

Empleo de la técnica hibridación *in situ* fluorescente para visualizar microorganismos

Use of fluorescence *in situ* hybridization technique to visualize microorganisms

Raúl Rodríguez Martínez¹

RESUMEN

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH), es una técnica que emplea sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos las cuales van dirigidas hacia secuencias específicas del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), lo que permite la identificación rápida y específica de células microbianas ya sea que estén como células individuales o se encuentren agrupadas en su ambiente natural. El conocimiento de la composición y distribución de los microorganismos en los hábitats naturales, proporciona un soporte sólido para comprender la interacción entre las diversas especies que componen el micro hábitat. El objetivo de la revisión es presentar la forma como ha evolucionado la hibridación, el empleo del ARNr como molécula diana, los tipos de marcaje, los marcadores fluorescentes empleados hoy en día, la metodología, así como las mejoras que se le han hecho a la técnica FISH al emplearse en conjunto con otras técnicas en la identificación microbiana. *Salud UIS* 2011; 43 (3): 307-316

Palabras claves: FISH, sonda de oligonucleotidos, ARNr, diagnóstico microbiano, fluorocromo, hibridación

1. Grupo de Recursos Naturales. Facultad de Salud. Universidad de Pamplona, Norte de Santander, Colombia
Correspondencia: Raúl Rodríguez Martínez. Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, MSc, PhD. Grupo de Recursos Naturales. Docente de la Facultad de Salud. Universidad de Pamplona. Dirección: Pamplona (N.S) Ciudadela Universitaria, Km. 1 vía Bucaramanga. Teléfono: 3186938622. Correo electrónico: rrodriguez@unipamplona.edu.co
Recibido: 22 de Agosto de 2011 **Aprobado:** 3 de Septiembre de 2011

ABSTRACT

Fluorescence in situ hybridization (FISH), is a technique that uses oligonucleotides probes labeled with fluorochromes which are directed to specific sequences of ribosomal ribonucleic acid (rRNA), this allows the rapid and specific identification of microbial cells whether as individual cells or grouped cells in their natural environment. Knowledge of the composition and distribution of microorganisms in natural habitats provides a solid support to understand interaction between different species in the microhabitat. This review shows how hybridization has evolved, the use of rRNA as target molecule, the type of labeling, the labeled uses today in fluorescent and the methodology, as well as the improvements that have been made to the FISH technique when is used in conjunction with other techniques in microbial identification. *Salud UIS* 2011; 43 (3): 307-316

Keywords: FISH, oligonucleotides, probes, rRNA, microbial diagnostic, fluorochromes, hybridization

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos primordiales que se tienen en cuenta al momento de realizar el diagnóstico microbiano, es lograr la identificación en tiempos cortos y a la vez con gran precisión de los organismos que se encuentran presentes en su ambiente natural. Los métodos tradicionales basados en el aislamiento del microorganismo en medios de cultivo, muchas veces necesitan de periodos largos de incubación así como el empleo de medios complejos y enriquecidos, sin que en ocasiones reflejen la población exacta o la mezcla de las comunidades bacterianas presentes en el microhabitat^{1,2}.

El análisis microscópico usando tinciones como Gram o Ziehl Nelsen, tienen la ventaja de ser técnicas rápidas y económicas, permiten la visualización directa y proporcionan características básicas de la bacteria al proveer información de la estructura de la pared celular. Sin embargo, debido a la escasa diferencia morfológica que se presenta entre familias bacterianas, estos métodos de coloración microbiológica no permiten una adecuada identificación, además requieren que el microorganismo se pueda cultivar en el laboratorio.

Con la llegada de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus diferentes variantes, se facilitó la detección rápida y sensible de casi cualquier organismo independiente de si estos pudieran ser o no cultivados. Aun así, estos métodos no dan información acerca de la morfología, número, distribución espacial o el microambiente en el que se desarrolla el organismo³. Otro método de detección ha sido mediante técnicas de inmunofluorescencia que utilizan anticuerpos monoclonales específicos para cada especie. Sin embargo, esta técnica es difícil de implementar por las uniones inespecíficas que se presentan, a la vez que depende de la variación y

expresión de antígenos fenotípicos y así mismo, el tamaño del anticuerpo puede limitar el acceso del antígeno a los tejidos o biopelículas^{4,5}.

En contraste con los métodos expuestos, la identificación empleando la técnica de FISH combina la precisión de la genética molecular, con la información visual de la microscopía, lo cual permite la identificación y visualización de la célula microbiana individual dentro de su microhabitat natural o tejido en el que se encuentre presente^{6,7}.

Es necesario destacar que la visión de la sistemática microbiana ha cambiado debido al análisis comparativo de secuencias homólogas de ácidos nucleicos, en especial de moléculas de ARN ribosomal (ARNr) y los genes que ellos codifican⁸. Desde su primera aplicación como “tinción filogenética” en 1989, nombre que se dio a la técnica en la que se empleaba la sonda de oligonucleótidos marcada con un reactivo fluorescente y dirigida hacia la molécula de ARNr 16S, se ha constituido en una herramienta de uso común para la identificación directa de células bacterianas individuales, independientemente de si puedan o no ser cultivadas⁹.

Esta revisión se enfoca hacia los desarrollos metodológicos de FISH mostrando las diversas formas que se marcan las sondas de ADN que van dirigidas hacia una zona específica del ARNr, así mismo los tipos de fluorocromo existentes, los pasos a tener en cuenta al realizar la técnica de hibridación, y el empleo de FISH junto con otras técnicas.

Bases moleculares de la hibridación

La hibridación se basa en la unión de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos que da origen a estructuras de doble hebra, las cuales pueden ser híbridos ADN-

ADN, ARN-ARN (ambos homodúplex) ó ADN-ARN (heterodúplex). El apareamiento se da por la complementariedad de bases a través de los puentes de hidrógeno que se forman entre adenina-timina (ADN) o uracilo (ARN) y citosina-guanina (ADN y ARN)¹⁰ (Figura 1).

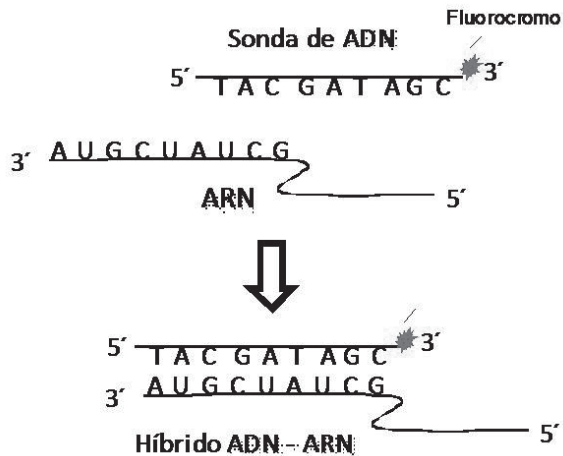


Figura 1. Principios de la hibridación. El apareamiento se puede presentar entre nucleótidos complementarios de moléculas de ADN-ADN o como lo muestra la figura entre cadenas ADN – ARN en la que A se aparea con U y G con C.

En las técnicas de hibridación se parte de dos moléculas de ácidos nucleicos: una homogénea de secuencia conocida que actúa como sonda y la otra heterogénea de secuencia desconocida, la cual contiene la secuencia diana que se quiere detectar. Para visualizar si existe hibridación una de las dos cadenas debe estar marcada. Si se marca la sonda, la hibridación es estándar, pero si lo está la molécula diana, la hibridación es reversa.

Los ácidos nucleicos de partida son de cadena sencilla, pueden proceder de ADN clonado y fragmentado por enzimas de restricción, o mediante oligonucleótidos sintéticos. La hibridación puede producirse en medio líquido o sobre un soporte sólido, como nitrocelulosa, al que se encuentra unida una de las dos poblaciones de ácidos nucleicos. Como se comentó antes, las técnicas de hibridación se utilizan a menudo para detectar una molécula diana partiendo de una sonda complementaria a ella. A raíz de esto, muchas técnicas moleculares están basadas en la hibridación, entre ellas la PCR (reacción en cadena de la polimersa) o las tecnologías Northern Blot, Southern Blot, microarrays de ADN, screening de genotecas o la hibridación *in situ*¹⁰.

Historia

La hibridación *in situ* se desarrolló de manera independiente por dos grupos de investigadores^{11,12}. ADN o ARNr 28S marcados radiactivamente fueron hibridados para preparaciones citológicas de oocitos de *Xenopus* y visualizados por micro-autoradiografía. Esta técnica permitió que la secuencia de ácidos nucleicos fueran detectados dentro de la célula sin alterar la morfología celular o la integridad de sus compartimentos. El uso de Hibridación *in situ* para “contar e identificar organismos” fue propuesto por Olsen¹³, y luego introducida a la bacteriología en el año 1988 por el grupo de Giovannoni, quienes fueron los primeros en utilizar sondas de oligonucleótidos marcadas radiactivamente y dirigidas al ARNr, para la detección microscópica de bacterias¹⁴.

Con el desarrollo de marcadores fluorescentes, los marcadores radioactivos fueron sustituidos por colorantes no isotópicos¹⁵. En 1989, DeLong y su equipo de trabajo emplearon oligonucleótidos marcados con fluorocromos para detectar células microbianas crecidas de manera individual⁹. Comparada con las sondas radiactivas, las sondas fluorescentes son seguras, tienen mayor resolución y no necesitan ningún paso adicional para su detección. Además, las sondas fluorescentes se pueden marcar con colorantes de diferente emisión de longitud de onda, permitiendo de esta manera detectar varios tipos de sondas en un mismo experimento¹⁶.

ARN ribosomal como molécula diana para FISH

Las bacterias y arqueobacterias contienen ARNr de 5S, 16S y 23S, con tamaños de aproximadamente 120, 1500 y 3000 nucleótidos respectivamente. En microbiología la molécula diana más usada para FISH es el ARNr 16S, debido a que se puede encontrar en todos los organismos vivos, es relativamente estable y presenta un elevado número de copias, generalmente algunos miles por célula y además contiene regiones tanto variables como muy conservadas¹⁷.

El incremento de secuencias del gen ARNr 16S que aparecen en las bases de datos ha facilitado la identificación por FISH de la mayoría de microorganismos, especialmente cuando se quiere identificar poblaciones microbianas que no se pueden cultivar⁸⁻¹⁸. El alto número de copias del gen ARNr 16S en cada replicación y en células metabólicamente activas, ofrecen suficientes moléculas diana que permiten visualizar células bacterianas individuales, aun cuando se encuentren formando parte de una asociación.

Las bases de datos publicas incluyen la secuencia del ARN 16S de la mayoría de las especies microbianas cultivadas, así como de muchas secuencias aisladas directamente del ambiente^{19,20}. Las secuencias del gen ribosómico se pueden consultar libremente en bases especializadas, como por ejemplo la del laboratorio europeo de biología molecular (EMBL), el RDP *The Ribosomal Database Project* o el GenBank que es la base de datos de secuencias nucleotídicas del NCBI. Por otra parte, se han realizado trabajos los cuales muestran la factibilidad y las limitaciones del análisis comparativo de secuencias ARNr 16S y del diseño de sondas del ARNr²¹, además del empleo de ARNr 23S^{22,23}, del uso del gen ribosómico 18S^{24,25} y recientemente del ARNm, que también ha sido detectado exitosamente por FISH^{26,27}.

Sondas y marcaje

En la selección de sondas para FISH se debe considerar la especificidad, la sensibilidad y la facilidad para penetrar los tejidos. Una sonda típica de oligonucleótidos presenta entre 15-30 bases de longitud y se construye en un sintetizador automatizado. Un ejemplo es la sonda universal EUB 338, que es específica para la mayoría de células del dominio bacteria (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3')²⁸.

Hay diferentes vías de marcaje (**Figura 2**). La marcación directa con fluorescencia, es la más común y también la vía más rápida, económica y fácil, ya que no requiere ningún paso adicional para su detección luego de la hibridación²⁹. Una o más moléculas teñidas con el compuesto fluorescente son unidas directamente al oligonucleótido, tanto químicamente durante la síntesis a través de uniones amino al extremo 5' de la sonda (**Figura 2a**) o enzimáticamente usando transferasas terminales que se unen al extremo 3' del nucleótido (**Figura 2b**)²⁹.

En la detección indirecta, la sensibilidad de FISH se incrementa al unir la sonda a moléculas como digoxigenina (DIG), la cual es luego detectada por un anticuerpo fluorescente (**Figura 2c**)³⁰. De igual manera, el empleo de enzimas amplifican la señal y por ende la sensibilidad del FISH. En este caso, los oligonucleótidos son marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) que usa fluoresceína tiramida (TSA) como sustrato (**Figura 2d**). Probablemente la técnica más sensible sea el uso combinado de sondas de polirribonucleotidos marcados con digoxigenina y TSA (**Figura 2e**), ya que se ha encontrado que la TSA incrementa entre 10-20 veces la intensidad de la señal^{31,32}.

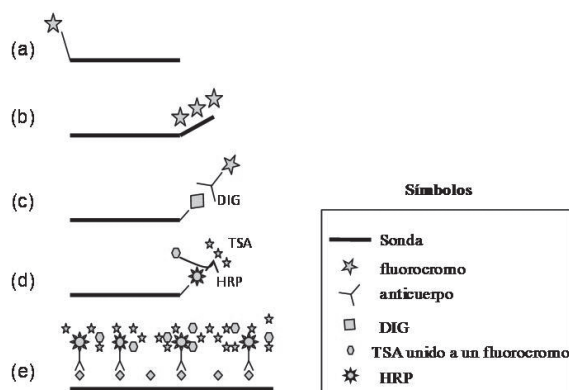


Figura 2. Marcaje de las sondas. a y b directo; c, d y e indirecto usando digoxigenina (DIG), peroxidasa de rábano (HRS) o amplificando la señal con tiramida (TSA).

Marcadores fluorescentes

El uso de fluorocromos de diferente longitud de onda de excitación y máxima emisión permite la detección simultánea de dos o más microorganismos, para esto se debe contar con un microscopio que permita observar los diversos espectros de colores del FISH. El empleo combinado de fluorocromos debe tener picos de emisión en los que no se presente solapamiento de espectros entre las sondas. Los marcadores que sean más fotoestables se deben usar en muestras con baja cantidad de sitios diana.

Dentro de los marcadores más usados en FISH para estudios microbiológicos (**Tabla 1**), están los derivados de la fluoresceína, fluoresceína isotiocianato (FITC) y 5-(6) carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida ester (FluoX). De los derivados de la rodamina se encuentran la tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC) y el rojo Texas.

Entre los colorantes de cianina de amplia longitud de onda están Cy5.5- Cy7, los cuales son excitados en la región roja del espectro (675 nm) y emiten en el rojo lejano (760 nm). Existen además fluoróforos de la familia Alexa fluor y partículas de cristal nanométricas llamados “puntos cuánticos” que son ampliamente utilizados, estos fluoróforos permiten observar un brillo intenso y son más fotoestables^{33,34}.

La selección de un sitio específico del gen ARNr, el diseño de la sonda así como el tipo de marcaje se debe realizar con especial cuidado porque de esto depende en parte, la calidad de la hibridación y la visualización de las células. Generalmente las sondas son diseñadas empleando la información de la secuencia de las bases

Tabla 1. Propiedades de algunos fluorocromos utilizados para la detección de microorganismos por FISH.

Fluorocromo	Longitud de onda (nm)		Color
	Excitación	Emisión	
AMCA (7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid)	351	450	Azul
FITC (Fluoresceína Isotiocianato)	492	528	Verde
FluoX 5-(-6-)carboxifluoresceína –N-hidroxisuccimida – ester	488	520	Verde
Tetrametil Rodamina Isotiocianato (TRITC)	557	576	Rojo
Rojo Texas	578	600	Rojo
Derivados de la Indocianina			
Cy3 indocarbocyanine	550	570	Rojo/
Cy5.5 benzindodicarbocyanine	675	694	naranja
Cy7 indotricarbocyanine	743	767	Infrarojo
Alexa fluor 790	790	810	infrarojo

de datos mediante paquetes informáticos como el ARB35, o el sistema SILVA el cual da información actualizada de secuencias de ARNr de los dominios Bacteria, Archaea y Eucaria²⁰.

Aspectos metodológicos de FISH

Un protocolo típico para FISH incluye 4 pasos: fijación y permeabilización de la muestra, hibridación, lavado y la detección de las células marcadas mediante el uso del microscopio de epifluorescencia o confocal (**Figura 3**).

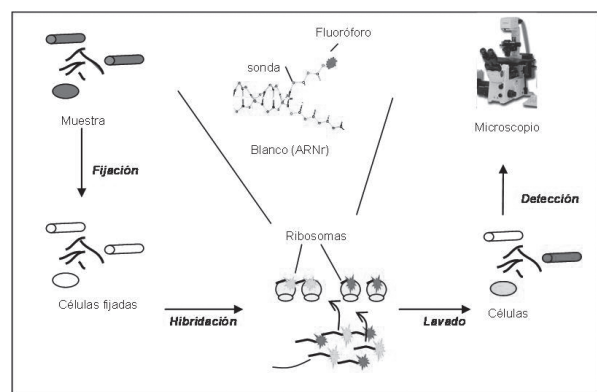


Figura 3. Diagrama de Flujo de un típico procedimiento de FISH.

Fijación y permeabilización

Antes de la hibridación, el cultivo, la muestra o tejido que contiene microorganismos deben ser fijados para estabilizar las macromoléculas y estructuras del citoesqueleto, evitando así la lisis de las células durante la hibridación. Además, este paso favorece la permeabilización de las membranas celulares lo cual facilita la penetración de la sonda fluorescente dentro

de la célula y protege al ARN de la degradación por ribonucleasas endógenas. La fijación puede emplear agentes precipitantes como etanol o metanol, agentes que forman entrecruzamientos como paraformaldehído 4%, formaldehído 4%, o glutaraldehído 1%, o una mezcla de ellos^{6,36}. Se debe considerar que una buena fijación mantiene muy bien la morfología celular, pero el incremento en el entrecruzamiento puede disminuir la accesibilidad a la molécula diana.

Las condiciones de fijación y permeabilización pueden variar dependiendo del organismo y del tipo de muestra o de tejido. Aunque la permeabilización es un paso crucial para obtener resultados satisfactorios a veces resulta difícil de optimizar y está sujeto al tipo de célula microbiana o muestra donde se encuentre presente. En general el empleo de formaldehído o paraformaldehído entre un 3-4% (v/v) es suficiente para la mayoría de bacterias Gram negativas. Para organismos Gram positivos se recomienda el empleo de etanol (50%), etanol-formalina (9:1 v/v), el tratamiento con calor²⁸, o el empleo de lisozima y/o lisostafina³⁷.

Previo a la permeabilización, las muestras deben ser puestas en láminas de vidrio, y con el fin de mantener una adherencia adecuada y que no se desprendan durante el procesamiento, se recomienda cubrir la superficie con ciertos compuestos como gelatina, Poly-L.lisina³⁸ o hidruro de silicio (IV)²⁹. Cuando se trabaja con suspensión de células microbianas, una vez fijadas y colocadas en la lámina de vidrio, se dejan secar al ambiente y luego son deshidratadas en soluciones crecientes de alcohol (50-70-96%) lo cual ayuda a permeabilizar las células.

Al emplear FISH en cortes de tejidos, los pre-tratamientos se aplican para incrementar el acceso de la sonda al objetivo específico y disminuir las uniones a los sitios no específicos³⁹. En cortes realizados en tejidos incluidos en parafina, primero se debe realizar el procedimiento de des-parafinado empleando xileno y alcohol⁴⁰. Además, se puede realizar un pre-tratamiento empleando proteinasa K para tejidos con parafina o para cortes en frío⁴¹, o cuando se trabaja con muestras ambientales, se puede utilizar la mezcla de de lisozima y proteinasa K⁴².

Se ha usado la técnica de FISH en tejidos que han sido incluidos en cierto tipo de resinas poliméricas en las cuales se obtiene una excelente conservación histológica, así como una eficiente visualización de las células sin que se requiera de ningún pre-tratamiento de digestión^{43,44}.

Hibridación

La hibridación es la capacidad que tiene la sonda de ADN para aparearse, unirse y formar moléculas de cadena doble. En este paso se requiere de un tampón de hibridación el cual de manera estándar contiene NaCl 5 M, Tris / HCl 1 M, Formamida, agua destilada y SDS al 10%⁴⁵. La muestra fijada se incuba en el tampón que contiene la sonda marcada, sometida a calentamiento y cuando la temperatura alcanza el punto de fusión del ácido nucleico, la sonda de oligonucleótidos de interés la cual está marcada con un fluorocromo, se une a la secuencia escogida del ARNr. La temperatura varía para los diferentes organismos, dependiendo sobre todo del contenido en pares guanina-citosina, G-C, que son los que confieren mayor estabilidad a la molécula²⁷.

En el procedimiento de FISH, la hibridación se realiza en la oscuridad en una cámara húmeda, con temperaturas entre 37°C a 50°C y con tiempos que oscilan entre 30 minutos y varias horas. La hibridación se puede llevar a cabo bajo condiciones astringentes para obtener un óptimo anillamiento, en este caso, el tampón de hibridación es precalentado y luego es aplicado a la muestra que contiene la sonda marcada. El nivel de astringencia se puede ajustar variando tanto la concentración de formamida o la temperatura de hibridación⁴⁵.

La función que cumple la formamida es debilitar las uniones de hidrogeno de los duplex ADN-ADN y ADN-ARN, permitiendo de esta manera que se pueda bajar la temperatura de anillamiento al incrementar el nivel de astringencia²⁹. La formamida reduce la Tm entre 0.6-

0.72°C por porcentaje utilizado, así mismo, reduce el ruido de fondo en la hibridación. En la hibridación de micro ARN (miARN) en vez de la formamida con el cual se presentan pérdidas de miARN, se ha utilizado el compuesto 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida que inmoviliza las moléculas en su extremo 5' fosfato⁴⁶.

Lavado

Pasado el tiempo de hibridación, las láminas son lavadas con agua destilada para remover la sonda que no se unió. Si se requiere se puede realizar un lavado pos-hibridación en condiciones astringentes, en este caso el tampón de lavado se debe preparar variando la concentración de sales que de manera estándar contiene NaCl 5 M, Tris / HCl 1 M, EDTA 0.5 M (sólo si se ha usado formamida > 20% en la hibridación) agua destilada y SDS al 10%⁴⁷. Vale la pena señalar que la astringencia en la solución de lavado se logra ajustando la concentración de NaCl, esto evita el uso de cantidades excesivas de formamida.

Si se utiliza el tampón de lavado, se adiciona un poco a la lámina con la muestra y la lámina se transfiere a un tubo que también contiene tampón de lavado pero precalentado (48°C) y se incuba durante 25 min a 48 °C (en baño de maría). Finalmente las laminas portaobjetos son lavadas con agua destilada una vez más y secadas al ambiente. Para evitar la pérdida de fluorescencia antes de observar al microscopio se debe adicionar al montaje compuestos “antifading” como el gelvatol o citifluor.

Visualización

El paso final de la hibridación *in situ* es la detección de la sonda marcada que hibridó con las células. Se requiere de un microscopio de epifluorescencia equipado con diferentes filtros para los diversos espectros de color, en este caso se debe tener en cuenta el tipo de fluorocromo con el que fue marcada la sonda y de esta manera emplear la longitud de onda adecuada que excitará el fluorocromo y emitirá la fluorescencia.

La tecnología de procesamiento digital de imágenes mejora la detección de la señal mediante la aplicación de técnicas, que en últimas, busca procesar una imagen con el fin de hacerla más adecuada para una determinada aplicación o procesamiento posterior. El sistema más sensible utilizado en FISH es mediante el empleo de la cámara CCD (*Charge Coupled Device*), la cual detecta fotones con una alta eficacia sobre rangos de amplio espectro de longitud de onda y que además, mediante un paquete informático apropiado para el análisis de

imágenes, permite la digitalización y manipulación de las mismas.

Otro equipo usado para FISH es el microscopio láser confocal (CLSM). Al restringir la señal a una sección fina de la muestra que se investiga, la fluorescencia desenfocada es removida, lo cual genera imágenes más definidas. El sistema es muy sensible y es de gran ayuda en muestras críticas donde se presenta una baja intensidad de la señal como muestras densas de cortes de biopsias, tejidos lodos, o bio-películas, así mismo, el CLSM ha permitido el recuento de microorganismos presentes en la muestra^{48,49}.

Empleo de FISH con otras técnicas

A medida que se ha utilizado FISH en diversas áreas del conocimiento, se han introducido otras técnicas que permiten trabajar con una mayor sensibilidad y a la vez corregir inconvenientes que se presentan con el uso de la técnica convencional.

Una de las dificultades del empleo de FISH se debe al bajo contenido del ARNr que puedan tener los organismos, lo que conlleva a que se generen señales de fluorescencia muy tenues que podrían no ser detectables al enmascarse con la fluorescencia de fondo que presente la muestra. Esta limitación puede ser mejorada por modificaciones del ensayo, mediante el empleo de CARD-FISH (*catalyzed reporter deposition*), la cual se basa en la deposición de un gran número de moléculas marcadas con tiramina (componente fenólico) por actividad de la peroxidasa la cual está acoplada a la sonda de oligonucleótidos, lo que incrementa la sensibilidad de la detección de las células hasta en 12 veces, en el caso de que exista un bajo número de copias del ARNr³⁶.

Así mismo, las sondas PNA (*Peptide Nucleic Acid*) se han introducido dentro de las técnicas de hibridación. Los PNAs son análogos del ADN (pseudopéptidos) pero en lugar del azúcar fosfato tienen un esqueleto de poliamida el cual no tiene carga. Comparado con las sondas tradicionales de ADN, son estables a la degradación, hibridan con las secuencias complementarias con una alta afinidad y mejoran la cinética de hibridación^{7,49}. Usualmente las sondas de PNAs son más cortas que los oligonucleótidos convencionales requeridos para uniones específicas. Debido a su esqueleto de carga neutra, los PNAs difunden a través de paredes celulares hidrofóbicas y se han utilizados para la exacta cuantificación y la distribución espacial de cada una de las especies que se encuentran presentes en biopelículas donde existe una comunidad polimicrobiana⁵¹.

Con el fin de mejorar los métodos para detectar y caracterizar variantes de ARN *in situ*, se ha desarrollado una técnica que combinan los PNA-FISH con la transmisión de energía de resonancia (FRET) mediante microscopía confocal⁵². FRET permite investigar las interacciones moleculares, las cuales dependen de la transferencia de energía de un fluoróforo a otro fluoróforo cuando dos moléculas se encuentran en proximidad cercana. FRET basado en la hibridación *in situ* fluorescente de PNA (FP-FISH) ofrece nuevas herramientas que permiten la caracterización a nivel sub-celular tanto de la ubicación o estructura isofórmica del ARN, como de la amplia variedad de interacciones que se presentan entre ARN-ARN que estén en distancias muy cercanas.

El empleo de FISH con la espectrofotometría de masa iónica (FISH- NanoSIMS), facilita el análisis metabólico de células individuales a partir de grupos filogenéticos microbianos^{53,54}. La principal ventaja que presenta esta técnica es la capacidad de correlacionar la identidad filogenética del gen ARNr 16S con la función metabólica específica que tiene.

Por otra parte, con el advenimiento de las tecnologías “ómicas” los estudios apuntan al empleo de FISH con la metagenómica, transcriptómica y proteómica. Con la metagenómica se persigue obtener secuencias del genoma de los diferentes microorganismos que componen una comunidad, mediante la extracción y análisis del ADN de forma global, lo que hace que en conjunto con FISH sea una herramienta útil para acceder a la elevada biodiversidad de las muestras ambientales, obviando las dificultades encontradas en el cultivo en laboratorio de determinados microorganismos⁵⁵.

CONCLUSIONES

Es importante destacar que hoy en día los estudios tendientes a la identificación de nuevas especies microbianas están enfocados a conocer la composición y distribución de los microorganismos que se encuentran presentes en sus diferentes hábitats ya sean tejidos, nódulos, suelo, etc. Gracias a técnicas de identificación molecular como lo es la hibridación *in situ* que emplea marcadores genéticos y, de manera tradicional el gen ribosómico 16S, ha permitido la localización y cuantificación de células microbianas sin importar el lugar que se encuentren. Esto es posible debido a que el alto número de copias del gen ARNr 16S que se obtiene en cada replicación y en células metabólicamente

activas, ofrecen suficientes moléculas diana que permiten visualizar bacterias de manera individual, aun cuando se encuentren formando parte de una asociación.

Mediante el uso de sondas específicas de especie, se favorece la identificación de los diferentes microorganismos presentes en el complejo de comunidades, lo cual proporciona un soporte sólido que facilita entender la interacción que hay entre las diversas especies que componen el micro-hábitat. En este contexto, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es considerada una poderosa herramienta para estudios filogenéticos, ecológicos, ambientales y de diagnóstico, debido que provee información acerca de la presencia, número, morfología y distribución espacial de las células microbianas, para lo cual la técnica FISH también se ha valido del apoyo de otras tecnologías que han surgido y que le permite ser cada vez más selectiva eliminando los inconvenientes que surgen al aplicarla en diferentes muestras.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Salud de la Universidad de Pamplona, Norte de Santander y al departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca, España, por todo el material bibliográfico aportado para la realización del artículo.

CONFLICTO DE INTERESES

Este trabajo no presenta ningún tipo de conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Amann RI, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12: 231-236.
- Josephson KC, Gerba CP, Pepper IL. Cultural methods. In: Raina MM, Ian LP, Charles PG, Eds. *Environmental Microbiology*. San Diego California: Elsevier Academic Press, 2009. p.213-217
- Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa A, *et al*. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Res* 2010; 44: 4325-4339.
- Szwerinski H, Gaiser S, Bardtke D. Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria: interference of the test in biofilm reactors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1985; 21: 125-128.
- Betscheider D, Jose J. Nile blue A for staining *Escherichia coli* in flow cytometer experiments. *Anal Biochem* 2009; 384:194-196.
- Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 339-348.
- Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, Jardim T, Keevil CW, Vieira MJ. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int J Mol Sci* 2008; 9:1944-1960.
- Thiele S, Fuchs B, Amann R. Identification of microorganisms using the ribosomal RNA approach and fluorescence in situ hybridization. In *Treatise on water science*. 2011, vol 3, Chap 3.08, Pag171-189. Ed. Frimmel, F. and P. Wilderer. Elsevier, Kidlington, UK.
- Delong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* 1989; 243: 1360-1363.
- Luque J, y Herráez Á. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Ed. Elsevier, 2001. Tema 13, Pag. 163-169.
- John H, Birnstiel M, Jones K. RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature* 1969; 223: 582-587.
- Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1969; 64:600-604.
- Olsen G, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 1986; 40: 337-365.
- Giovannoni SJ, Delong EF, Olsen GJ, Pace NR. Phylogenetic group-specific oligo deoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J Bacteriol* 1988; 170: 720-726.
- Landegent JE, Jansen in de Wal N, Baan RA, Hoeijmakers JH, Van Der Ploeg M. 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp Cell Res* 1984; 153: 61-72.
- Pernthaler A, Amann R. Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5426-5433.
- Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51: 221-271.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B,

- Farris RJ, *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 141-145.
19. Van De Peer Y, De Rijk P, Wuyts J, Winkelmann T, De Wachter R. The European small subunit ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 175–176.
 20. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs B, Ludwig W, Peplies J, *et al.* SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nuc Acids Res.* 2007;35(21):7188-7196
 21. Hoshino T, Yilmaz LS, Noguera DR, Daims H, Wagner M. Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 5068-5077
 22. Fernández J, Avendaño-Herrera R. Analysis of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* strains isolated from fish. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 299: 184-192.
 23. Spletstoesser WD, Seibold E, Zeman E, Trebesius K, Podbielski A. Rapid differentiation of *Francisella* species and subspecies by fluorescent in situ hybridization targeting the 23S rRNA. *BMC Microbiol* 2010; 10: 72-86.
 24. Spear RN, Li S, Nordheim EV, Andrews JH. Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence in situ hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*. *J Microbiol* 1999; 35: 101–110.
 25. Vaultot D, Eikrem W, Viprey M, Moreau H. The diversity of small eukaryotic phytoplankton (< or =3 microm) in marine ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 795-820.
 26. Pilhofer M, Pavlekovic M, Lee NM, Ludwig W, Schleifer KH. Fluorescence in situ hybridization for intracellular localization of nifH mRNA. *Syst Appl Microbiol* 2009; 32: 186-192.
 27. Pernthaler A. Identification of Environmental Microorganisms by Fluorescence in situ Hybridization. In: Timmis KN, McGenity T, Van der Meer JR, Lorenzo V, eds. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin-Heidelberg: Springer, 2010. p. 4127-4135.
 28. Silverman AP, Kool ET. Oligonucleotide probes for RNA-targeted fluorescence in situ hybridization. *Adv Clin Chem* 2007; 43: 79-115.
 29. Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microb Methods* 2000; 41: 85-112.
 30. Zarda B, Amann R, Wallner W, Schleifer K H. Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 2823–2830.
 31. Schönhuber W, Fuchs B, Juretschko S, Amann R. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ Microbiol* 2007; 63: 3268-3273.
 32. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Tyramide-Signaling-Amplification-TSA.html>
 33. Berlier JE, Rothe A, Buller G, Bradford J, Gray DR, Filanoski BJ, *et al.* Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: Fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1699-1712.
 34. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 2005; 307: 538-544.
 35. Wolfgang L, Oliver S, Ralf W, Lothar R, Harald M, Yadhukumar, *et al.* ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 2004; 32: 1363-1371.
 36. Zwirgmaier K. Detection of prokaryotic cells with fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 2010; 659: 349-62.
 37. Lawson TS, Connally RE, Iredell JR, Vemulpad S, Piper JA. Detection of *Staphylococcus aureus* with a fluorescence in situ hybridization that does not require lysostaphin. *J Clin Lab Anal* 2011; 25: 142–147.
 38. Lee N, Nielsen PH, Andreasen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Schleifer KH, *et al.* Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1289–1297.
 39. Gupta A, Mo YY. Detection of microRNAs in cultured cells and paraffin embedded tissue specimens by in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 2011; 676: 73-83.
 40. Summersgill BM, Shipley JM. Fluorescence in situ hybridization analysis of formalin fixed paraffin embedded tissues, including tissue microarrays. *Methods Mol Biol* 2010; 659: 51-70.
 41. Loy JK, Dewhirst FE, Weber W, Frelief PF, Garbar TR, Tasca SI, *et al.* Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing

- hepatopancreatitis in shrimp. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 3439–3445.
42. Rodríguez MR. Análisis de la población bacteriana endófito presente en nódulos de *Lupinus*: interacción y localización *in situ*. [Tesis de doctorado]. Salamanca: Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. España; 2008.
 43. Sunde Pt, Olsen I, Gobel UB, Theegarten D, Winter S, Debelian GJ, *et al.* Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology* 2003; 149: 1095-1102.
 44. Cappitelli F, Principi P, Pedrazzani R, Toniolo L, Solini C. Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins, *Sci Total Environ* 2007; 385: 172-181.
 45. Fuchs BM, Pernthaler J, Amann R. Single cell identification by fluorescence *in situ* hybridization. In: Reddy CA, Beveridge TJ, Breznak J A, Marzluf G, Schmidt TM, Snyder LR, eds. *Methods for General and Molecular Microbiology*. 3rd edition. Washington: ASM Press; 2007. p. 886-896.
 46. Pena JT, Sohn-Lee C, Rouhanifard SH, Ludwig J, Hafner M, Mihailovic A, *et al.* miRNA *in situ* hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues. *Nature Methods* 2009; 6: 139 – 141.
 47. Alfreider A, Pernthaler J, Amann R, Sattler B, Glockner F, Wille A, *et al.* Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2138-2144.
 48. Stoecker K, Dorninger C, Daims H, Wagner M. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 922-926.
 49. Trujillo ME, Alonso-Vega P, Rodríguez R, Carro L, Cerda E, Alonso P, *et al.* The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME J* 2010; 4: 1265-1281.
 50. Malic S, Hill KE, Hayes A, Percival SL, Thomas DW, Williams DW. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization (PNA FISH). *Microbiology* 2009; 155: 2603-2611.
 51. Almeida C, Azevedo NF, Santos S, Keevil CW, Vieira MJ. Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA FISH). *PLoS One* 2011; 6: e14786.
 52. Blanco AM, Artero R. A practical approach to FRET-based PNA fluorescence *in situ* hybridization. *Methods* 2010; 52: 343-351.
 53. Behrens S, Lösekann T, Pett-Ridge J, Weber PK, Ng Wo, Stevenson Bs, *et al.* Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 3143–3150.
 54. Dekas AE, Orphan VJ. Identification of diazotrophic microorganisms in marine sediment via fluorescence *in situ* hybridization coupled to nanoscale secondary ion mass spectrometry (FISH-NanoSIMS). *Methods Enzymol* 2011; 486: 281-305.
 55. Lin W, Jogler C, Schüler D, Pan Y. Metagenomic analysis reveals unexpected subgenomic diversity of magnetotactic bacteria within the phylum *Nitrospirae*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 323-326.