



## “COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA TIPIFICACIÓN DE ACTINOBACTERIAS PATÓGENAS DE ANIMALES”

García García Luis Ángel<sup>1</sup>, Aguirre Garrido José Félix<sup>1</sup>, Ramírez Duran Ninfa<sup>2</sup>, Ramírez Saad Hugo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, México, D.F., C.P:04960; <sup>2</sup>Fac de Medicina, UAEM

E-mail: angelgarcia\_2618@hotmail.com

*Palabras clave: clampless DGGE, IGS.*

**Introducción.** Los análisis de polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) y los análisis heteroduplex de las IGS han sido usados para la diferenciación entre aislados estrechamente relacionados, pero estos métodos son típicamente poco sensibles para detectar diferencias pequeñas entre pares de bases. El análisis del polimorfismo de la región espaciadora intergénica (IGS) 16S-23S rDNA se ha convertido en una herramienta cada vez más utilizada en la tipificación de bacterias (2). Se ha propuesto abordar este polimorfismo mediante el uso de clampless DGGE, que en teoría permitirá detectar pequeñas diferencias.

En el presente trabajo, se analizó la capacidad de dos métodos moleculares; DGGE y clampless-DGGE para la tipificación de actinomicetos patógenos, comparándolos con el análisis de secuenciación del gen 16S rRNA.

**Metodología.** Las cepas de actinomicetos se obtuvieron de heridas de equinos, procedentes de diversas granjas del Estado de México. Se cultivaron y se les extrajo DNA (Wizard Kit, Promega). Se amplificaron por PCR las siguientes regiones: gen 16S rRNA completo (para secuenciación), las regiones V6 – V8 del gen 16S rRNA (DGGE con clamp GC) y las IGS 16S-23S rDNA (clampless DGGE). Los dos tipos de amplicones para DGGE se corrieron en un gel con gradiente 30-65% de desnaturalizantes.

**Resultados.** El análisis de los patrones de DGGE con GC clamp y “clampless”, mostró que la segunda técnica produce patrones más complejos, que permitieron formar 8 grupos (C-1 a C-8), para las nueve cepas. Mientras que con los patrones obtenidos con GC clamp sólo se pudieron formar 4 grupos (GC-1 a GC-4). Esto permitiría suponer que la capacidad de discriminación del clampless DGGE es superior.

Sin embargo, cuando se confrontan estos resultados con los de secuenciación, observamos que los patrones de GC-DGGE coinciden

totalmente con la identificación basada en el análisis de secuencias (Tabla 1).

**Tabla 1.** Agrupación de las cepas mediante tres enfoques moleculares.

Cepa	Secuenciación	% de similitud	V6-V8 DGGE	Clampless DGGE
ARC-1	<i>Nocardiosis sp.</i>	100	GC-1	C-1
ARC-12	<i>Nocardiosis sp.</i>	100	GC- 1	C- 8
ARC-15	<i>Nocardiosis tangguensis</i>	97.37	GC- 4	C- 7
ARC-16	<i>Nocardiosis tangguensis</i>	97.86	GC- 4	C- 6
ARC-18	<i>Corynebacterium sp.</i>	99.36	GC- 3	C- 5
ARC-19	<i>Nocardiosis sp.</i>	89.61	GC- 1	C- 4
ARC-20	<i>Nocardiosis sp.</i>	97.86	GC- 1	C- 3
ARC-21	<i>Streptomyces macrosporeus</i>	99.43	GC- 2	C- 2
ARC-22	<i>Streptomyces macrosporeus</i>	99.43	GC-2	C-2

**Conclusiones.** El análisis filogenético permitió identificar y separar las cepas de interés para esta investigación y comprobó que el género predominante en la colección es *Nocardiosis*.

A pesar de las ventajas que presenta la técnica de clampless DGGE, sobre GC-DGGE, los resultados obtenidos demuestran que su utilización para estos fines no es adecuada, pues marca cómo diferentes cepas (ARC-1 y ARC-12) que tienen un 100% de similitud entre ellas. Se requieren mayores estudios a fin de determinar si estas cepas son realmente diferentes, o si sólo se trata de un artefacto de la reacción de PCR, debido al uso de primers degenerados.

### Bibliografía

- 1.-Yasuda M., Shiaris M. P.(2004). FEMS, Microbiology Letters, Vol. 243.
- 2.- Aguirre, G. F. (2005). “Seguimiento de la comunidad bacteriana en suelos contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en biorreactores de fase semisólida”. (Tesis de Maestría). UAM-Iztapalapa. pp. 34-39