

Fundamento, tipos y aplicaciones de los *arrays* de ADN en la microbiología médica

Antonio Doménech-Sánchez^a y Jordi Vila^b

^aUnidad de Investigación. Hospital Universitario Son Dureta. Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS). Palma de Mallorca. España. ^bServicio de Microbiología. Hospital Clínic. Barcelona. España.

Los *chips* o *arrays* de ADN son una serie de sondas de ADN unidas a un soporte sólido en una disposición regular y prefijada. El ácido nucleico diana que será detectado puede ser ADN o ARN y previamente a la hibridación debe ser marcado con una sustancia fluorescente o radiactiva. La principal ventaja con respecto a las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa es que pueden detectarse en un único procesamiento miles de genes. Hasta la actualidad la aplicación de los *arrays* de ADN en el campo de la microbiología clínica es escasa.

Dentro de las aplicaciones específicas cabe destacar:

a) Investigación de la patogenia bacteriana; b) análisis de la evolución bacteriana y epidemiología; c) estudio de los mecanismos de acción y de resistencia de los antibióticos, y d) diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas.

Si bien esta metodología se encuentra todavía en fase embrionaria por lo que respecta a su aplicación en el campo del diagnóstico microbiológico, presenta una serie de ventajas que la hacen muy atractiva y en un futuro pueda ser una técnica muy válida para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Palabras clave: *Arrays* de ADN. *Microarrays* de ADN. *Microchips* de ADN. Aplicaciones. Diagnóstico molecular.

Basis, types and application of DNA arrays in clinical microbiology

The DNA microarrays or microchips are sets of DNA probes bound to a solid support in a prefixed and regular disposition. The target nucleic acid that can be detected is either DNA or RNA, which is previously labeled with a fluorochrome or a radioactive compound. The main advantage with respect to other molecular biological tools, such as polymerase chain reaction, is that thousands of genes can be detected in a single procedure. The application of the DNA arrays in the field of clinical microbiology is so

far scarce. Among the specific applications we can point out: 1. Investigation of bacterial pathogenesis; 2. Analysis of bacterial evolution and molecular epidemiology; 3. Study of the mechanisms of action and resistance to antimicrobial agents and 4. Microbiological diagnostic of the infectious diseases. This methodology is still in an embryonic phase with respect to its application in clinical microbiology. However, it presents a series of advantages that make it very attractive and in the future it may become a valuable tool for the diagnosis of infectious diseases.

Key words: DNA arrays. DNA microarrays. DNA microchips. Molecular diagnosis.

Introducción

La investigación microbiológica a nivel molecular está viviendo un cambio espectacular en los últimos años. En apenas una década se ha pasado de trabajos basados en el estudio de uno o unos pocos genes al análisis de los genomas en su totalidad. Gracias a los avances tecnológicos, la secuenciación de genomas es algo cada vez más frecuente, y desde que en 1995 se publicara el primer genoma completo de un ser vivo, *Haemophilus influenzae*¹, ya se han descrito unos 145 genomas completos (incluyendo los de 19 organismos eucariotas como el hombre o el ratón) y aproximadamente 600 están siendo secuenciados en la actualidad.

Asociada a esta explosión de datos y conocimientos ha aparecido una nueva terminología como genómica, que hace referencia al estudio de genomas completos, ya sea de manera individual (tamaño, número de genes y posición en el genoma, agrupaciones génicas, etc.) o comparando distintos genomas; transcriptómica o genómica funcional, referido al estudio de los genes que se expresan en un momento determinado; y proteómica, relativo al estudio de las proteínas expresadas en una condición determinada y al cual no haremos referencia en esta revisión, en la que se presentan el fundamento y las variantes de los *microarrays* de ADN, así como sus aplicaciones en el campo de la microbiología médica.

Arrays de ADN

La aplicación más conocida y probablemente la que está generando más datos en estos momentos es la técnica de la hibridación mediante *arrays* de ADN. Buena prueba de ello es el importante aumento en el número de publicaciones

Correspondencia: Dr. A. Doménech-Sánchez.
Unidad de Investigación. Hospital Universitario Son Dureta.
Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS).
Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca. España.
Correo electrónico: adomenech@uib.es

basadas en esta técnica en los últimos años, en particular en el campo de la microbiología (fig. 1).

Un *array* es un conjunto de sondas moleculares fijadas de manera ordenada sobre un soporte sólido. Estas sondas pueden ser clones de ADN, productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o bien oligonucleótidos sintéticos. Además, debido a su creciente popularidad, el término *array* por extensión también hace referencia a la técnica que utiliza estos soportes (hibridación mediante *array*).

El desarrollo de esta técnica ha sido posible gracias a los avances en nuestro conocimiento de los genomas y a los avances tecnológicos. De hecho, la idea o el concepto básico es el mismo que el de las técnicas clásicas de *dot-blot*. La diferencia principal radica en la automatización del proceso, donde la nanotecnología ha permitido que los nuevos robots puedan procesar de manera simultánea decenas de miles de reacciones de PCR y depositar estas sondas moleculares en forma de microgotas en una superficie de uno o varios centímetros cuadrados.

La síntesis de los *arrays* supone la impresión y fijación de sondas de ADN sobre un soporte sólido con afinidad por el ADN. Estos soportes generalmente son membranas de nitrocelulosa o nailon, o bien portaobjetos recubiertos con residuos de polilisininas u otro compuesto capaz de unir ADN. En cuanto a las sondas, pueden ser clones de ADN procedentes de una genoteca, productos de PCR obtenidos a partir del genoma de interés o bien oligonucleótidos sintéticos (fig. 2).

La figura 3 muestra un esquema general de la técnica de hibridación mediante la utilización de *arrays*. Las muestras pueden ser ADN o ARN, según se trate de un análisis genómico (genotipificación) o bien un análisis de la expresión génica (genómica funcional). Una vez purificado el ácido nucleico se procede a su marcado, que puede ser radiactivo o fluorescente. Esta última es la más popular, no sólo por su menor peligrosidad sino porque además permite hibridar dos muestras simultáneamente si se utilizan dos fluorocromos distintos (fig. 4). En el caso del ADN, se fragmenta mediante sonicación o digestión enzimática parcial y a continuación se procede a su marcado mediante una polimerasa. En el caso del ARN el marcaje se lleva a cabo durante el proceso de transcripción inversa.

Una vez marcado el ADN (o ADNc) se procede a su hibridación con el *array* sintetizado previamente, uniéndose cada ADNc a la sonda correspondiente. A continuación se somete al *microarray* a una serie de lavados para eliminar el exceso de ADNc que ha hibridado inespecíficamente y se procede a la medición de la señal. En el caso de la radiactividad se utilizan principalmente sistemas de captación de imágenes radiactivas, ya que su superior dinamismo, sus tiempos de exposición más cortos y el hecho de obtener los resultados ya en formato digital los convierten en los métodos de elección frente a las clásicas películas de rayos X. Para las muestras marcadas fluorescentemente se utiliza un escáner provisto de un láser y una serie de filtros capaces de excitar los fluorocromos y captar la fluorescencia.

En cualquiera de los dos métodos se genera una imagen que se somete a un proceso de digitalización, normalización y cuantificación. Tras este tratamiento se obtiene una colección de datos con las intensidades correspondientes a cada gen incluido en el *array*. Finalmente se procede a

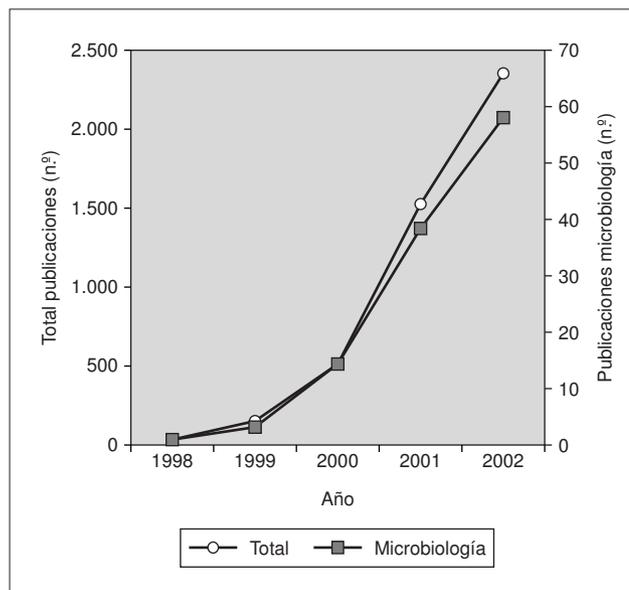


Figura 1. Número de publicaciones en las que se utilizan los *microarrays* de ADN en el campo de la microbiología frente al total de publicaciones en otros campos.

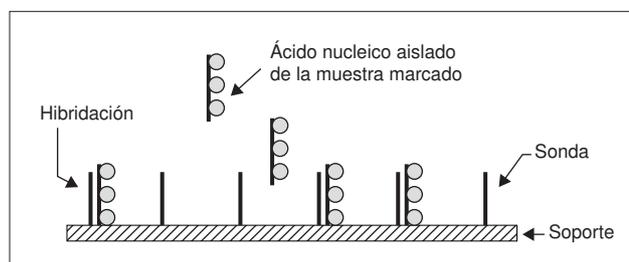


Figura 2. Fundamento de los *arrays* de ADN.

análisis de los datos, que en ocasiones se convierte en una tarea compleja, pues la ventaja de esta técnica es que permite obtener una enorme cantidad de información en un único experimento. Por ejemplo, si utilizamos un *microarray* (v. más adelante) con 10.000 sondas fijadas es posible incluir todos los genes de *Escherichia coli* K12 (casi 5.000) por duplicado, lo que supone que en un único experimento se obtienen 20.000 valores: dos valores de expresión en la muestra control y dos valores en la muestra problema para cada gen. Sin embargo, esta gran cantidad de información se convierte en un problema importante a la hora de analizar todos los datos manualmente. Precisamente este aspecto supone la necesidad de análisis de tipo estadístico para poder analizar los resultados. Por esta misma razón, la ayuda de los sistemas informáticos es clave para el análisis de todos los datos por un lado, y evitar la subjetividad inherente del propio investigador, por el otro. La aplicación de la estadística es especialmente importante cuando el investigador no conoce de antemano algunos genes cuya expresión varíe en el sistema analizado, es decir, controles que permitan determinar de manera objetiva cuál es el valor a partir del que se va a considerar que existe un cambio en la expresión de un gen. En esos casos, evitar la subjetividad a la hora de establecer este

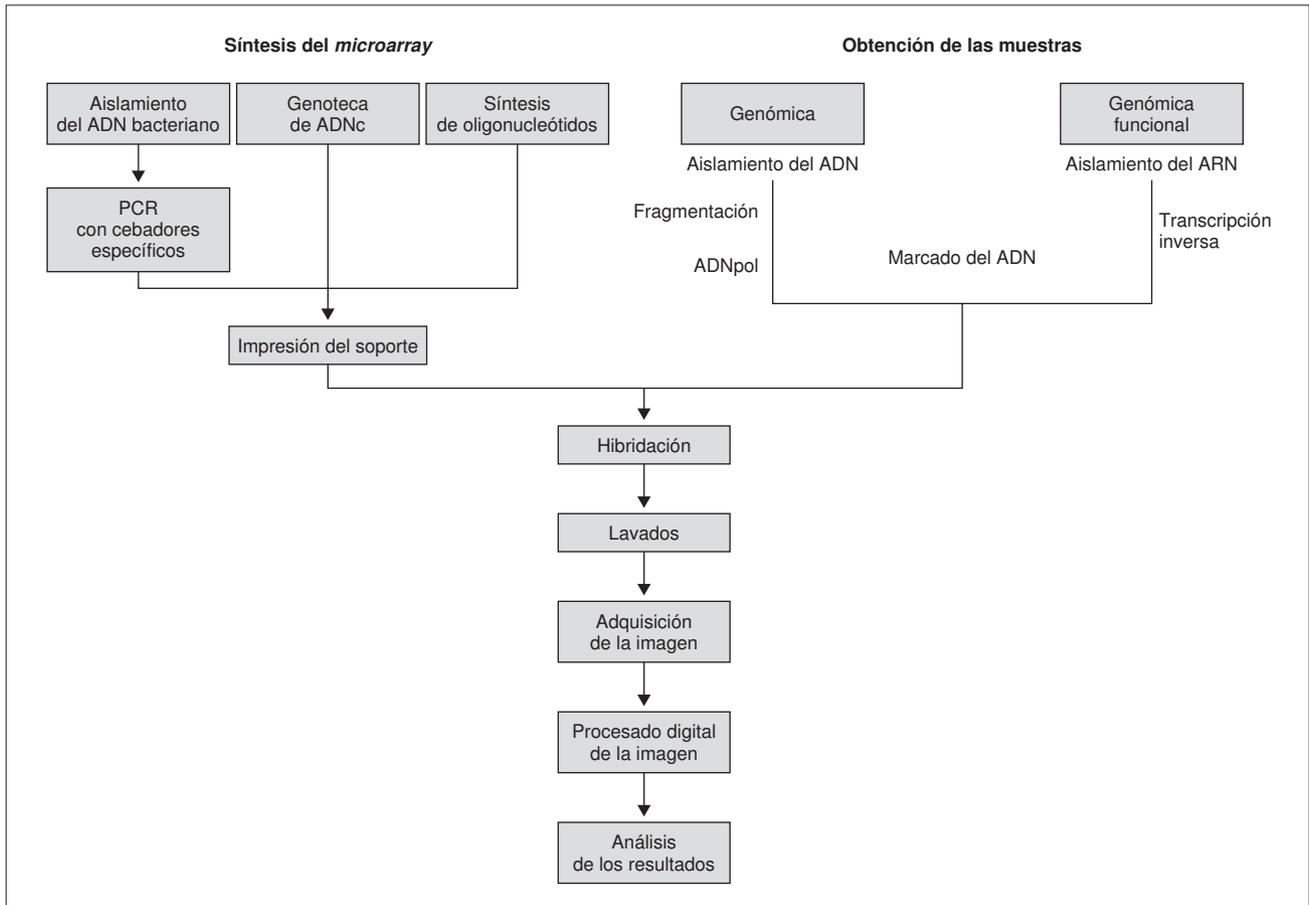


Figura 3. Esquema de la preparación de los *microarrays* de ADN y del procesamiento de las muestras para su análisis mediante *microarrays* de ADN.

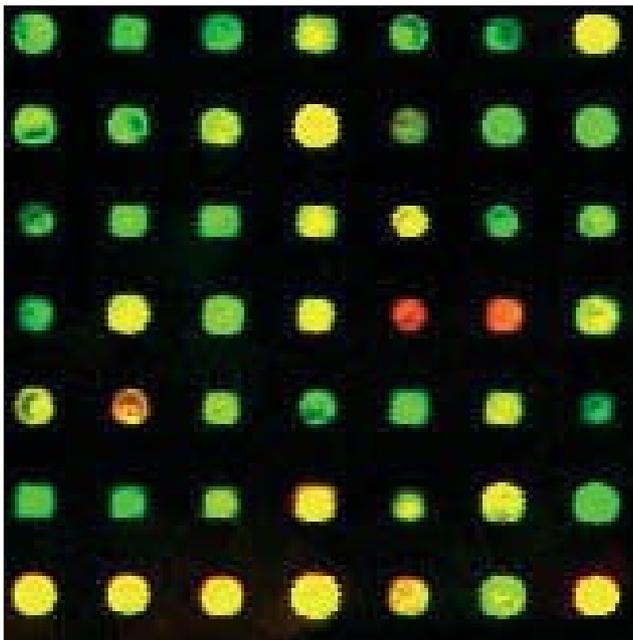


Figura 4. Fragmento de un *microarray* de ADN donde se compara la expresión génica de una cepa control y una cepa problema. Los puntos rojos indican expresión únicamente del gen en la cepa control, los puntos verdes aquellos genes que se expresan únicamente en la cepa problema y los puntos amarillos/naranjas los genes que se expresan en ambas cepas.

casos, evitar la subjetividad a la hora de establecer este punto de corte es fundamental.

Tipos de *arrays*

La nomenclatura en este campo es bastante variable y en ocasiones subjetiva, de modo que podemos encontrar en la literatura el término *microarray* como sinónimo de *array*. A pesar de ello, en la mayoría de los casos se distinguen dos tipos principales de *arrays*: *macroarrays* y *microarrays*. Las diferencias entre ambos tipos se basan en el tipo de soporte, el marcado de las muestras, el tamaño del *array* y el número/densidad de sondas fijadas sobre el soporte. En la tabla 1 se muestran las principales ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

Macroarrays

Consideraremos *macroarrays* aquellos *arrays* en los que las sondas se depositan e inmovilizan sobre un soporte tipo membrana, generalmente de nitrocelulosa o nailon. Este tipo de *arrays* utilizan en la mayoría de los casos un marcado de tipo radiactivo, aunque el quimioluminiscente también se ha utilizado en alguna ocasión². El hecho de utilizar radiactividad implica la necesidad de utilizar un *macroarray* para cada muestra o control. Los *macroarrays* generalmente contienen entre decenas y algunos miles de sondas, y pueden considerarse como los primeros *arrays*, pues ya en 1993 fueron utilizados por el grupo del

TABLA 1. Ventajas e inconvenientes de los distintos tipos de *arrays* de ADN

	Ventajas	Inconvenientes
<i>Macroarrays</i>	Más barato Puede sintetizarse en el propio laboratorio Permite hibridaciones interespecíficas Gran variedad disponible en el mercado Kits para diagnóstico (LiPA)	Radioactivo Número de sondas limitado Requiere mayor volumen de muestra Requiere puesta a punto Cada muestra requiere un <i>array</i>
<i>Microarrays</i> en portaobjetos	Utiliza volúmenes pequeños Alta densidad de sondas Puede sintetizarse en el propio laboratorio Permite hibridaciones interespecíficas Pueden procesarse dos muestras a la vez en un mismo <i>microarray</i>	Coste relativamente elevado Requiere puesta a punto
<i>Gene-Chip</i>	Utiliza volúmenes pequeños Muy puesto a punto: repetitivo y robusto La mayor densidad de sondas del mercado	Coste elevado El uso de oligonucleótidos requiere altas homología Disponible para un número limitado de organismos No pueden procesarse dos muestras a la vez en un mismo <i>microarray</i> Exclusivo de Affimetrix
<i>Chips</i> microelectrónicos	Utiliza volúmenes pequeños Alta densidad de sondas Gran versatilidad y control sobre sondas y muestras Mayor eficacia de hibridación	Coste elevado Todavía en desarrollo Exclusivo de Nanogen

Dr. Blattner (UW-Madison) para investigar la expresión génica de *Escherichia coli*³.

Dentro de los *macroarrays* se encuentran el LiPA (Line Probe Assay), un sistema de detección multiparamétrico que se ha convertido en una alternativa a la secuenciación directa para genotipificar (v. p. ej., la referencia 4). Este sistema utiliza tiras cubiertas con sondas específicas de determinados genes que son hibridados con los productos de amplificación obtenidos a partir de la muestra analizada. Una clara ventaja de este sistema es que en un sólo análisis pueden amplificarse distintas partes de un gen, diferentes genes o incluso ADN de diversos organismos. En definitiva, estos *macroarrays* contienen un número pequeño de sondas, pero son muy útiles para realizar análisis concretos y son cada vez más utilizados en el diagnóstico clínico (v. apartado de aplicaciones y tablas 2 y 3).

Microarrays

Como ya hemos comentado anteriormente, la característica principal de los *microarrays* es la gran cantidad de sondas que pueden fijarse sobre el soporte sólido, pudiéndose alcanzar hasta 60.000 sondas en un único soporte. Otra de las diferencias fundamentales frente a los *macroarrays* es el soporte utilizado, y en función de esto pueden diferenciarse *microarrays* en portaobjetos, *microarrays* de alta densidad o Gene-Chip® y chips microelectrónicos.

Microarrays en portaobjetos

Este tipo de *microarray* se diferencian de los *macroarrays* en tres aspectos: *a*) utilizan un portaobjetos de cristal o plástico como soporte; *b*) el marcado de las muestras se realiza mediante fluorescencia, y *c*) contienen un gran número y densidad de sondas. Este tipo de *microarrays* fue introducido en 1995 por el grupo de P.O. Brown en la Universidad de Stanford⁵. Las ventajas de este sistema es que la hibridación tiene lugar en una cámara de hibridación

pequeña, de modo que se trabaja con volúmenes mucho más pequeños y la concentración relativa de las sondas es mayor, y sobre todo que la utilización de la fluorescencia como sistema de marcado permite hibridar en un mismo *array* varias muestras conjuntamente (p. ej., control y problema).

El sistema Gene-Chip®

Un tipo particular de *microarrays* son los producidos por Affymetrix, una compañía que ha ideado y patentado una tecnología que permite de manera simultánea la síntesis y la impresión de las sondas moleculares directamente en la fase sólida. Estos *microarrays*, conocidos comercialmente con el nombre de GeneChip® o “DNA-chip”, utilizan una tecnología de síntesis mediante fotolitografía, es decir, que las sondas son oligonucleótidos sintetizados *in situ* sobre un cristal mediante una reacción fotoquímica. Las sondas constan de 25 nucleótidos debido a la eficiencia del sistema de síntesis, ya que sondas mayores podrían contener errores. Precisamente, este pequeño tamaño supone una limitación en la especificidad y la afinidad de la muestra por la sonda. Para solucionar este problema el *array* contiene series de oligonucleótidos que difieren únicamente en una base para determinados genes, lo cual permite calcular el ruido de fondo debido a la hibridación inespecífica. Estos *arrays* contienen más de 50.000 sondas y actualmente son los que poseen mayor número de sondas y mayor densidad.

La ventaja de este sistema es que es muy reproducible, ya que las condiciones están muy estandarizadas. Los inconvenientes principales son que el análisis con este tipo de *microarrays* requiere el uso de escáneres y *software* específicos que únicamente provee la propia compañía, y que estos *microarrays* no contienen las secuencias completas de los genes sino fragmentos internos de 25 nucleótidos, de modo que si la muestra analizada no presenta una homología del 100% pueden aparecer problemas a la hora de la hibridación. En un principio esta

TABLA 2. Aplicaciones de los *macroarrays* y *microarrays* de ADN en la microbiología clínica: bacterias

Bacteria	Sistema utilizado	Sondas utilizadas	Aplicación	Referencia
<i>Brucella</i> spp.	Membrana nitrocelulosa (LiPA*)	Oligonucleótidos	Identificación de especies del género <i>Brucella</i>	17
<i>Campylobacter</i> spp.	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Identificación de especies del género <i>Campylobacter</i>	18
<i>Enterococcus</i> spp.	Membrana nailon	Productos de PCR	Identificación de especies del género <i>Enterococcus</i>	19
<i>Escherichia coli</i>	Portaobjetos	Oligonucleótidos	Identificación de factores de virulencia	20
<i>Helicobacter pylori</i>	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Genotipificación según los genes <i>vacA</i> y <i>cagA</i>	21
<i>H. pylori</i>	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Detección de resistencia a macrólidos	22
<i>Listeria</i> spp.	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Identificación de especies del género <i>Listeria</i>	23
<i>Mycobacterium</i> spp.	Affymetrix	Oligonucleótidos <i>in situ</i>	Identificación de micobacterias y resistencia a rifampicina	13
<i>M. tuberculosis</i>	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Detección de resistencia a rifampicina	24
<i>M. tuberculosis</i>	Membrana nailon	Oligonucleótidos	Detección de resistencia a isoniácida	25
<i>Mycobacterium</i> spp.	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Identificación de micobacterias**	26
<i>Salmonella enterica</i>	Portaobjetos	Productos de PCR	Genotipificación	27
<i>Staphylococcus</i> spp.	Membrana nailon	Productos de PCR	Identificación de especies del género <i>Staphylococcus</i>	28
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Productos de PCR	Factores de virulencia y antígenos superficiales	29
Diversas bacterias	Chip microelectrónico	Oligonucleótidos	Identificación bacteriana	30, 31
Bacteria de hemocultivos	Membrana nailon	Oligonucleótidos	Detección de bacterias a partir de frascos de hemocultivo positivos	12

*LiPA = Line Probe Assay

**Identificación de micobacterias a partir de frascos BACTEC 12B positivos.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

TABLA 3. Aplicaciones de los *macroarrays* y *microarrays* de ADN en el campo de la microbiología clínica: parásitos y virus

Microorganismo	Sistema utilizado	Sondas utilizadas	Aplicación	Referencia
Parásitos				
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Affymetrix	Oligonucleótidos*	Identificación de especies de <i>Cryptosporidium</i>	14
<i>Plasmodium falciparum</i>	Portaobjetos	Productos de PCR	Análisis de la expresión génica	32
Virus				
Citomegalovirus	Membrana nitrocelulosa	Oligonucleótidos	Resistencia a ganciclovir	33
Influenza A y B	Portaobjetos	Oligonucleótidos	Diagnóstico	34
Rotavirus	Portaobjetos	Oligonucleótidos	Genotipificación	35
VIH	Membrana nitrocelulosa	Producto de PCR	Resistencia a antirretrovirales	36, 37
VIH	Affymetrix	Oligonucleótidos <i>in situ</i>	Resistencia a antirretrovirales	38, 39
VHB	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Genotipificación	40
Papilomavirus	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Genotipificación	41
VHC	Membrana nitrocelulosa (LiPA)	Oligonucleótidos	Genotipificación	42,43

*En este caso se utilizó impresión de los oligonucleótidos sobre soporte de vidrio, no se utilizó síntesis *in situ*.

LiPA = Line Probe Assay. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C.

tecnología GeneChip® únicamente contemplaba la síntesis de *microarrays* de *E. coli* basándose en los resultados obtenidos por el grupo de F. R. Blattner en la Universidad de Wisconsin-Madison⁶. Tras la publicación de nuevos genomas esta tecnología se ha ampliado para el análisis de organismos tan diversos como el hombre, el ratón, *Arabidopsis thaliana* o *Bacillus subtilis*.

Chips microelectrónicos

Los chips microelectrónicos o NanoChip® son uno de los formatos más novedosos dentro de los *arrays*. Su desarrollo es el resultado de la combinación de varios avances en el

campo de la biología molecular y las técnicas de microfabricación de semiconductores.

En lugar de una membrana o un portaobjetos este tipo de *arrays* consiste en un conjunto de electrodos cubiertos por una fina capa de agarosa que contiene acoplados motivos de afinidad que permitan la inmovilización de las sondas mediante el sistema biotina-estreptavidina. La incorporación de campos eléctricos controlables dota de un nuevo grado de control del sistema a la hora de depositar tanto las sondas como las muestras. A diferencia del resto de *arrays*, en los que la hibridación es un proceso pasivo y aleatorio, en el caso de los *chips* microelectrónicos se genera un campo eléctrico que dirige activamente la muestra,

incrementando su concentración sobre las sondas, y por lo tanto, aumentando la efectividad de la hibridación. Además, si tras el proceso de hibridación se invierte la polaridad se elimina el exceso de muestra y puede procesarse una nueva. Por lo tanto, este sistema permite hibridaciones seriadas de distintas muestras o bien de una muestra sobre distintas combinaciones de sondas en el mismo *array*. Esta tecnología está siendo desarrollada por Nanogen (San Diego, CA, USA) y evidentemente presenta un gran potencial debido a su capacidad de mover ácidos nucleicos sobre la superficie del *chip*. Si la compañía consigue que el coste no sea excesivo podría convertirse en el futuro de los *arrays*.

Aplicaciones de los *arrays* de ADN en el campo de la microbiología médica

Tradicionalmente en la microbiología clínica se ha utilizado una amplia variedad de cultivos, métodos de tinción y pruebas bioquímicas para la identificación de la mayoría de especies bacterianas. En la identificación de los parásitos la visualización microscópica mediante examen en fresco o tras una tinción específica ha desempeñado una importante función, mientras que la identificación de los virus requiere una vía más indirecta como es el cultivo celular. Algunos de estos ensayos requieren un largo período de tiempo antes de obtenerse un resultado definitivo, por lo que a lo largo del tiempo se han desarrollado diversos métodos para detectar características moleculares específicas del patógeno, como por ejemplo todas las variantes del enzoinmunoanálisis. Aunque estas técnicas pueden ser útiles para la identificación microbiana, su efectividad puede verse afectada por el hecho de que muchos microorganismos han encontrado maneras de modificar su antigenicidad. De manera similar, la determinación de los niveles de anticuerpos circulantes puede que no distinga una infección pasada de una actual. Debido a esta variabilidad se han desarrollado métodos de identificación microbiana basados en la detección de un factor relativamente estable como el genoma del microorganismo. Los métodos utilizados inicialmente estaban basados en la hibridación de pequeños fragmentos de ADN marcados (sondas) que reconocían regiones específicas del microorganismo que se quería detectar. No obstante, debido al bajo número de estos microorganismos presentes en un producto patológico determinado, fue necesario desarrollar un sistema de amplificación del gen. Esto se consiguió con la introducción de la PCR. Utilizando diversos cebadores en una misma reacción (PCR múltiple) se pueden llegar a identificar diversos microorganismos en una única reacción. Sin embargo, este sistema también posee sus limitaciones, entre las que se encuentran:

1. La PCR múltiple permite amplificar concomitantemente un número limitado de genes.
2. Mutaciones puntuales en la región de ADN que es reconocida por los cebadores pueden conducir a falsos negativos.
3. Muchas veces es necesario secuenciar el producto de PCR para identificar mutaciones puntuales en un gen determinado asociadas, por ejemplo, con la adquisición de resistencia a un antibiótico.

Estos problemas pueden resolverse mediante la utilización de *arrays* de ADN. En general, las principales aplicaciones de los *microarrays* de ADN son:

1. Detección de genes específicos o regiones del genoma de un microorganismo (genotipificación).
2. Detección de mutaciones puntuales en ciertos genes.
3. Análisis de la expresión de ARNm.

Hasta la actualidad los *arrays* de ADN se han aplicado de una manera más específica al estudio de la patogenia microbiana, a la epidemiología molecular, al diagnóstico microbiológico, así como a la investigación de los mecanismos de acción y resistencia a agentes antimicrobianos.

Aplicación de los *arrays* de ADN a la investigación de la patogenia bacteriana

Durante la investigación de la patogenia bacteriana deben diferenciarse dos aspectos. En primer lugar, los factores de patogenicidad del microorganismo, y en segundo lugar, la respuesta de la célula hospedadora frente a la acción del microorganismo. Israel et al⁷ utilizaron *microarrays* de ADN que contenían los genes que constituyen el genoma de *H. pylori* para analizar determinantes asociados a la patogenicidad de este microorganismo. Desde el punto de vista de la respuesta de la célula hospedadora frente a un patógeno, Belcher et al⁸ investigaron la respuesta de células del epitelio bronquial frente al efecto de dos cepas de *Bordetella pertussis*, una productora de la toxina y la otra no. Para ello utilizaron el microchip HU6800 (Affymetrix) que contiene un conjunto de sondas para analizar la expresión de genes que codifican proteínas del sistema inmunitario, hallando que las células infectadas con la cepa que producía la toxina expresaban un conjunto de citocinas y genes regulados por NFκB.

Aplicación de los *arrays* de ADN al estudio epidemiológico molecular de ciertos microorganismos

En un estudio realizado por Kato-Maeda et al⁹ en el que se pretendía obtener información sobre las bases moleculares de la diversidad bacteriana y de la evolución de *Mycobacterium tuberculosis* se utilizaron *microarrays* de ADN que contienen los genes que constituyen el genoma de este microorganismo (Affymetrix). Se analizaron 19 cepas de *M. tuberculosis* de 16 clones diferentes y tras purificación del genoma, digestión con ADNasaI y marcado terminal con biotina se procedió a la hibridación con los *microarrays*, revelando posteriormente con estreptavidina-ficoeritrina. Los resultados demostraban deleciones importantes en el genoma de algunas de las cepas y que estas deleciones se asociaban con una menor patogenicidad. Los patrones de deleciones detectados eran idénticos en los mismos clones, pero diferían en los clones diferentes, lo cual sugería que esta metodología podría ser utilizada en estudios epidemiológicos.

Aplicación de los *arrays* de ADN al diagnóstico microbiológico

Los *microarrays* de ADN desarrollados hasta la actualidad con finalidad diagnóstica no presentan una elevada complejidad. Se podría decir que son *macroarrays* o

microarrays de baja densidad (tablas 2 y 3). Por ejemplo, Hamels et al¹⁰ han diseñado un *microarray* para detectar varias especies del género *Staphylococcus*. En primer lugar, amplifican utilizando oligonucleótidos degenerados el gen *femA*, que se encuentra altamente conservado en el género *Staphylococcus* y este producto de PCR es analizado posteriormente mediante *microarrays* de ADN que contienen sondas que reconocen el gen *femA* de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. saprophyticus*. En el análisis realizado los autores identifican correctamente cada una de las especies sin que se presente reacción cruzada. De una manera similar se han diseñado *microarrays* para distinguir entre especies de *Pseudomonas*¹¹.

Una estrategia que se ha utilizado para la identificación bacteriana es la utilización como sonda de oligonucleótidos específicos de las regiones variables de los genes que codifican el ARNr 23S o 16S. Anthony et al¹² analizaron 158 hemocultivos positivos mediante la utilización de un *array* de oligonucleótidos específicos para 25 bacterias distintas. A partir del crecimiento bacteriano en el frasco de hemocultivos, se realizó una PCR con cebadores universales para la amplificación de la región variable del gen 23S. Este producto o productos de PCR, si el hemocultivo era mixto, se hibridaban con el *array*. La identificación fue correcta en 125 hemocultivos positivos (79,7%); en estos datos se incluían cuatro hemocultivos mixtos. En 9 hemocultivos (7,2%) se aislaron bacterias no representadas en el *array* y en 16 hemocultivos positivos (10,3%) no se obtuvo producto de PCR. En 7 de los 8 hemocultivos positivos restantes, se identificaron estreptococos, pero éstos no crecieron y un aislamiento de *S. aureus* se interpretó como estafilococo plasmocagulasa negativo.

De la misma manera, Troesch et al¹³ analizan en el mismo *microarray* la identificación de especies del género *Mycobacterium* y su resistencia a la rifampicina. Para la identificación de las especies utilizan oligonucleótidos específicos de las regiones variables del gen que codifica el ARNr 16S mientras que para la detección de la resistencia a rifampicina se utilizan oligonucleótidos específicos para la detección de mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a este agente antimicrobiano. De hecho, para detectar la mutación específica se utilizaron cuatro sondas de igual longitud cuya única diferencia es que en la posición de la mutación se incluye A, T, C o G. Se diseñaron los oligonucleótidos de forma que la base donde podría tener lugar la mutación quedase en la parte central.

Los *microarrays* de ADN también se han utilizado para detectar *Cryptosporidium* sp. en aguas y diferenciar los que pueden ocasionar infecciones en humanos¹⁴. Las sondas utilizadas en este *microarrays* son distintas regiones del gen *hsp70* del microorganismo. Otro aspecto de la aplicación de los *microarrays* de ADN es el ámbito de la virología clínica, básicamente su utilización en la genotipificación del VIH¹⁵.

En la información aportada en las tablas 2 y 3 se incluye el sistema LiPA (Line Probe Assay) porque, si bien posee normalmente un número pequeño de sondas, por lo que debería considerarse un *macroarray*, está siendo ampliamente utilizado en el diagnóstico microbiológico.

Aplicación de los *arrays* de ADN al estudio de los mecanismos de acción y de resistencia a los agentes antimicrobianos

Los *microarrays* de ADN se han utilizado para analizar en profundidad el mecanismo de acción de la isoniacida frente a *M. tuberculosis*¹⁶. Además, se han utilizado para el estudio de la resistencia bacteriana a los antibióticos: ya se ha mencionado anteriormente la utilización de los *microarrays* de ADN para la detección de resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis*. Nuestro grupo (Vila et al) de investigación ha utilizado *microarrays* de ARN que contienen los genes que constituyen el genoma de *E. coli* para analizar la expresión de sistemas de expulsión activa en cepas de este microorganismo resistentes a quinolonas, demostrando que esta metodología es altamente válida para este tipo de estudios, pues permite una visión general de los genes que se están expresando y así poder comparar la expresión de estos genes entre cepas isogénicas sensibles y resistentes a las quinolonas.

Ventajas y desventajas de la utilización de los *arrays* de ADN en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas

La principal ventaja de esta metodología es la posibilidad de hibridación simultánea de un gran número de sondas, por lo que permite detectar a la vez un amplio número de microorganismos (bacterias, virus, parásitos y hongos). Además permite no sólo la identificación del microorganismo, sino también el análisis del genotipo de resistencia y la presencia de factores de patogenicidad, mediante detección de genes específicos o mutaciones. Sin embargo, existe una serie de desventajas que probablemente en el futuro podrán ser soslayadas. Una de ellas es la baja sensibilidad, que en la actualidad hace difícil la utilización de esta metodología para la detección directa del microorganismo en el producto patológico, a no ser que se incorpore un paso previo de amplificación génica. No obstante, cuando los *microarrays* sean miniaturizados, su sensibilidad probablemente aumentará, por lo que, en un futuro, y gracias a la nanobiotecnología, es probable que pueda detectarse el ADN o ARN directamente de la muestra sin amplificación previa. Otra desventaja importante es que la detección de un gen de resistencia no significa invariablemente un fenotipo de resistencia, por lo que además de detectar la presencia del gen deberíamos detectar la expresión de éste mediante análisis del ARN mensajero (ARNm). Desde el punto de vista de la detección de la resistencia a los antibióticos de un microorganismo determinado directamente del producto patológico comporta también una serie de inconvenientes, como son:

1. La diversidad de mecanismos de resistencia que existen para un antibiótico determinado y la necesidad de contemplarlos todos ellos en el *microarray* de ADN.
2. Para algunos mecanismos es necesario determinar la expresión del gen.
3. La aparición de nuevos mecanismos de resistencia no contemplados en el *microarray*.
4. Si el producto patológico corresponde a una zona del cuerpo humano que presenta una microbiota normal, ésta puede interferir con la detección, ya que el mismo mecanismo de resistencia puede estar presente en algunas de las bacterias que constituyen esta microbiota.

En definitiva, los *microarrays* con elevada densidad de sondas se encuentran en las primeras fases de desarrollo, pero ofrecen un potencial futuro enorme. Sin embargo, debido a la dinámica de la evolución inherente a los microorganismos, probablemente en muchos casos nunca llegarán a desplazar totalmente a los métodos convencionales, sino que serán un complemento de ellos.

Agradecimientos

A.D-S ha sido parcialmente financiado por la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI).

Bibliografía

- Fleischmann RD, Adams O, White RA, Clayton EF, Kirkness AR, Kerlavage CJ, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995;269:496-512.
- Rajeevan MS, Dimulescu IM, Unger ER, Vernon SD. Chemiluminescent analysis of gene expression on high-density filter arrays. *J Histochem Cytochem* 1999;47:337-42.
- Chuang SE, Daniels DL, Blattner FR. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993;175:2026-36.
- Descamps D, Calvez V, Collin G, Cecille A, Apetrei C, Damond F, et al. Line probe assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 mutations conferring resistance to nucleoside inhibitors of reverse transcriptase: Comparison with sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2143-5.
- Schena MD, Shalon R, Davis W, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270:467-70.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997;277: 1453-74.
- Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;107:611-20.
- Belcher CE, Drenkow J, Kehoe B, Gingeras TR, McNamara N, Lemjabbar H, et al. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97: 13847-52.
- Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, et al. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 2001;11:547-54.
- Hamels S, Gala L, Dufour S, Vannuffem P, Zammatteo N, Remaci J. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species and methicillin resistance. *Biotechniques* 2001;31:1364-72.
- Cho JC, Tiedje JM. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3677-82.
- Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2000;38:781-8.
- Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, et al. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999;37:49-55.
- Straub TM, Daly DS, Wunshel S, Rochelle PA, DeLeon R, Chandler DP. Genotyping *Cryptosporidium parvum* with an hsp70 single-nucleotide polymorphism microarray. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1817-26.
- Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *BioTechniques* 1995;19:442-7.
- Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, Imboden P, Rame S, Brown PO, et al. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 12833-8.
- Rijpens NP, Jannes G, Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LMF. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1683-8.
- Van Doorn LJ, Verschuuren-Van Haperen A, Burnens A, et al. Rapid identification of thermotolerant *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* from various geographic locations by a GTPase-based PCR hybridization assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:1970-6.
- Goh SH, Facklam RR, Chang M, Hill JE, Tyrrell GJ, Burns EC, et al. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J Clin Microbiol* 2000;38:3953-9.
- Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov C, Levy DD. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3258-63.
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, Van Asbroeck M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 1998;36:1271-6.
- Van Doorn LJ, Debets-Ossenkopp YJ, Marais A, Sanna R, Megraud F, Kusters JG, et al. Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1779-82.
- Rijpens NP, Jannes G, Van Asbroeck M, Herman LMF, Rossau R. Simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Mol Cell Probes* 1996;9: 423-32.
- De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelincx L, Rossau R, et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuber Lung Dis* 1995;76:425-30.
- Brown TJ, French GL. Genotypes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates seen at a London Teaching Hospital. *J Microbiol Meth* 1999;38:226.
- Miller N, Infante S, Cleary T. Evaluation of the LiPA mycobacteria assay for identification of Mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 2000;38:1915-9.
- Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, et al. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol* 2002;40:2074-8.
- Goh SH, Santucci Z, Kloos WE, Faltyn M, George CG, Driedger D, et al. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J Clin Microbiol* 1997;35:3116-21.
- McCluskey J, Dowson CG, Mitchell TJ. The use of microarray technology for the analysis of *Streptococcus pneumoniae*. *Comp Funct Genom* 2002;3: 366-8.
- Edman CF, Mehta P, Press R, Spargo C, Walker G, Nerenberg M, et al. Pathogen analysis and genetic predisposition testing using microelectronic arrays and isothermal amplification. *J Invest Med* 2000;48:93-101.
- Westin L, Miller C, Vollmer D, Canter D, Radtker R, Nerenberg M, et al. Antimicrobial resistance and bacterial identification utilizing a microelectronic chip array. *J Clin Microbiol* 2001;39:1097-104.
- Hayward RE, De Risi JL, Alfadhli S, Kaslow DC, Brown PO, Rathod PK. Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Microbiol* 2000;35:6-14.
- Zhou L, Harder TC, Ullmann U, Rautenberg P. Rapid detection by reverse hybridization of mutations in the UL97 gen of human cytomegalovirus conferring resistance to ganciclovir. *J Clin Virol* 1999;13:53-9.
- Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping Influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:696-704.
- Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotavirus by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002;40:2398-407.
- Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scarcez T, Verhofstede C, et al. Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:284-91.
- Schmit JC, Ruiz L, Stuyver L, Van Laethem K, Vanderlinden I, Puig T, et al. Comparison of the LiPA HIV-1 RT test, selective PCR and direct solid phase sequencing for the detection of the HIV-1 drug resistance mutations. *J Virol Methods* 1998;73:77-82.
- Vahey M, Nau ME, Barrick S, Cooley JD, Sawyer R, Sleeker AA, et al. Performance of the Affymetrix GeneChip HIV PRT 440 platform for antiretroviral drug resistance genotyping of human immunodeficiency virus type 1 clades and viral isolates with length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:2533-7.
- Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 class B protease gene using high density oligonucleotide arrays. *Nature Med* 1996;2:753-9.
- Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M, et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups in Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998;36:648-51.
- Kleter B, Van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Saastrowijoto S, Ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999;37:2508-17.
- Livache T, Fouque B, Roget A, Marchand J, Bidan G, Teoule R, et al. Polypyrrole DNA chip on a silicon device: Example of hepatitis C virus genotyping. *Anal Biochem* 1998;255:188-94.
- Stuyver L, Wyseur A, Van Arnhem W, Hernández F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996;34:2259-66.

ANEXO 1. Fundamentos, tipos y aplicaciones de los *arrays* de ADN en la microbiología clínica

1. ¿Qué es un *array*?

- a) Una molécula de ADN con afinidad por un soporte sólido.
- b) Una molécula de ARN con afinidad por un soporte sólido.
- c) Una sonda molecular de ADN o ARN.
- d) Un conjunto de sondas moleculares fijadas a un soporte de manera ordenada.
- e) Un portaobjetos recubierto por residuos de lisinas.

2. ¿Cuál de las siguientes técnicas ha servido de base para la técnica de la hibridación mediante *arrays*?

- a) *Dot-blot*.
- b) Electroforesis.
- c) Restricción enzimática.
- d) Cromatografía de afinidad.
- e) Electroporación.

3. El esquema básico de un experimentos con *arrays* consiste en:

- a) Obtención de la muestra, hibridación, lavados, marcado, lavados, escaneado, procesado de la imagen y análisis de los datos.
- b) Obtención de la muestra, hibridación, lavados, procesado de la imagen, escaneado y análisis de los datos.
- c) Obtención de la muestra, marcado, hibridación, lavados, escaneado, procesado de la imagen y análisis de los datos.
- d) Obtención de la muestra, hibridación, marcado, escaneado y análisis de los datos.
- e) Obtención de la muestra, marcado, escaneado, hibridación, procesado de la imagen y análisis de los datos.

4. Además de su menor peligrosidad, ¿qué ventaja tiene utilizar el marcado fluorescente frente al radiactivo?

- a) Los compuestos fluorescentes pueden unirse a los nucleótidos mientras que los radiactivos no.
- b) Permite hibridar dos muestras simultáneamente.
- c) Los compuestos fluorescentes son más sensibles.
- d) Todas las respuestas son correctas.
- e) Ninguna de las respuestas anteriores son correctas.

5. ¿A qué hace referencia el término Gene-Chip?

- a) A un gen presente en el *microarray* que actúa como control.
- b) A un *microarray* que se procesa en paralelo como control del experimento.
- c) A un *microarray* sintetizado mediante fotolitografía comercializado por Affimetrix.
- d) A un fluorocromo utilizado en los *macroarrays*.
- e) A un *macroarray* analizado con radiactividad.

6. ¿Cuál es la mayor densidad de sondas que se pueden obtener actualmente?

- a) Aproximadamente 60.
- b) Aproximadamente 600.
- c) Aproximadamente 6.000.
- d) Aproximadamente 60.000.
- e) Aproximadamente 600.000.

7. ¿Cuál es la principal ventaja de los *microarrays* de ADN frente a la PCR?

- a) Rapidez.
- b) Especificidad.
- c) Mayor número de genes detectados.
- d) Utilización para estudios epidemiológicos.
- e) Aplicación al diagnóstico microbiológico.

8. Los *microarrays* de ADN no permiten:

- a) Detectar mutaciones puntuales.
- b) Secuenciar genomas enteros.
- c) Detectar expresión de ARNm.
- d) Analizar mecanismos de resistencia.
- e) Investigar mecanismo de acción de los antibióticos.

9. Uno de los genes más utilizados como sonda para la identificación bacteriana en los *microarrays* de ADN es:

- a) El gen que codifica la ARN polimerasa.
- b) El gen que codifica la flagelina.
- c) El gen que codifica la lactato dehidrogenasa.
- d) El gen que codifica el ARNr 16S.
- e) El gen que codifica una permeasa.

10. Los *microarrays* de ADN se han utilizado hasta la actualidad para la genotipificación de los siguientes microorganismos, excepto:

- a) *Helicobacter pylori*.
- b) Virus de la hepatitis C.
- c) Virus de la inmunodeficiencia humana.
- d) Virus de la hepatitis B.
- e) Virus respiratorio sincitial.