

# Mètodes alternatius a la detecció de *Legionella* (PCR)

**Jordi Dellundé**

Cap del Departament de Control d'Aigües  
Laboratoris Clínics Altimir  
Blanes (Girona)  
jdellunde@altimir.com

## 1. INTRODUCCIÓ

Al llarg de la història de la ciència hi ha hagut descobriments científics molt importants que han passat a la història per la seva excepcionalitat. Alguns han estat mítics com el de la gravetat de Newton que el va realitzar observant com una poma queia d'un pòmer o el de la penicil·lina de Fleming gràcies a una placa de petri contaminada.

Un d'aquests descobriments excepcionals es produeix l'any 1983 per Kary Mullis, mentre anava en cotxe per una carretera de Carolina del Nord. Kary Mullis concep un mètode molt simple de produir virtualment un número il·limitat de còpies d'una seqüència específica d'ADN dins un tub d'assaig - *la reacció en cadena de la polimerasa* o PCR. Després de dos anys d'intensa feina de laboratori, l'any 1985 presenta el mètode a la comunitat científica. L'any 1993 se li concedeix el premi Nobel de Química per aquest descobriment.

En el moment en que aquest mètode es presenta a la comunitat científica, es comença a aplicar a la investigació científica, revolucionant la investigació clínica i el laboratori de diagnòstic però no és fins a la dècada dels 90, que es comença a aplicar per a la detecció de determinats microorganismes ambientals, implantant-se en la majoria de laboratoris i centres de recerca. La seva utilització es limitava principalment per a la detecció d'aquells microorganismes de creixement lent i de requeriments nutritius molt complexos que feien molt difícil aïllar-los mitjançant tècniques de cultiu convencionals.

En els darrers anys de la dècada dels 80' i durant la dècada dels 90' es varen desenvolupar nombrosos projectes de recerca per a la posta a punt de mètodes de PCR aplicats a la microbiologia ambiental i clínica, fet el que va contribuir a adquirir un important "background" de coneixements. Aquesta tasca realitzada bàsicament al llarg de darrera dècada va culminar en els darrers anys amb el progressiu traspàs d'aquests coneixements a la indústria privada. És per això que avui, hi ha cada cop més laboratoris i centres privats que es plantegen implantar en els seus laboratoris aquest tipus de tècniques moleculars.

En els darrers anys s'ha començat aplicar un nou mètode de PCR, la PCR "real time" o quantitativa que si bé es basa en el mateix principi, aquesta tècnica permet quantificar el número de microorganismes presents en la mostra. El més probable és que aquesta tècnica acabi desplaçant la PCR convencional però l'alt cost econòmic de l'equipament necessari per a poder-la realitzar fa que de moment, hi hagi un número molt reduït de laboratoris de recerca i indústria privada que en puguin disposar.

## 2. LA PCR

La PCR és un mètode "in vitro" de síntesi d'àcids nucleics pel qual un segment particular d'ADN és específicament replicat, marcat per dos iniciadors "primers" que indiquen l'inici de la seqüència a replicar, la qual es sotmet a repetits cicles de desnaturalització, alineació i extensió amb l'enzim *taq DNA polimerasa*. D'aquesta manera s'obtenen múltiples còpies de la seqüència escollida d'ADN.

La tècnica de la PCR es pot dir que es base en conjunt propietats fonamentals de l'ADN, que es produeixen de manera natural. L'ADN existeix com dues cadenes complementàries en forma de doble hèlix (dos espirals entrelaçades). Quan una cèl·lula ha de dividir-se, ha de fer una còpia del seu ADN de manera que finalment resultin dos ADN exactament iguals, un per a cada cèl·lula resultant de la divisió. Per a realitzar això, les dues cadenes en primer lloc es separen (desnaturalitzen). Cadascuna d'aquestes cadenes serveix com a plantilla o model a partir del qual es va conformant el seu respectiva nova cadena complementària (extensió en la PCR), essent el resultat final dues parells de cadenes d'ADN.

La tècnica de PCR és altament específica i sensible, ja que parteix de l'existència de la molècula de l'ADN que es vol amplificar, que s'utilitza en investigació arqueològica, medicina forense, proves de paternitat, estudis genètics, investigació biològica i laboratori clínic entre altres. En definitiva, es pot definir com el cor de la biologia molecular

## 3. UTILITZACIÓ DE LA PCR PER A LA DETECCIÓ DE MICROORGANISMES AMBIENTALS

La introducció d'aquesta tècnica a la recerca ambiental (microbiologia ambiental) ha suposat un important salt qualitatiu pels investigadors ja que a partir del moment que s'introdueix com a mètode rutinari, disposant d'una potent eina de treball. Una de les principals aplicacions que se li ha donat a la PCR ha estat la detecció microorganismes patògens i de microorganismes de creixement lent o no cultivables en condicions "in vitro" tal com *Legionella*. La seva aplicació si bé representa un important avanç important, la seva aplicació també porta associats un conjunt de desavantatges o restriccions. A continuació es passen a detallar els principals avantatges i inconvenients:

### Avantatges

1. Increment de la sensibilitat. La PCR proporciona un increment de la sensibilitat de detecció del microorganismes estudiat versus. el mètode de cultiu "in vitro" tradicional (Josephson, 1993)
2. Especificitat. La utilització de "primers" específics juntament amb unes condicions adequades d'astringència fan que la tècnica sigui altament específica.
3. Rapidesa. Es poden obtenir els resultats en dos dies com a màxim i processar un elevat número de mostres. Els actuals termocicladors permeten realitzar fins a 96 mostres de manera simultània
4. Possibilitat de detecció de més d'un microorganisme a la mateixa reacció. Una variant de la tècnica de PCR convencional, la Multiplex PCR, permet detectar més

d'un microorganisme en la mateixa reacció però per contra, la sensibilitat i especificitat de la tècnica disminueix (Chamberlain, 1988)

5. Baix cost de reactius en comparació amb el mètode de cultiu que es solen utilitzar per aïllar patògens i altres microorganismes.

### **Inconvenients**

1. Impossibilitat de distingir entre microorganismes viables i no viables ja que el que es detecta és una seqüència d'ADN. En cas de voler-se determinar si els microorganismes detectats són viables, es pot realitzar determinant la presència d'ARN missatgers o bé d'ARN ribosòmic mitjançant una tècnica de la RT-PCR. Aquesta variant de la PCR és més complexa ja que primer cal obtenir una còpia de l'ARN com a còpia de ADN (ADNc) i posteriorment realitzar la PCR (amplificació de la seqüència). La aplicació d'aquesta tècnica de PCR disminueix la sensibilitat de detecció (Bej *et al.* 1991).
2. Dificultat d'obtenir una bona extracció d'ADN. Depenent de l'origen i tipus de mostra, en aquesta hi poden existir la presència de diferents inhibidors de la PCR que poden provocar una disminució de la sensibilitat fins a la no detecció del microorganisme donant lloc a Falsos Negatius (Innis *et al.* 1990; Tsai and Olson, 1992). Per tal d'evitar-los cal realitzar una bona purificació de l'extracció de l'ADN mitjançant petites columnes de resines o utilitzant altres tècniques de purificació i introduir controls de qualitat
3. La PCR convencional no permet quantificar els microorganismes presents a la mostra. Malgrat que en principi, la PCR convencional és considerada una tècnica qualitativa, és possible quantificar aproximadament els microorganismes presents a la mostra mitjançant una simulació del test del NMP (Picard *et al.* 1992) o mitjançant controls interns d'amplificació d'àcids nucleics que al ser revelats conjuntament amb els productes amplificats de la mostra es pot comparar el producte d'hibridació obtingut amb les quantitats conegudes dels àcids nucleics dels controls interns i d'aquí extrapolar el número de microorganismes presents de la mostra (Ferre, 1992; Palmer *et al.* 1995).
4. L'elevat número de passos que s'ha de realitzar fins a l'obtenció del resultat afavoreixen que es pugui produir una contaminació de la mostra. Els microorganismes patògens es solen trobar en el medi ambient a unes concentracions baixes el que implica que habitualment amb una sola PCR no es realitzin suficients còpies del seu ADN per poder revelar i visualitzar-les, per la qual cosa es fa necessari un segon pas per augmentar la sensibilitat. Aquest segon pas sol consistir en un procés d'hibridació dels amplificats o la realització d'una segona PCR (Nested-PCR o Seminested-PCR) a partir del producte obtingut a la primera PCR (amplificat). Això comporta un increment dels passos a realitzar i la necessitat de treballar amb amplificat el que incrementa considerablement el risc de que es produeixi una contaminació creuada.

5. La necessitat de disposar d'un bon disseny de laboratori amb espais adequats per a cada procés. Per tal de minimitzar el risc de que es produeixi contaminacions creuades, cal disposar d'un espai adequat. Per això cal dissenyar a consciència el laboratori, establint diferents zones de treball: una zona d'extracció, una zona de barreja de reactius, una zona de manipulació d'amplificat de la primera PCR i zona bruta on es realitzarà el revelat.
6. Necessitat de disposar de personal qualificat el que encareix el preu de l'anàlisi

Tal i com s'ha comentat anteriorment, una de les avantatges de la PCR és l'elevada sensibilitat i especificitat de la tècnica. L'elevada sensibilitat de la tècnica de PCR radica en el principi en que es basa: la realització de còpies d'una seqüència concreta d'ADN. Mentre que amb la tècnica de cultiu tradicional només es detecten els microorganismes viables cultivables, és a dir els que tenen la capacitat de reproduir-se, amb la tècnica de PCR es detecten per igual els microorganismes viables cultivables, no cultivables, no viables (morts) i cadenes d'ADN que continguin la seqüència diana i que pugin estar presents a la mostra analitzada. Si a més a més, la seqüència que s'amplifica per PCR pertany a un gen multicòpia la sensibilitat de la PCR encara serà més elevada.

Per altre banda, la sensibilitat de la PCR també vindrà condicionada pel purificat d'ADN que s'hagi obtingut a partir de la mostra. Un dels principals desavantatges d'aplicar mètodes moleculars a la microbiologia ambiental és la presència de components naturals com ara els àcids húmics, sals minerals, polisacàrids que poden inhibir la reacció en cadena de la polimerasa PCR. Per tant, eliminar aquestes substàncies inhibidors és d'una importància crucial ja que en cas contrari es correrà el perill de que es disminueixi la sensibilitat o s'obtinguin falsos negatius.

La especificitat de la tècnica vindrà marcada pels iniciadors, "primers". L'elecció dels primers es realitzarà a partir del descrit a la literatura científica o bé en cas de tenir la formació adequada, buscant seqüències en base de dades d'àcids nucleics. Els iniciadors escollits cal que siguin específics per a un únic i particular gen que a poder ser, cal que sigui específic del microorganisme que es vol detectar (exemp. gen *mip* de *Legionella pneumophila*). Per altre banda, qualsevol tros de seqüència, per molt específica pot no ser útil com a iniciador. Així, si els iniciadors són massa curts, poden unir-se en un altre lloc, a més a més del lloc correcte, però per contra si són massa llargs, poden no unir-se en absolut, o no fer-ho a temps (Ausubel *et al.* 1989).

#### **4. PCR QUANTITATIVA O "REAL TIME PCR"**

En els darrers anys s'ha començat aplicar un nou mètode de PCR, la PCR "real time" o quantitativa que si bé es basa en el mateix principi, aquesta tècnica permet quantificar el número de microorganismes presents en la mostra (Ballard *et al.* 2000, Wilson *et al.* 2000;).

La PCR quantitativa té els mateixos avantatges que la PCR convencional però elimina en primer lloc el "handicap" de no poder quantificar el número de microorganismes presents en la mostra si bé, a l'igual que la convencional, no permet distingir entre els viables dels inviables. A part, al ser un sistema molt més automatitzat, evita moltes de les manipulacions posteriors a l'amplificació pel que el risc de contaminació dels amplificats desapareix i el temps utilitzat en l'anàlisi es redueix.

Cal esmentar que si bé els avantatges de la PCR "real time" o quantitativa respecte a la PCR convencional són evidents, el principal desavantatge d'aquesta tècnica en aquest moment és l'alt cost econòmic que suposa la seva implantació tal i com hem comentat anteriorment.

## 5. UTILITZACIÓ DE LA PCR PER A LA DETECCIÓ DE LEGIONELLA EN MOSTRES AMBIENTALS

L'aplicació de noves tècniques de biologia molecular ens obren tot un nou món de possibilitats per a la detecció i determinació de bacteris com ara *Legionella*. L'aplicació d'aquestes tècniques per a la detecció de *Legionella* en cap cas ha de ser exclouent a l'aplicació de les tècniques de cultiu (mètode oficial) i cal tenir en compte els avantatges i inconvenients que comporta la seva aplicació com a mètode analític.

La utilització de la PCR en la detecció de *Legionella* en mostres ambientals porta associats tots els avantatges i inconvenients comentats anteriorment però tal vegada el més important és saber-la utilitzar i aplicar correctament. La utilització de la PCR pot ser molt útil per a obtenir resultats en molt poc temps i poder descartar la presència de *Legionella* en una instal·lació, per exemple per descartar focus de *Legionella* en un brot, però per contra no serveix per a valorar com a funcionat un procés de desinfecció ja que no ens permet diferenciar els bacteris viables dels inviables.

En conclusió, la PCR és una nova eina de investigació i diagnòstic de laboratori, molt potent, i que cal saber-li donar l'aplicació correcta, sense desmerèixer en cap moment la tècnica oficial de detecció i enumeració de *Legionella* (ISO 11731).

## 6. BIBLIOGRAFIA

Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (ed.) 1989. John Wiley & Sons, New York

Ballard, A.L., Fry, N.K., Chan, L., Surman, S.B., Lee, J.V., Harrison, T.G., and Towner, K.J. (2000). Detection of *Legionella pneumophila* Using a Real-Time PCR hybridization Assay. *Jour. Clin. Microbiol.* **38**: 4215-4218

Bej, A.K., Mahubani, H. and Altas (1991). Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gen probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 597-600

Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Rainer, J.E., Nguyen, P.N. and Cashey, C.T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* **16**:11141-11156

Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the EnviroAmp *Legionella* PCR kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 407-412

Ferrer, F. (1992). Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl.* **2**: 1-9

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. (ed.). 1990. PCR protocols. Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. New York

Josephon, K.L., Gerba C.P. and Pepper (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3513-3515

Palmer, C.J., Bonilla, G.F., Roll, B., Paszko-Kolva, Sanggermano, L.R. and Fujioka, R.S. (1995).

Picard, C., Ponssonnet, C., Paget, E., Nesme, X. and Simonet, P. (1992). Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2717-2722

Tsai, Y.L. and Olson B.H. (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2292-2295

Wilson, D.A., Yen-Lieberman, B., Reischl, U., Gordon, S. M. and Procop, G.W. (2003). Detection of *Legionella pneumophila* by Real-Time PCR for the *mig* Gene. *Jour. Clin. Microbiol.* **41**: 3327-3330