas.
- Permite cuantificar la cantidad de **antígeno**

■ Procedimiento

- Se recubren pocillos de plástico con anticuerpo específico frente al microorganismo a estudiar (anticuerpo primario).
- Se añade la muestra, si tiene el antígeno quedará ligado al anticuerpo.
- Se añade **anticuerpo secundario marcado enzimáticamente** (con peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) que se une al complejo anterior.
- Tras lavar se adiciona un sustrato cromógeno de la enzima y el desarrollo de color pone de manifiesto la presencia del antígeno en la muestra.



ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO (ELISA; Enzyme Linked immunosorbent assay)

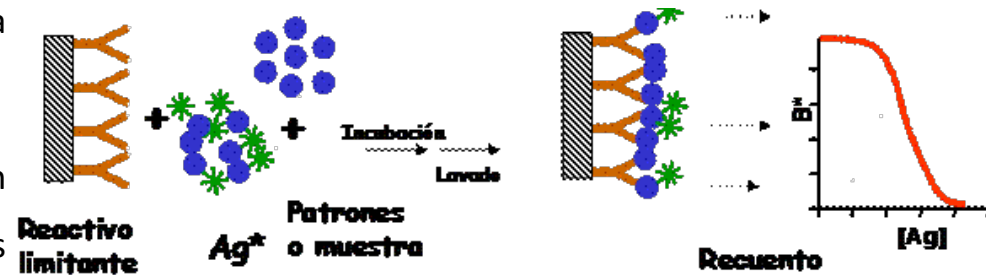
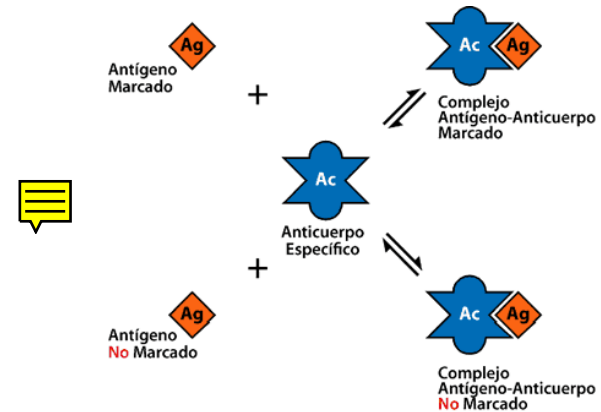


RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

- Detecta **toxinas** microbianas
- Permite cuantificar
- Inconvenientes:
 - equipo **costoso**
 - manipulación de material **radiactivo**

■ Procedimiento

1. Se liga la antitoxina a un soporte sólido o una placa de microtitulación.
2. Se añade la toxina purificada marcada con un radiosítopo y la muestra para que las toxinas compitan por unirse al anticuerpo fijado.
3. La radiactividad asociada al anticuerpo se detecta por autorradiografía o analizador de radioisótopos .
4. Si en la muestra hay mucha toxina se unirá al anticuerpo en lugar de la toxina radiactiva y se ligará poca radiactividad. Una gran cantidad de radiactividad ligada indica que en la muestra hay poca toxina.

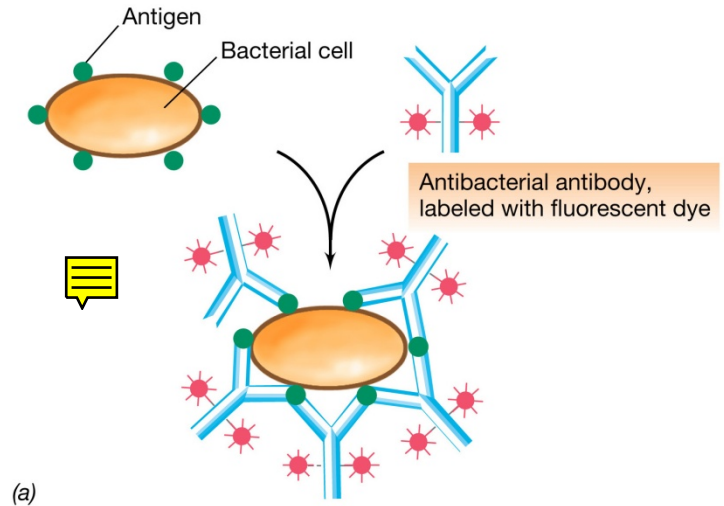


INMUNOFLUORESCENCIA

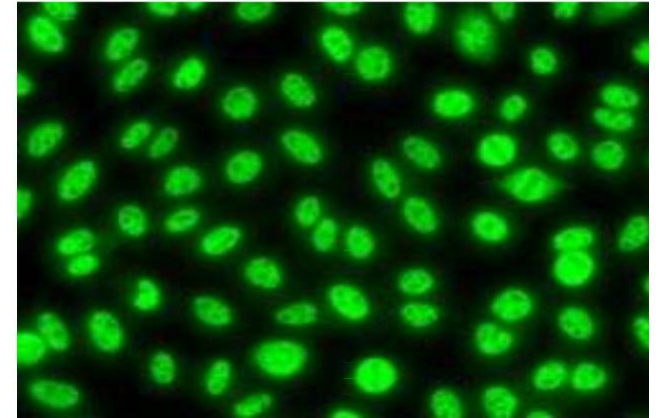
- Detecta **microorganismos**
- Requiere de microscopio de fluorescencia

■ Procedimiento

1. Se utilizan fluorocromos (colorantes fluorescentes) como la **rodamina B** y el **isotiocinato de fluoresceína** (FITC) unidos a anticuerpos.
2. Se fija en un porta la muestra con el microorganismo de interés.
3. Se trata con anticuerpo marcado con el fluorocromo
4. Se lava el anticuerpo no unido
5. Se detecta la presencia del microorganismo llevando la muestra al microscopio de fluorescencia.



INMUNOFLUORESCENCIA



CAPTURA INMUNOMAGÉNTICA

■ Concentra microorganismos

■ Procedimiento

1. Se utilizan **bolas de magnetita recubiertas de anticuerpos** frente a un microorganismo diana.
2. Se ponen en contacto las bolas de magnetita y anticuerpos con la muestra. Si está presente el microorganismo diana en la muestra se produce la unión antígeno (microorganismo)-anticuerpo-magnetita.
3. Se aplica un imán para separar las bolas de magnetita del resto. Luego se separan los microorganismos del complejo anticuerpo – magnetita y se detecta su presencia por cualquier método de identificación.

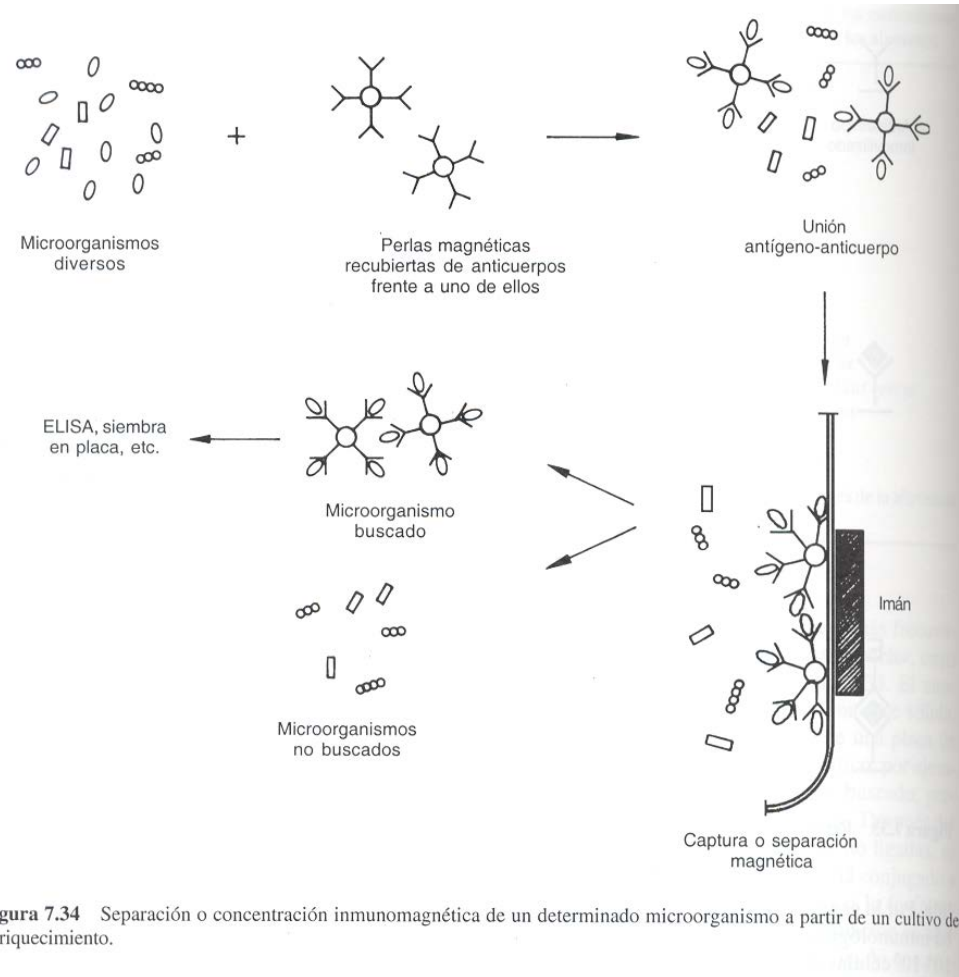


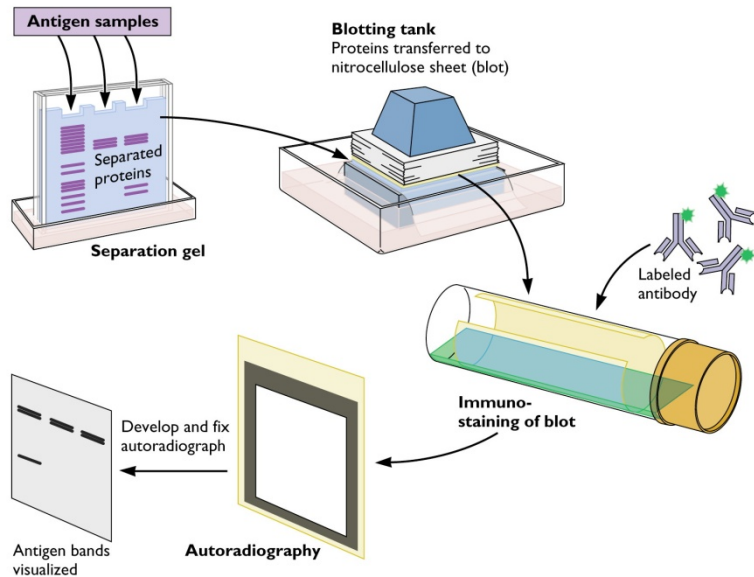
Figura 7.34 Separación o concentración inmunomagnética de un determinado microorganismo a partir de un cultivo de enriquecimiento.

INMUNOBLOT (WESTERN BLOT)

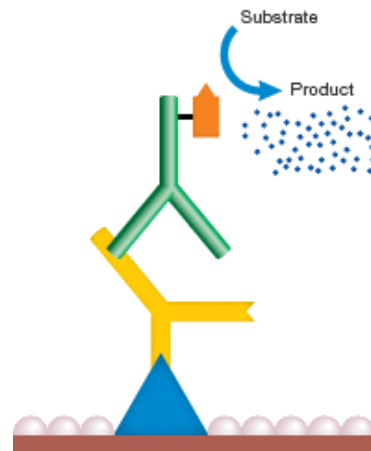
- Detecta **proteínas** específicas de microorganismos y **toxinas** microbianas

- Procedimiento

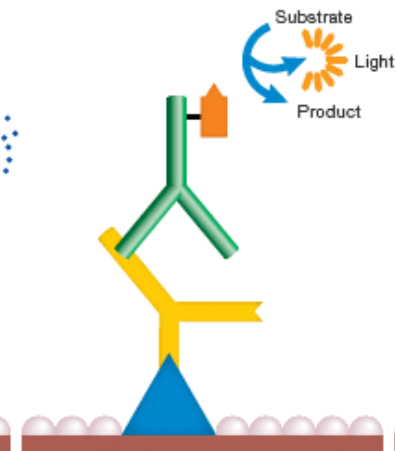
1. Se realiza una electroforesis en **gel de poliacrilamida** para separar las proteínas (antígenos) presentes en la muestra.
2. Se transfieren las proteínas del gel a membrana (nitrocelulosa o nylon) y se añade a la membrana el anticuerpo específico frente a la proteína diana marcado (radiactividad, fluorescencia, quimioluminiscencia o enzimas).
3. La unión antígeno-anticuerpo se detecta por exposición de la membrana a películas de rayos X (marcaje radiactivo); por la aparición fluorescencia (marcaje fluorescente), luz (marcaje luminiscente) o de mancha coloreada tras adición del sustrato (marcaje enzimático)



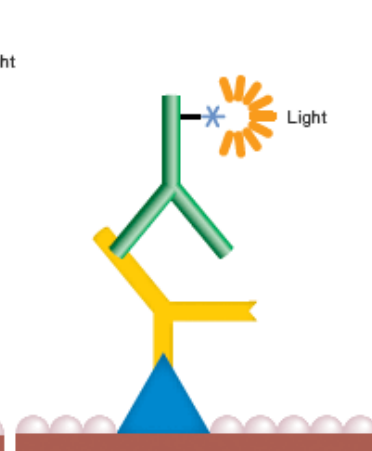
A. Colorimetric



B. Chemiluminescence



C. Fluorescence

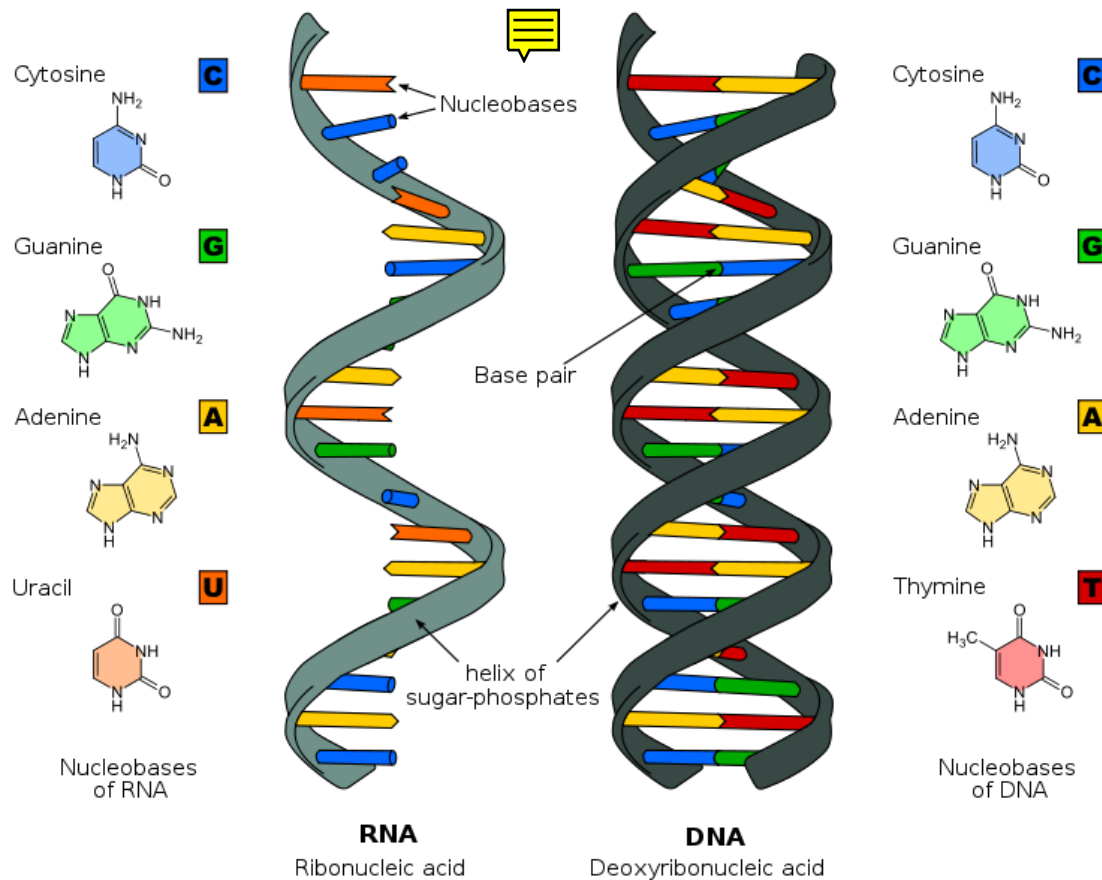


MÉTODOS GENÉTICOS

Fundamento: detectan secuencia genéticas específicas de ácidos nucleicos. 

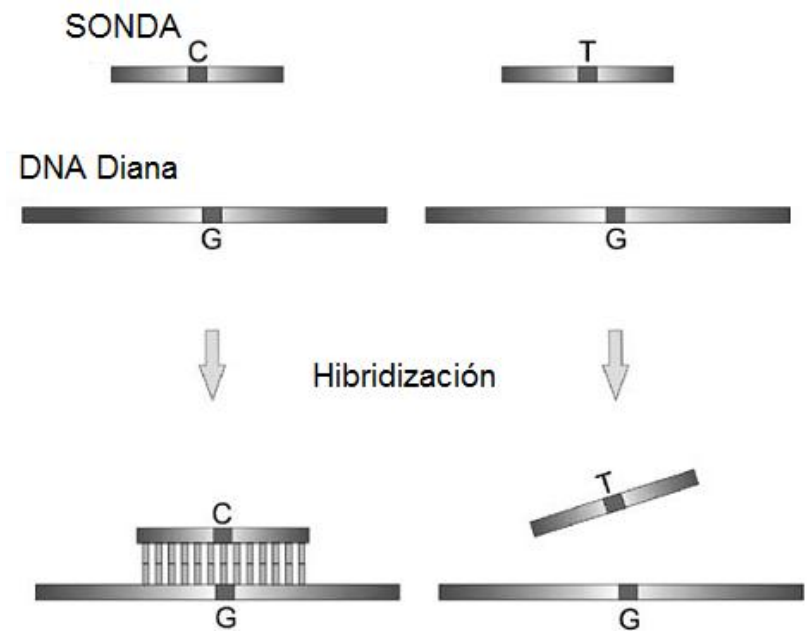
Características:

- Ventajas: identifican microorganismos de forma rápida y fiable
- Inconveniente: No distingue entre microorganismos vivos o muertos



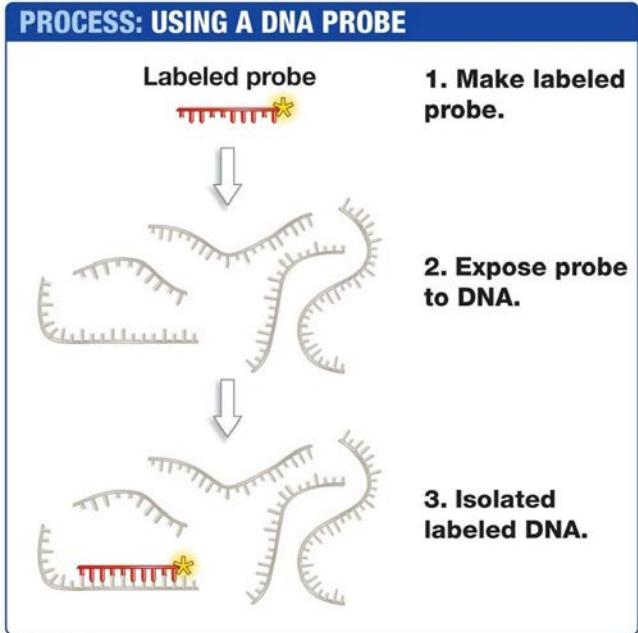
SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

- Detecta la presencia de secuencias específicas de ADN mediante el empleo de una **sonda de ADN**.
- Una sonda de ADN consiste en una **cadena monocatenaria de ADN** con una secuencia que se encuentra únicamente en un gen de interés (suelen tener entre 100 bases y varias kilobases).
- Si un microorganismo en la muestra contiene secuencias de ADN o ARN complementarias a la sonda, la sonda hibridará con la secuencia monocatenaria complementaria para formar una molécula bicatenaria.
- La reacción se detecta porque la sonda se marca con una molécula indicadora (reporter): radioisótopo, enzima o un compuesto fluorescente.
- Dependiendo del reporter, la identificación puede hacerse con cantidades tan pequeñas como 0,25 µg de ADN por muestra

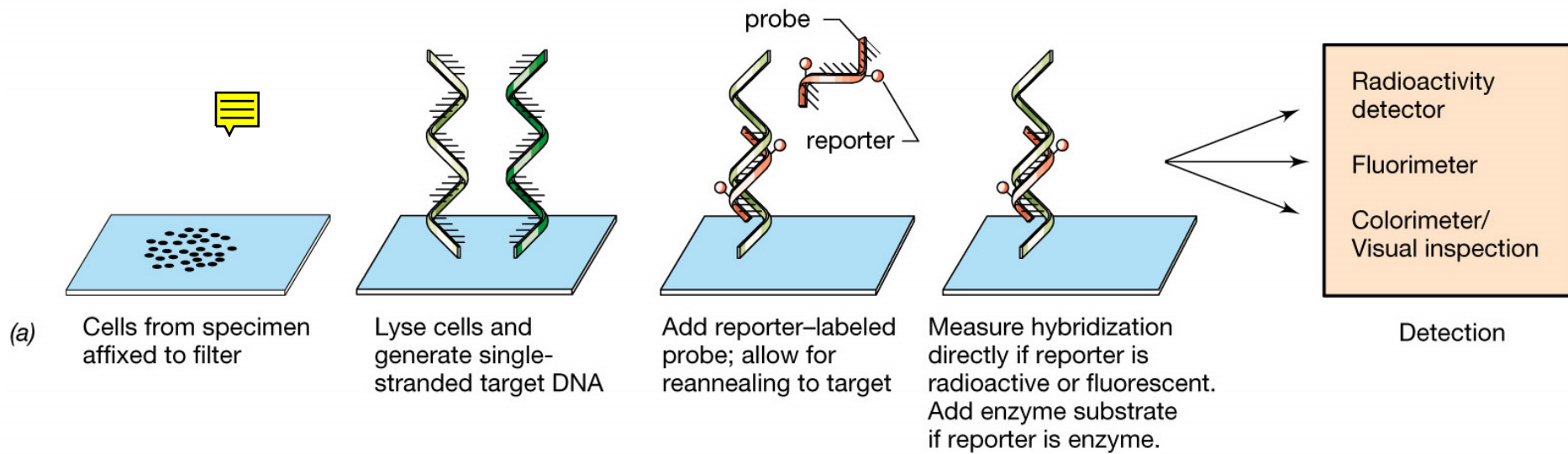


Hibridización

No hibridización



SONDAS DE ADN PARA HIBRIDACIÓN DIRECTA DE COLONIAS



1. Se transfiere mediante impresión las colonias de la superficie de una placa a una membrana de nylon o de nitrocelulosa.
2. La membrana se trata con álcali (NaOH) para que se rompan las células y se libere el ADN diana en forma monocatenaria. Se aplica calor o luz u.v para fijar el ADN monocatenario a la membrana.
3. Se añade la sonda marcada en condiciones de pH y temperatura que permitan la hibridación específica de la sonda con el ADN diana de secuencia complementaria.
4. Se elimina el exceso de sonda mediante lavado y la hibridación se detecta ya que la sonda está marcada
 - Permite procesar varios especímenes a la vez
 - No requiere equipamiento sofisticado
 - Tienen un límite de detección de 10^5 - 10^6 células.

AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICO: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) CONVENCIONAL

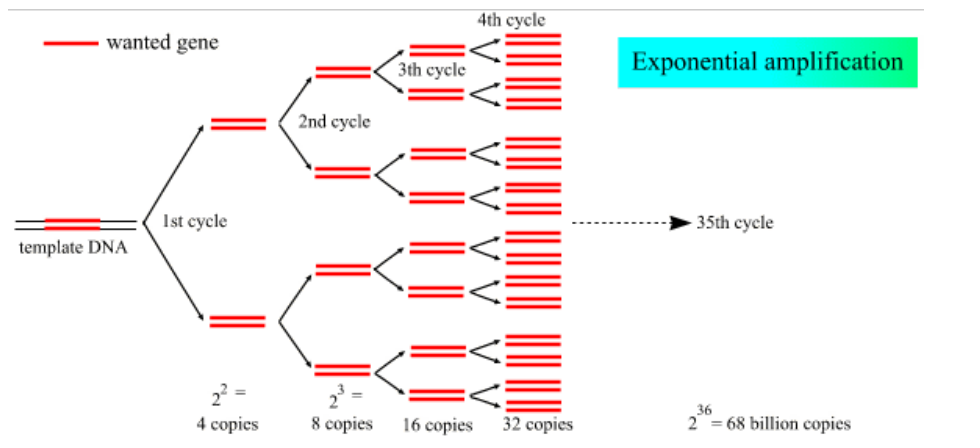
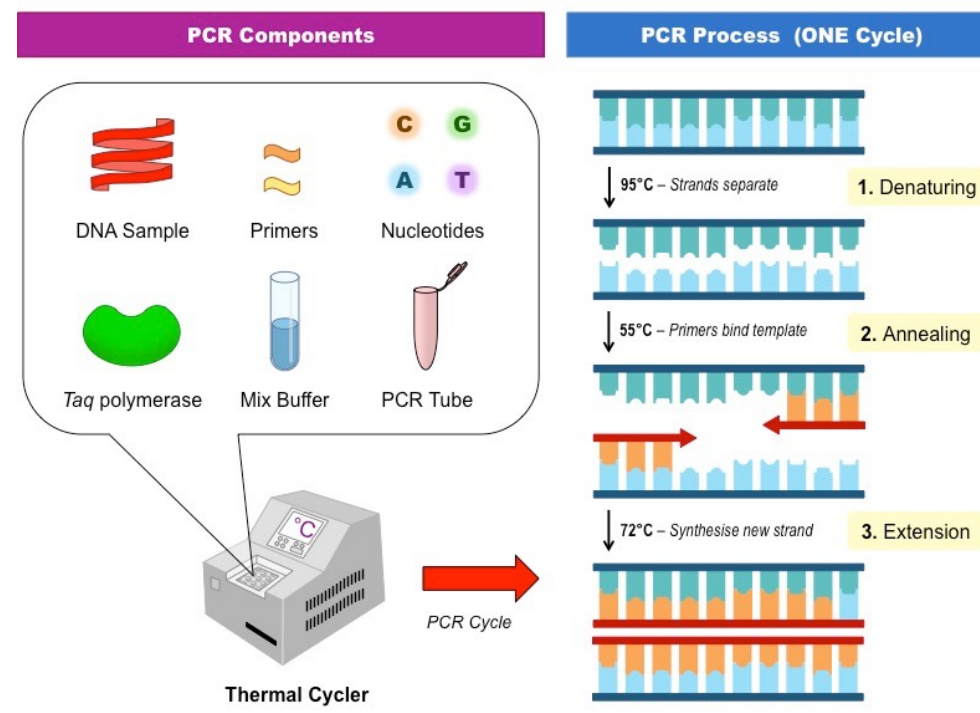
■ Amplifica el número de fragmentos de un ADN específico de una muestra

■ Procedimiento

- a) Se mezcla el ADN del microorganismo a investigar con la ADN-polimerasa termorresistente (Taq poimerasa), nucleótidos y los cebadores (oligonucleótidos que se unen de forma complementaria a una secuencia concreta del ADN diana)
- b) Se amplifica la secuencia buscada mediante la repetición del siguiente ciclo (unas 20-40 veces) en un termociclador:



- 1. Desnaturalización: El ADN diana es desnaturalizado a alta temperatura para liberar las dos cadenas complementarias
- 2. Hibridación o anillado con las cebadores específicos
- 3. Extensión o elongación del cebador por la Taq polimerasa utilizando los nucleótidos de la solución



AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PCR CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR)

- Amplifica ARN y sirve para detectar la presencia de virus de ARN y RNAm de bacterias y protozoos

■ Procedimiento

1. A partir del ARN, la transcriptasa inversa de un retrovirus sintetiza la cadena complementaria de ADN (cADN) usando un cebador para la reacción.
2. Se aplica calor para desnaturalizar la molécula híbrida ARN-cADN y destruir la **transcriptasa inversa**.
3. Utilizando cebadores específicos y la Taq polimerasa se sintetiza la cadena complementaria del cADN
4. La doble cadena de ADN sirve ahora como molde para la PCR convencional.

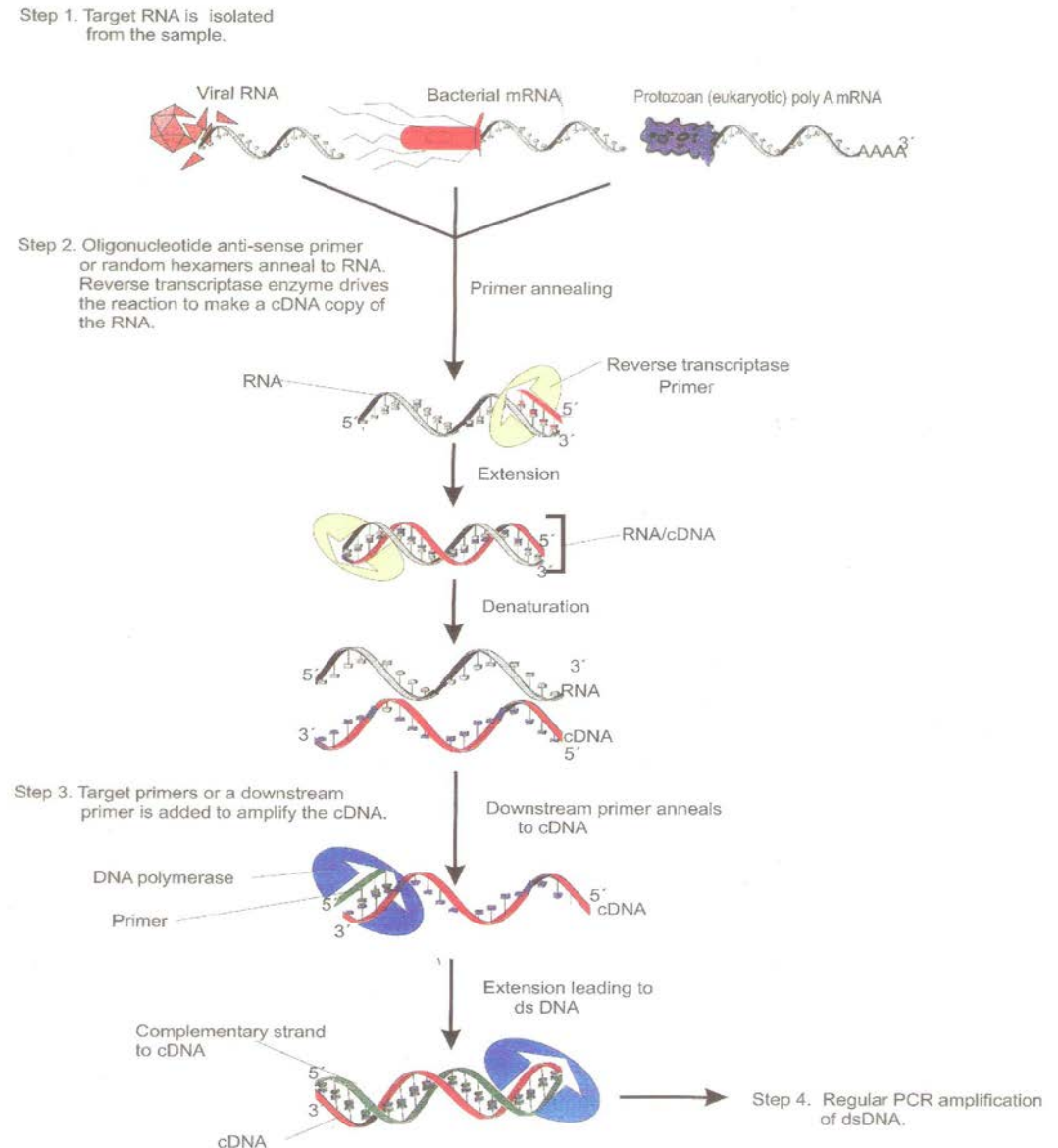
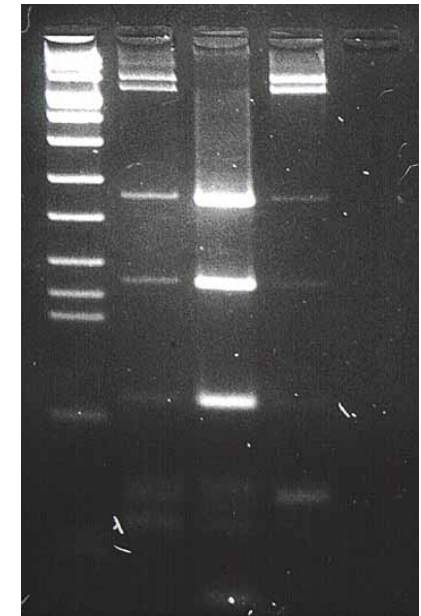
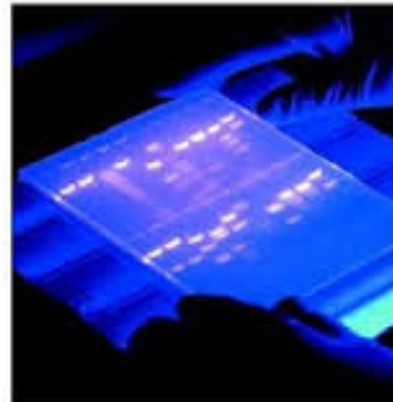
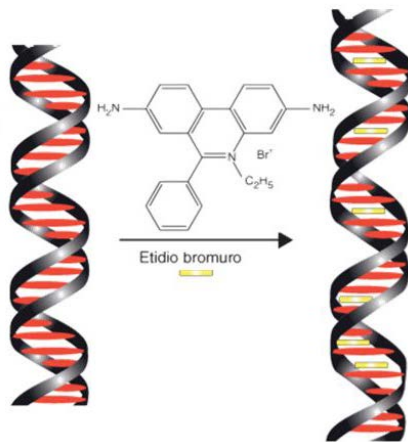
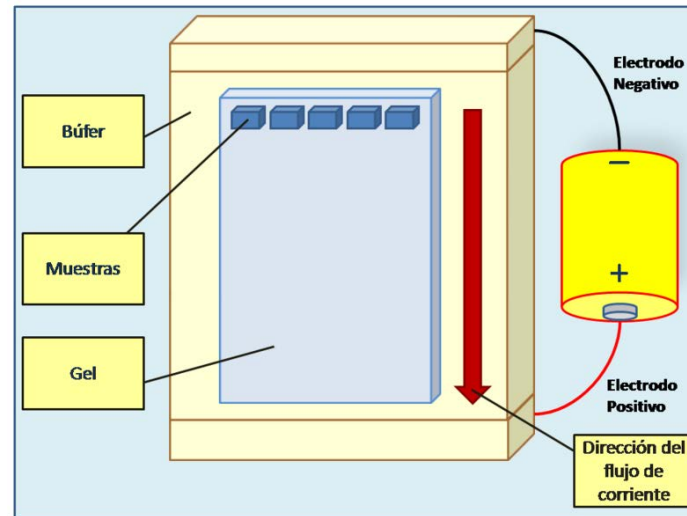


FIGURE 13.11 RT-PCR amplification of RNA. RNA is reverse transcribed to synthesize cDNA by random hexamers or a specific antisense primer. PCR can then be performed on the cDNA template.

DETECCIÓN DEL ADN AMPLIFICADO: EN LA PCR CONVENCIONAL se detecta el fragmento de ADN amplificado mediante **electroforesis en gel de agarosa** teñido con bromuro de etidio (bajo luz u.v.)

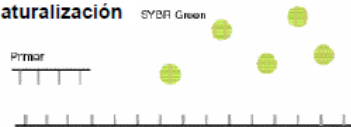


PCR A TIEMPO REAL O PCR CUANTITATIVA

- Detecta la acumulación de amplicón o producto durante la reacción.
- La detección se realiza por medio de la fluorescencia
 - El producto de PCR es marcado con un fluorocromo reporter
 - La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto
 - Se cuantifica la cantidad de fluorescencia en cada ciclo

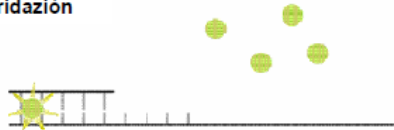


Desnaturalización



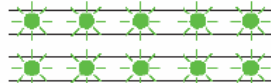
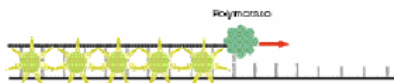
Unbound SYBR Green I emits very little fluorescence.

Hibridación



Fluorescent signal significantly increases as SYBR Green I intercalates the double-stranded DNA.

Polimerización



La fluorescencia de SYBR Green es proporcional a la cantidad de producto



OTROS MÉTODOS RÁPIDOS

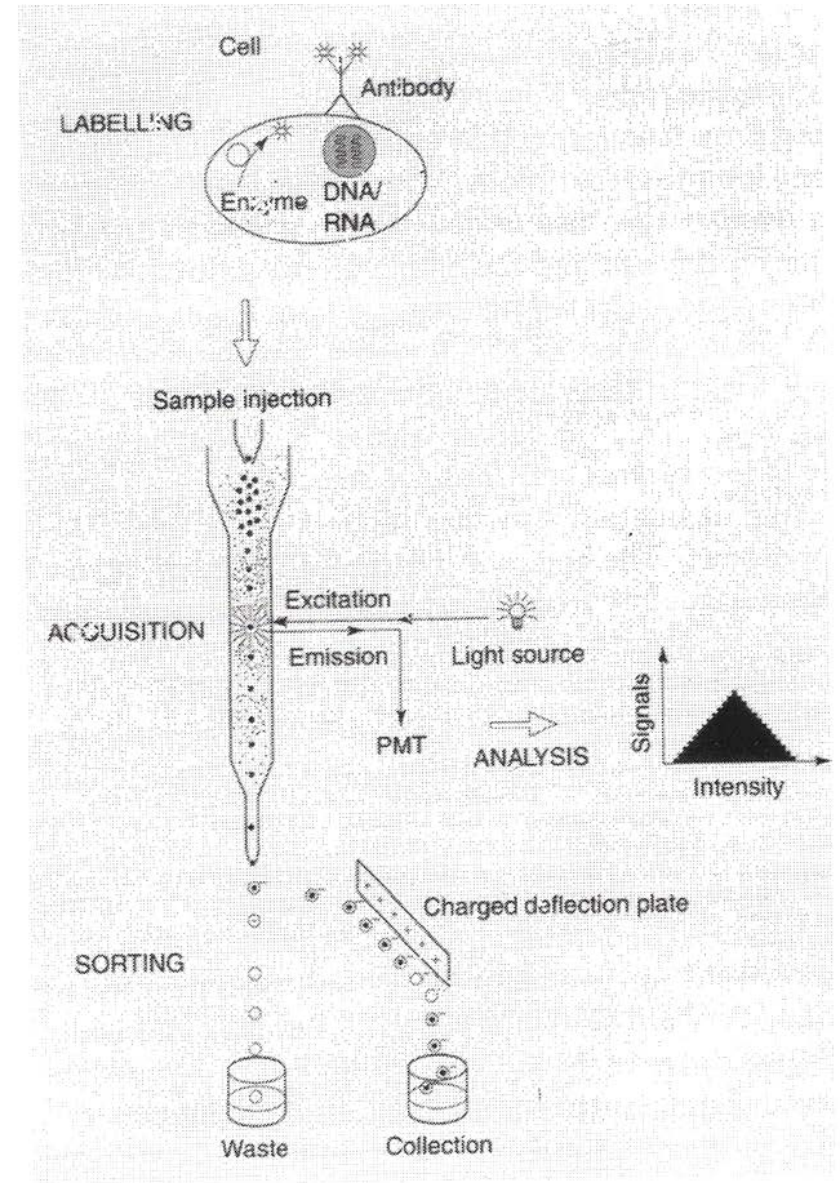
CITOMETRÍA DE FLUJO

Características:

- Permite identificar células y contarlas

■ Procedimiento

1. Las células de la muestra se marcan con un fluorocromo (inespecífico o específico) y se resuspenden en un fluido transportador.
2. Las células marcadas pasan una a una por la unidad fotoeléctrica (emite luz y capta fluorescencia emitida) y abandonan la cámara en forma de gotas.
3. Se puede aplicar un voltaje y mediante un campo electrostático recolectar las células de interés



MÉTODOS IMPEDIMÉTRICOS

Características:

- Detectan cambios en la conductividad eléctrica debido al metabolismo microbiano.

■ Procedimiento

1. Se inocula la muestra en un medio de cultivo y se introduce en el aparato.
2. Durante el crecimiento microbiano se producen cambios en la conductividad del medio que son detectados por los electrodos y analizados por un ordenador.

El límite de detección : 10^6 - 10^7 cel/ml.

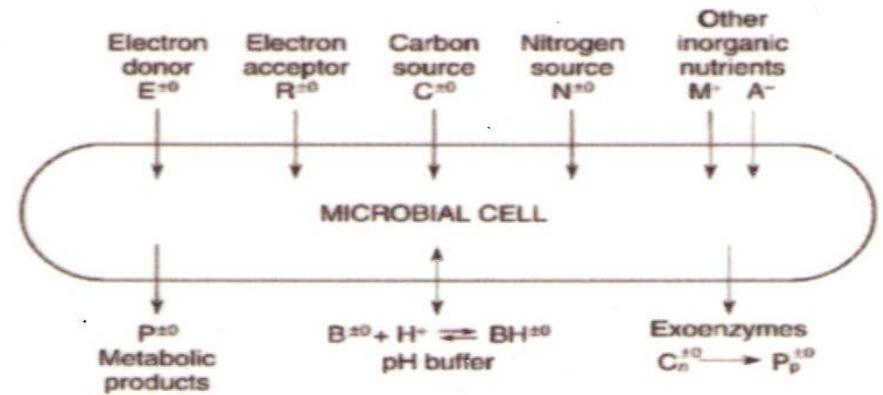
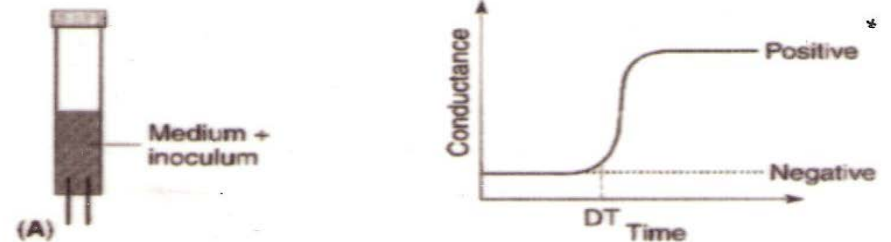


Figure 3 Interactions of a microbial cell with its external environment. $E^{\pm 0}$, $R^{\pm 0}$, etc. represent compounds with net positive, negative or zero charge. From Owens (1985).

DIRECT TECHNIQUE



BIOLUMINISCENCIA DE ATP

Características:

- detecta la **cantidad de ATP** presente en una muestra a través de la quimioluminiscencia
- emplea el sistema **luciferasa/ luciferina**

■ Procedimiento

1. Se concentran las células microbianas presentes en la muestra.
2. Se destruye o elimina cualquier ATP intrínseco de la muestra animal o vegetal.
3. Se extrae el ATP bacteriano y se añade el sistema luciferasa/luciferina.
4. Se introduce en el luminómetro y se mide la cantidad de luz emitida que es proporcional a la cantidad de ATP bacteriano.

Límite detección: 10^3 - 10^5 bacterias/ml ó g



Bioluminiscencia de ATP aplicada a superficie

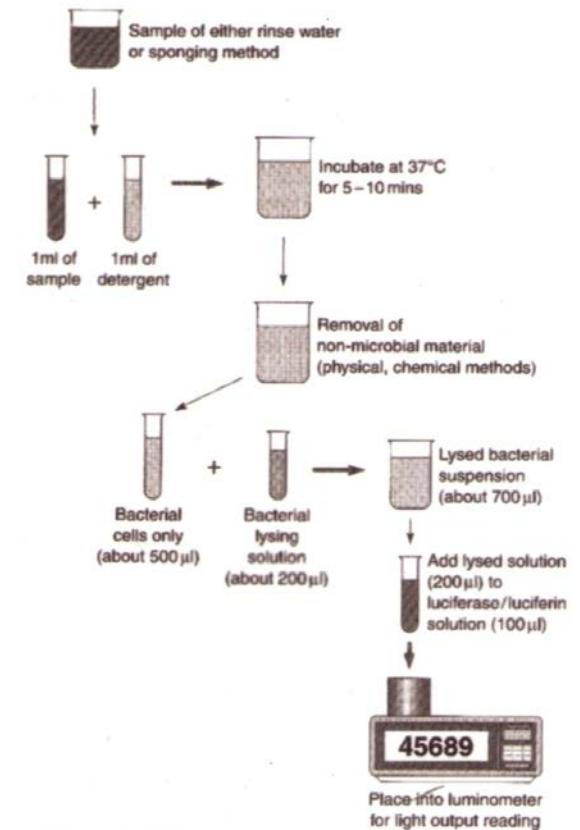
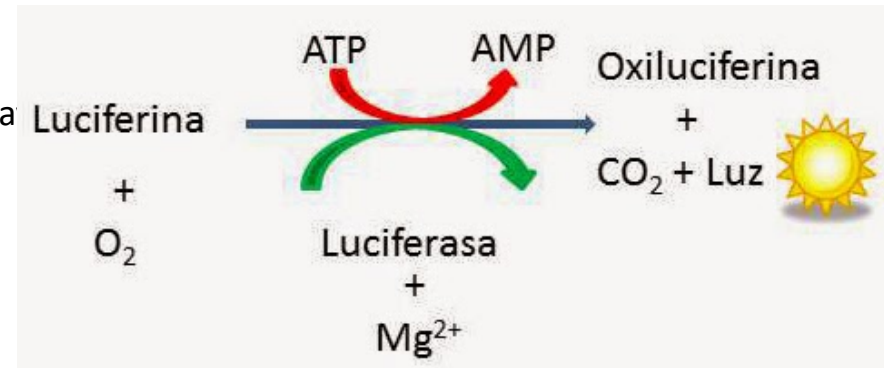


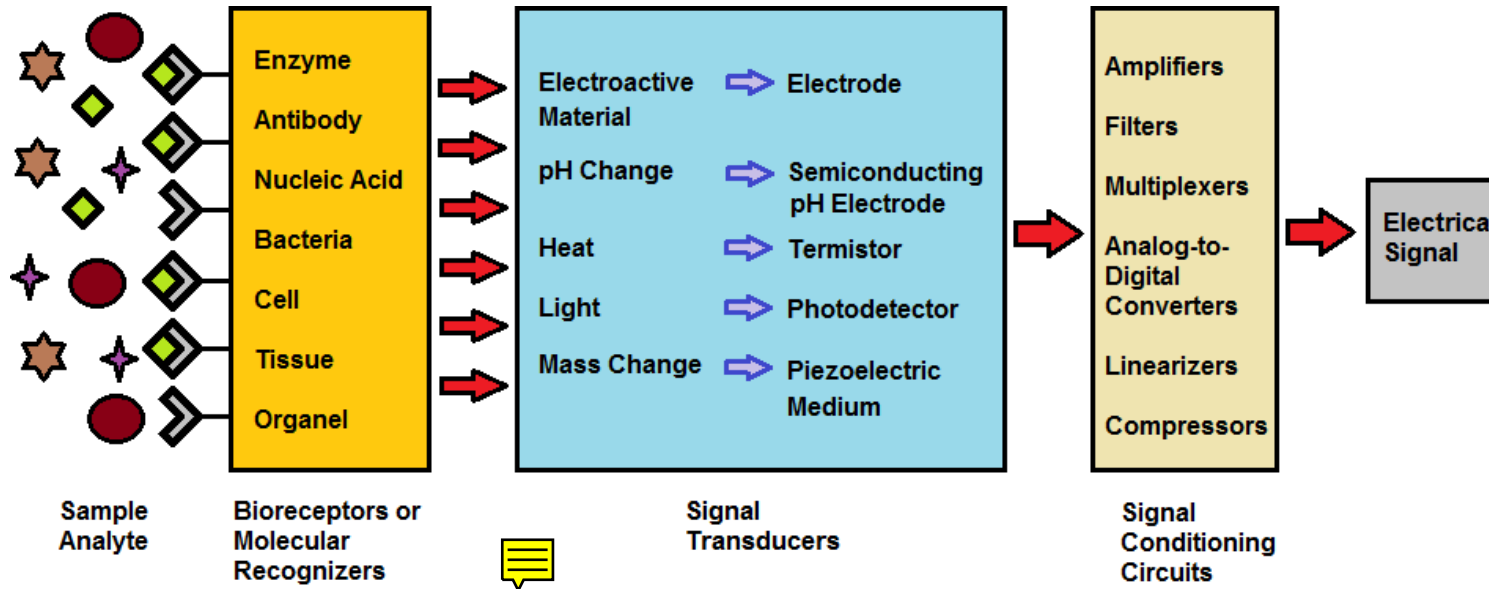
Figure 4 A typical ATP bioluminescence assay for food products.

BIOSENSORES

Características:

- Dispositivo compacto de análisis que **convierte una respuesta biológica en una señal eléctrica**. Está compuesto por dos elementos :
 - Receptor biológico: Detecta específicamente un microorganismo o una sustancia (analito)
 - Transductor: Traduce la reacción de reconocimiento del receptor en una señal cuantificable

- Son sensibles y selectivos
- Son muy rápidos
- Permiten la miniaturización y automatización



Sistema de transducción

Elemento de reconocimiento

Microorganismo

Electroquímico

Anticuerpos

S. typhimurium, *E. coli* 0157:H7

Bioluminiscencia

Campylobacter, *S. aureus*

FIA (Fluorescent immunoassays)

Anticuerpos

Mycobacterium avium, *M. paratuberculosis*,
Salmonella, *Listeria*

Fibra óptica

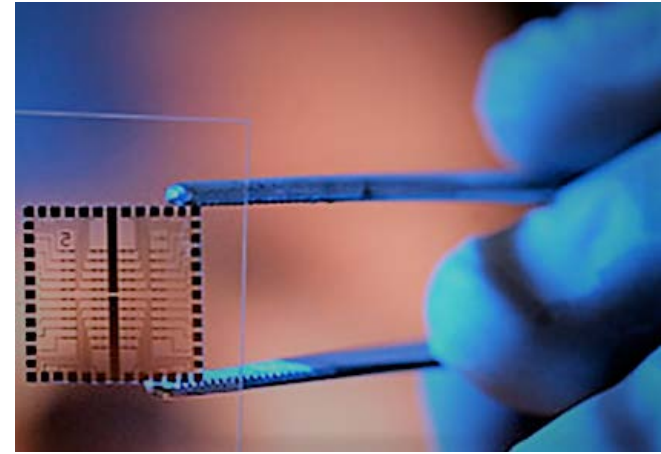
Anticuerpos

S. typhimurium, *Yersinia*, *V. cholerae*, *E. coli*

E. coli 0157:H7, *S. aureus*

BIOCHIPS O MICROARRAYS

- Dispositivo de análisis constituidos por un soporte (vidrio, plástico e incluso de silicio) sobre el que se sitúa el material biológico (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc.) formando una matriz ordenada, de manera que se conoce que es lo que se ha depositado en cada punto de la matriz, permitiendo el análisis, la identificación y su posterior interpretación.



- Propiedades
 - Obtienen información masiva de información analítica en un tiempo reducido y al menor coste posible

Chips de ADN

- Permiten **analizar miles de genes simultáneamente**
- Es posible el análisis con equipamiento portátil para medidas de campo
- Procedimiento
 1. Se inmovilizan sondas de ADN de secuencias diferentes sobre una superficie pequeña (1-2 cm²)
 2. Se marca el ADN de la muestra (analito) usualmente con molécula fluorescente y se pone en contacto con el chip
 3. En los distintos sitios de la superficie donde las bases del DNA analito encuentren su contraparte en las distintas sondas, habrá hibridación
 4. El chip es luego escaneado y la imagen obtenida es interpretada

Fluorescence-Detection DNA Chip

The four bases A, T, G, and C bind A to T or G to C. A target DNA sequence is analyzed by checking which bases the target DNA bases bind.

