

COMUNICACIÓN CORTA

Preparación semi-noenzimática del ADN de *Streptococcus pyogenes* y separación de los macrofragmentos de restricción con *SmaI* mediante Electroforesis de Campos Pulsantes en minigeles

Yaumara López-Carballo, Yainelis Garrido Nicot, Esperanza Niubó, Nelson Diaz, Ana M. Riverón y Lilia López-Canovas.

Departamento de Biología Molecular, Centro de Neurociencias de Cuba, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: llc@cneuro.edu.cu

Recibido: 26 de enero de 2008.

Aceptado: 2 de septiembre de 2008.

Palabras clave: Electroforesis de Campos pulsantes en minigeles, *Streptococcus pyogenes*, ADN intacto e inmovilizado, tipificación molecular.
Key words: miniPFGE, *Streptococcus pyogenes*, immobilized intact DNA, molecular subtyping.

Los métodos de subtipación molecular de microorganismos son la base de los programas de vigilancia epidemiológica actuales.¹ Ellos permiten identificar los subtipos moleculares de los microorganismos patógenos, lo cual facilita su control y la toma de medidas para evitar su diseminación. La Electroforesis de Campos Pulsantes (ECP) constituye el estándar de oro para la subtipación molecular bacteriana porque permite analizar el genoma completo de las bacterias en un único experimento.² Mediante la ECP es posible separar en forma de un patrón de bandas los macrofragmentos de restricción del ADN genómico de las bacterias. La comparación de los patrones de bandas de diferentes aislados de una misma especie permite determinar las diferencias genéticas entre ellos y clasificarlos en subtipos.³ *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico del grupo A (BHGA) es un patógeno humano de interés epidemiológico que es tipificado comúnmente por ECP.⁴ Sin embargo, el requerimiento de disoluciones enzimáticas costosas para preparar ADN intacto e inmovilizado de este microorganismo, los tiempos prolongados de incubación en dichas disoluciones que son necesarios durante la preparación de las muestras de ADN (2 a 3 d) y los largos tiempos de electroforesis en los equipos de ECP convencionales (20 a 24 h)⁵ para resolver los fragmentos de ADN digerido con enzimas de restricción, constituyen limitaciones para que este procedimiento sea utilizado rutinariamente en los laboratorios de microbiología. El uso de la minicámara CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) del equipo Guefast-06 (Neuronic S.A.), el cual es una versión miniaturizada de los equipos de ECP en el que se pueden aplicar campos eléctricos elevados ha permitido reducir los tiempos de electroforesis⁶ y obtener en 5 h los cariotipos electroforéticos de

Entamoeba histolytica y *Saccharomyces cerevisiae*, así como los patrones electroforéticos de los macrofragmentos de restricción del ADN de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Aeromonas spp.*⁷⁻¹¹ Utilizando dicha minicámara CHEF se desarrolló un procedimiento que consume menor tiempo de corrida para separar los macrofragmentos de restricción del ADN de cepas de *Streptococcus pyogenes*. Se propone también un método semi-noenzimático en el que no se utilizan proteasas para preparar las muestras de ADN intacto e inmovilizado de dicho microorganismo.

Se inocularon $6 \cdot 10^{10}$ unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384 en 100 mL de medio caldo-cerebro-corazón y se cultivó durante 3 h con agitación de 180 r/min en zaranda provista de termostato a 37 °C. Las bacterias se colectaron por centrifugación, se decantó el sobrenadante y el sedimento se lavó con disolución de lavado No.1 del BacKit (Neuronic S.A.). El sedimento celular fue atemperado a 42 °C y se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión al 1,5 % en diferentes proporciones, de modo que las concentraciones finales fueran de 3, 2, ó $1 \cdot 10^{10}$ células/mL. Dichas mezclas se vertieron con la ayuda del set de accesorios del Guefast-06 (Neuronic S.A.) en moldes que forman minibloques de 3 mm x 3 mm x 0,7 mm (largo x ancho x altura). Para lisar las células y desproteínizar las moléculas de ADN en las muestras controles se utilizaron las disoluciones enzimáticas descritas.¹² Dichas muestras controles se prepararon incubando los minibloques durante 16 h a 37 °C en disolución de lisis compuesta por: Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, pH-7,6, lisozima (Sigma) 1 mg/mL y mutanolisina (Sigma) 10 µg/mL. Posteriormente, los minibloques se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se incubaron durante 16 h

a 56 °C en la disolución de desproteización compuesta por EDTA 100 mM pH 9,5, sarcosil 1 % y 1 mg/mL de proteinasa K (Sigma). Seguidamente, los minibloques se sometieron a pasos secuenciales de lavados: dos veces con agua destilada estéril, seis veces con disolución de diálisis No. 6 del BacKit (Neuronic S.A.), durante 15 min cada vez a 45 °C; tres veces con disolución de diálisis No. 7 del BacKit (Neuronic S.A.) y una vez con la disolución reguladora de la enzima *SmaI* recomendado por el fabricante (Sigma), durante 10 min cada vez a 4 °C. Las moléculas de ADN se digirieron por 16 h con 10 U (unidades) de enzima de restricción *SmaI* en 100 µL de la disolución reguladora recomendada por el fabricante (Sigma). Los minibloques que no fueron utilizados se conservaron en disolución No. 6 del BacKit a 4 °C. Los fragmentos de restricción se resolvieron en un gel de agarosa 1,5 %, disolución reguladora TBE 0,5X (Tris 44,5 mmol/L, ácido bórico 44,5 mmol/L y EDTA 1 mmol/L pH 8,3) a 20 °C y aplicando en la minicámara CHEF del Guefast-06 (Neuronic S.A.) 10 V/cm y una rampa de tiempos de pulsos discontinua con una duración total de 5,23 h y compuesta por los tiempos y cantidad de pulsos siguientes: 25 s y 35; 20 s y 45; 15 s y 60; 10 s y 200; 5 s y 900; 3 s y 80.

Se determinó que la concentración celular que rendía cantidades de ADN adecuadas para visualizar patrones de bandas nítidos y bien resueltos mediante transiluminación con luz ultravioleta de los geles era $2 \cdot 10^{10}$ células/mL (Fig. 1, carrilera A). Los patrones de bandas de los macrofragmentos de restricción con *SmaI* del ADN de *S. pyogenes* obtenidos en el Guefast-06 mostraron una resolución semejante a la descrita en la literatura, pero se obtuvieron en 5,23 h a diferencia de las 20 h reportadas en los equipos de ECP convencionales.¹³ Este resultado evidencia que el Guefast-06 es una alternativa rápida para obtener los pulsotipos de *S. pyogenes* y que las condiciones electroforéticas propuestas en este trabajo pueden ser útiles para la subtipación de cepas de este microorganismo. Para desarrollar la variante de tratamiento semi-noenzimático se inmovilizaron $2 \cdot 10^{10}$ células de *S. pyogenes* ATCC 12384/mL de agarosa en las condiciones descritas y los minibloques se incubaron alternativamente con una disolución que contenía una sola enzima de lisis (lisozima o mutanolisina) o en combinaciones, manteniendo las concentraciones utilizadas para preparar los minibloques controles. La desproteización se ensayó por la vía enzimática, tal como se describió anteriormente con los minibloques controles y se comparó con la obtenida por una vía química (no enzimática) empleando la disolución de tratamiento No. 4 del BacKit (Neuronic S.A.). Se probaron todas las variantes de lisis con todas las de desproteización sin alterar los pasos de lavado descritos para las muestras controles, procediendo posteriormente a la digestión de las moléculas de ADN con 10 U de la enzima *SmaI* por minibloque. La corrida electroforética se realizó en la minicámara CHEF en las condiciones descritas anteriormente.

Los macrofragmentos de restricción con *SmaI* del ADN genómico de *Streptococcus pyogenes*, preparado con las diferentes variantes de tratamiento se resolvió siempre en 10 bandas que contenían moléculas con tamaños entre 400 – 20 kb (Fig 1). La determinación *in silico* de los sitios de restricción en la secuencia de bases del ADN de una cepa de *S. pyogenes* del mismo serotipo, M3,¹⁴ que la utilizada en este trabajo generó fragmentos con tamaños que coincidían con los obtenidos en el patrón experimental. La intensidad de las bandas difirió entre los patrones mostrados en las

diferentes carrileras. Las bandas en los patrones en las carrileras A, D y F fueron más intensas con respecto a la de los patrones de las restantes carrileras B, C y E. Esta diferencia de intensidad debe estar relacionada con el empleo de dos enzimas líticas a la vez (carrilera A y D) aumentando la cantidad de ADN liberado, sin embargo, puede observarse que el empleo de una sola de ellas es suficiente para obtener patrones nítidos (carrileras B, C, E y F). El empleo de la proteinasa K que es un potente agente desproteizante también influye en la cantidad y calidad del ADN liberado, mientras más ADN liberado más intensidad de las bandas.

Las diferencias en la posición de las bandas en los diferentes patrones, debe estar relacionado con la cantidad de ADN liberado con los diferentes tratamientos, ya que todos los minibloques proceden de un mismo lote preparado de un único cultivo celular y a una concentración celular de $2 \cdot 10^{10}$ células/mL de agarosa en el minibloque. Las combinaciones de enzimas líticas y proteinasa K, como agente desproteizante, liberan mayor cantidad de ADN. No obstante, la sustitución de la proteinasa K por una disolución compuesta solamente por reactivos químicos (disolución No. 4 del Backit), liberó la cantidad suficiente de ADN para formar patrones de bandas visibles después de la tinción con bromuro de etidio (carrileras D-F).

Esta variante de tratamiento (semi-noenzimática) evitó el empleo de un reactivo costoso sin afectar el valor informativo de los patrones. Todas las variantes de tratamiento rindieron ADN de BHGA adecuado para subtiparlo por ECP. De las variantes empleadas, la combinación de lisis con lisozima (16 h) y desproteización

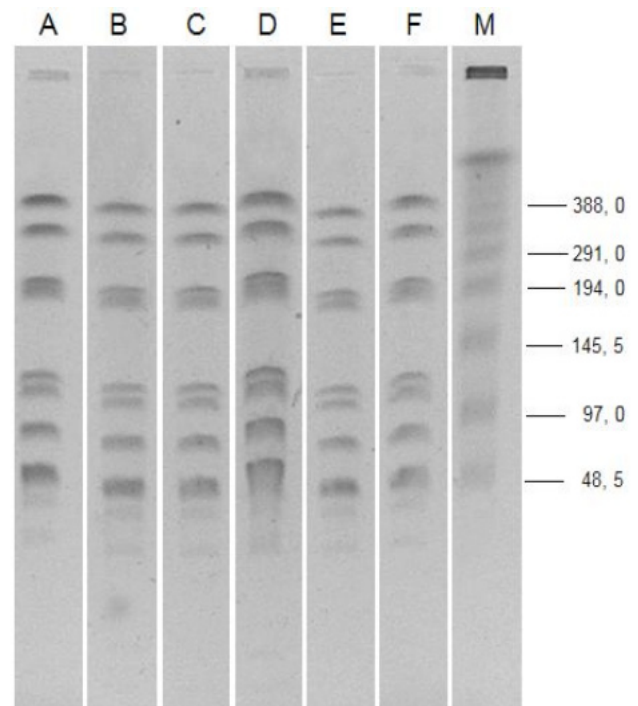


Fig. 1. Patrón de bandas electroforéticas en el Guefast-06 del ADN genómico de BHGA digerido con *SmaI*. Cada carrilera corresponde a una variante diferente de tratamiento de lisis: A, D: lisozima + mutanolisina, B, E: lisozima, C, F: mutanolisina; y de tratamiento de desproteización: A, B, F: proteinasa K; D, E, C: disolución No. 4 del Backit. M: concatámeros de ADN de fago Lambda. Condiciones de separación: minicámara CHEF del Guefast-06, agarosa 1,5 %, TBE 0,5X, 20 °C, 10 V/cm, tiempos de rampas de 25-3 s durante 5,23 h.

con disolución No.4 del BacKit (16 h) resultó el procedimiento mas útil por su menor costo para obtener los patrones de bandas de ADN de *Streptococcus pyogenes* digerido con *Sma* I. Este procedimiento de preparación de las muestras de ADN unido a la rapidez de obtención de los patrones de bandas en el Guefast-06 convierte al método propuesto en una alternativa económica para la subtipación de cepas de BHGA durante la realización de estudios epidemiológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J *et al.* Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *spa* Typing, and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(7):3095-3100.
2. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectivas. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2003;7(1).
3. Lin K, Yee G, Wing L, Chin L and Fong Y. Macrorestriction analysis of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) isolates from Malaysia. *Journal of Medical Microbiology*. 2004;53:991-997.
4. Bingen E, Denamur E and Lambert-Zechovsky N. Mother-to-infant vertical transmission and cross-colonization of *Streptococcus pyogenes* confirmed by DNA restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis*. 1992;165:147-150.
5. Meredith E, Warner JE, Lambert KG, Cole SE, Onderdonk AB and McAdam AJ. Detection of Multiple Macrolide- and Lincosamide-Resistant Strains of *Streptococcus pyogenes* from Patients in the Boston Area. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;April:1559-1563.
6. Riverón AM, López-Cánovas L, Herrera JA, Baez-Camargo M, Higginson D and Orozco E. Fast pulsed field minigel electrophoresis of large DNA molecules. *Analytical Letters*. 1995;28(11):1973-1991.
7. Riverón AM, López-Cánovas L, Báez-Camargo M, Flores E, Pérez-Pérez G, Luna-Arias J.P *et al.* Circular and linear DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. *Eur Biophys J*. 2000;29:48-56.
8. Riverón AM, López-Cánovas L, Higginson D and Orozco E. Rapid Non-Enzymatic DNA Deproteinization in Agarose Miniplugs. *Analytical Letters*. 1996;29:2079-2084.
9. López-Cánovas L, Sánchez-Alonso A, Higginson D, Concepcion A, Clark H and Riverón A M. Nonenzymatic protocol for *Pseudomonas aeruginosa* DNA preparation and rapid subtyping by mini pulsed-field gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2003;24:1152-1158.
10. Clark HT, Dondérez A, Sánchez A, Ariosa MC, Rodríguez E and Pérez MC. Electroforesis de campos pulsantes para la diferenciación genotípica de dos aislados de *Escherichia coli* fenotípicamente indistinguibles. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2002;33(2):67-69.
11. López-Cánovas L, Bravo L, Herrera J, Riverón AM, Javer E and Sanchez A. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006;27:2857-2864.
12. Stanley J, Linton D, Desai M, Efstratiou A and George R. Molecular subtyping of prevalent M serotypes of *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(11):2850-2855.
13. Shun C, Ling T, Hui T, Li H, Cheng J, and Chin C. Epidemiology and Molecular Characterization of *Streptococcus pyogenes* Recovered from Scarlet Fever Patients in Central Taiwan from 1996 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(9):3998-4006.
14. Ferretti JJ, McShan WM, Adjić D, Savic D, Savic G, Lyon K *et al.* Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(8):4658-4663.