

11219



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA
"DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA

*ESTANDARIZACIÓN DE LA Rep-PCR Y TIPIFICACIÓN
MOLECULAR DE Pseudomonas aeruginosa PARA
IDENTIFICACIÓN DE BROTES NOSOCOMIALES*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA
EN:

**INFECTOLOGÍA Y ECOLOGÍA
MÉDICA ADULTOS**

PRESENTA:

DRA. XÓCHITL LETICIA TORRES CARRILLO



México, D.F. Septiembre 2005.

0349556



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Investigador principal: Dra. Xóchitl Leticia Torres Carrillo¹

Asesor: M. en C. Alicia Ocaña Mondragón²

Coasesor: Dr. Felipe González Velázquez³

Colaboradores: Dr. César R. González Bonilla⁴

Q.B.P. Lourdes Osorio C.⁵

Dr. Ramón Fajardo V.⁶

¹Tesista, Residente 6 de la Especialidad de Infectología, Hospital de Infectología, CMNR.

²Adscrita a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología, CMNR.

³Investigador asociado, Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología, CMNR.

⁴Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología, CMNR.

⁵Jefe de Sección Bacteriología, Laboratorio Clínico, Hospital de Infectología, CMNR.

⁶Jefe del Servicio de Epidemiología, Hospital de Infectología, CMNR.

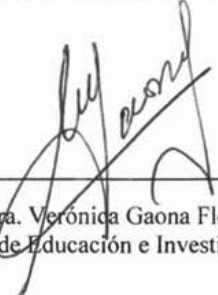
Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Torres Carrillo Xóchitl Leticia

FECHA: 27 sept 05


FIRMA: 

AUTORIZACIÓN DE TESIS

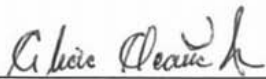


Dra. Verónica Gaona Flores
Coordinación de Educación e Investigación en Salud





Dra. Elena Urdez Hernández
Titular del Curso de Infectología y Ecología Médica



M. en C. Alicia Ocaña Mondragón
Asesor de tesis

Centro Médico la Raza
Hospital de Infectología



JEFATURA DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACION

AGRADECIMIENTOS

A mi papá Lic. Héctor Manuel Torres Sainz y a mi mamá C.P. María Esther Carrillo Castillo, por todo el apoyo que he recibido, porque sin ustedes esto no habría sido posible. Este logro es de ustedes.

A mi esposo Roberto García Graullera por su amor, comprensión y cariño aun en momentos difíciles, porque eres de lo mejor que me ha ocurrido en la vida. Gracias por estar conmigo.

A mis hijos Ana Cristina y Manuel Alejandro porque son la luz de mi vida, mi razón de ser y el motor principal de todo lo que emprendo.

A Alicia mi asesora de tesis, por su paciencia, comprensión, por hacerme sentir como en casa y porque aprendí mucho a su lado.

INDICE

	Página
Antecedentes.....	1
Justificación.....	5
Planteamiento del problema.....	6
Objetivos.....	6
Hipótesis.....	6
Material y Métodos.....	7
Variables.....	8
Descripción del estudio.....	10
Metodología:	
1. Aislamientos e identificación de bacterias gramnegativas.....	11
2. Estandarización de rep-PCR:	
2.1 Extracción de DNA con reactivo de trizol.....	11
2.2 Separación de DNA por electroforesis.....	12
2.3 Iniciadores y secuencias.....	13
2.4 Mezcla de reacción de PCR.....	14
2.5 Perfil térmico.....	14
2.6 Análisis de los patrones de banda generados por la rep-PCR.....	15
2.7 Aspectos éticos.....	15
2.8 Análisis estadístico.....	15
Resultados:	
Primera fase: Estandarización de la técnica:	
1.1 Estandarización de ERIC.....	19
1.2 Estandarización de REP.....	23
1.2.1 Extracción de DNA con DNAzol.....	24
1.2.2 Extracción de DNA por ebullición.....	25
1.3 Estandarización de BOX.....	27
Segunda fase: Aplicación de la técnica:	
1.1 Rep-PCR.....	30
1.2 Box-PCR.....	32
1.3 ERIC-PCR.....	34
Discusión.....	35
Conclusiones.....	38
Bibliografía.....	39

ANTECEDENTES

Las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias (IHH) son adquiridas por los pacientes como consecuencia de su atención en los hospitales. De acuerdo con el CDC (Centro para el Control de Enfermedades) de Atlanta, GA. USA. un caso de infección nosocomial se define como la condición localizada o generalizada resultante de la reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso o su toxina y que no estaba presente ni en período de incubación al momento del ingreso del paciente al hospital y que se presenta en 48 a 72 horas posteriores al ingreso hospitalario, definición que ha sido aceptada y adoptada en nuestro país publicada en el diario oficial de la federación el 30 de marzo del 2000 (1). Así mismo un brote epidemiológico de infección nosocomial es la ocurrencia de dos o más casos de infección nosocomial, asociados epidemiológicamente en un número mayor a lo esperado y en hospitales donde dicha ocurrencia epidemiológica sea nula, la presencia de un solo caso de define automáticamente como un brote de infección nosocomial (1). En nuestro país el programa nacional de Redes Hospitalarias de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) indica que ocurren en promedio en el 10% de los pacientes hospitalizados (el doble de lo reportado en E.U.), es decir una ocurrencia anual de 400,000 a 600,000 episodios con impactos desfavorables en la mortalidad, estancia hospitalaria y costos económicos. La mortalidad a causa de las mismas se estima en un 5-10%, es decir 40,000 a 60,000 fallecimientos al año (2,3)

Respecto al sitio afectado y agente causal de éste tipo de infecciones está estrechamente relacionado, por ejemplo las infecciones nosocomiales más comunes son las infecciones de vías urinarias y los gérmenes más frecuentemente aislados son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Cándida sp*, seguidas de las infecciones de dispositivos intravasculares causadas por *Staphylococcus epidermidis*, el más frecuente y también las neumonías por hipostatismo cuyo el germen etiológico más aislado es *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y especies de enterobacterias (4). En el Hospital de Infectología del CMNR del año 2000 al año 2003 las infecciones de vías urinarias y los sitios de inserción en del catéter son las infecciones más frecuentes y dentro de los gérmenes aislados están principalmente *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. coagulasa* negativo (5).

Desde el punto de vista epidemiológico hay sospecha de un brote infeccioso nosocomial cuando la tasa mensual de una infección particular excede el 95% del intervalo de confianza basado en la tasa del año previo para ese mes, estando justificada una investigación, la cual estará dirigida a conocer si el brote es causado por una sola cepa o si es causado por cepas diferentes en lo cual se podrá echar mano de los recursos disponibles que haya en el hospital afectado, con el objeto de evitar la propagación mayor del brote, controlar el mismo y tratar adecuadamente de acuerdo al antibiograma para reducir las posibilidades de resistencia bacteriana. Dichos recursos como se ha mencionado pueden consistir desde el estudio epidemiológico con el que mínimamente cuenta todo hospital de cualquier nivel, métodos de tipificación fenotípica y métodos de tipificación más sofisticados como la genotipificación.

La división de cepas dentro de subgrupos se llama tipificación bacteriana. Esto permite que las cepas de las misma especie aisladas de un grupo epidemiológico puedan ser claramente distinguidas de las cepas no relacionadas epidemiológicamente (6). Los métodos de tipificación deben reunir tres características esenciales (6): Primero: Un alto grado de poder de tipificación (tipificabilidad) para obtener un resultado definitivo para cada aislado probado; segundo: Buena reproducibilidad dentro de uno y entre diferentes laboratorios para realizar la misma tipificación dondequiera que la cepa es probada y tercero: Capacidad discriminante óptima para distinguir entre cepas no relacionadas epidemiológicamente.

Los laboratorios de microbiología clínica han ofrecido tradicionalmente análisis fenotípicos que dependen de una evaluación de características expresadas por el microorganismo, ejemplos de sistemas fenotípicos son: perfil antimicrobiano, biotipificación, serotipificación, fagotipificación, electroforesis en geles de poliacrilamida, inmunoblot y electroforesis de enzimas multilocus para evaluar la relación de los aislados (6,7). Los métodos fenotípicos tradicionales tienen varias desventajas, todos están limitados al número restringido de características que pueden ser examinadas, ellos podrían generar resultados malinterpretados debido a las alteraciones variables en la expresión de genes o antígenos que los hacen sistemas de baja reproducibilidad y baja discriminación (6,7,8).

En la pasada década de los 90's se acrecentó el interés en las técnicas moleculares para el análisis epidemiológico de los brotes infecciosos, lo cual condujo al uso del término *Epidemiología Molecular*. Dado que el DNA cromosomal representa una molécula

fundamental para la identificación celular, ha resultado de particular interés en la evaluación de la similaridad cromosomal como una medida epidemiológica (9). Algunos ejemplos de técnicas moleculares son (6,10, 11): Perfil de plásmidos, los métodos basados en los perfiles de restricción del DNA cromosomal: southern blot y los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphism), ribotipificación (ribotyping, RFLP del DNA ribosomal) la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE; pulsed field gel electrophoresis) que es considerado el estándar de oro de los métodos de tipificación molecular, los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): PCR-RFLP, el DNA de los polimorfismos amplificados al azar (RAPD, random amplified polymorphism DNA), los polimorfismo de tamaño de los fragmentos amplificados (AFLP), secuenciación y la rep-PCR (PCR de elementos repetitivos). Estas técnicas dependen de la separación electroforética de fragmentos de DNA de longitudes moleculares diferentes. El resultado electroforético es representado por un patrón de bandas sobre el gel (huellas digitales) (6).

Versalović y colaboradores (12) describieron un método para hacer huellas digitales de los genomas bacterianos al examinar los patrones específicos de cepas obtenidos de la amplificación por PCR de elementos de DNA repetitivos presentes dentro de los genomas bacterianos. Dos series principales de elementos repetitivos se usan para propósitos de tipificación, los elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP) y las secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC). Los elementos REP son secuencias de 38 pares de bases (pb) que consisten en seis posiciones degeneradas y una asa variable de 5 pb entre cada lado de un tallo palindrómico conservado. Las secuencias REP han sido descritas para numerosas enterobacterias (13). La naturaleza palindrómica de los elementos REP y su capacidad para formar estructuras de asas de tallo ha llevado a la propuesta de funciones múltiples para estos elementos dispersos y conservados altamente.

Las secuencias ERIC son una segunda serie de secuencias de DNA las cuales han sido exitosamente usadas para tipificar DNA. Las secuencias ERIC son elementos de 126 pb los cuales contienen repeticiones invertidas conservadas altamente y están localizadas en regiones extragénicas del genoma bacteriano (13, 14).

Mientras las secuencias REP y ERIC son los blancos más comúnmente usados para tipificar DNA otros elementos repetitivos, la secuencia BOX, ha sido usada para diferenciar

Streptococcus pneumoniae (15). Los elementos BOX están localizados dentro de regiones intergénicas y pueden también formar estructuras de asas de tallo debido a su simetría dual. Son elementos repetitivos mosaicos compuestos de varias combinaciones de tres secuencias de subunidades referidas como boxA, box B, y boxC (15). Las tres secuencias de subunidades tienen tamaños moleculares de 59, 45, y 50 nucleótidos respectivamente (15). Los elementos BOX no tienen ninguna similitud de secuencia a las secuencias REP y ERIC (15). Los elementos BOX ahora han sido encontrados en un número de especies bacterianas (16).

Los patrones de ERIC son generalmente menos complejos que los de REP. Las aplicaciones de ambas PCR de ERIC y REP a las muestras para ser tipificadas incrementan el poder o la fuerza discriminatoria sobre aquella técnica aplicada sola.

La rep-PCR está rápidamente siendo el método más usado para tipificar DNA. Los iniciadores para REP y ERIC han sido usados exitosamente para diferenciar cepas *S. aureus* (17), *Pseudomonas sp* (18), *S. epidermidis* (19). La técnica de rep-PCR es fácil de realizar y puede ser aplicada a números grandes y pequeños de aislados, muestra aplicabilidad a especies más amplia y ha demostrado en fuerza discriminatoria ser superior a otras técnicas moleculares (20,21).

La rep-PCR tiene una buena correlación con los resultados de la PFGE pero, en general, con ligeramente menos fuerza de discriminación (22).

Finalmente, con la información anterior consideramos importante estandarizar la técnica de rep-PCR para que sirva como método de tipificación molecular de las cepas que causan infección intrahospitalaria en el Hospital de Infectología.

JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales son un problema serio que causa una elevada morbimortalidad, además de que prolongan los días de estancia hospitalaria que en conjunto incrementan los costos importantemente en los hospitales, todo esto constituyen razones para implementar un equipo de vigilancia epidemiológica en el que además de epidemiólogos, enfermeras, médicos, microbiólogos, etc., debe contar con un buen sistema de tipificación que permita identificar cepas que tengan un origen o fuente común y posibles inicios de brotes de infecciones intrahospitalarias que redundaría en la prevención de la diseminación de infecciones intrahospitalarias y por consiguiente en una disminución de costos. Por lo anterior se pretende llevar a cabo un sistema de tipificación molecular para *Pseudomonas aeruginosa* de posible fuente común o brotes de infecciones intrahospitalarios, este sistema es considerado similar en la tipificabilidad, discriminación y reproducibilidad a la electroforesis en gel de campos pulsados que es considerado el estándar de oro pero que comparado a la rep-PCR resulta un sistema mas costoso en cuanto a equipo y reactivos, además de la necesidad de requerir mas tiempo y personal para realizarlo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Pueden las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de infecciones intrahospitalarias del Hospital de Infectología CMNR tipificarse mediante la rep-PCR?

OBJETIVO GENERAL

Tipificación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Hospital de Infectología CMNR de infecciones intrahospitalarias durante el período de junio del 2004 a junio del 2005 mediante la rep-PCR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica Rep-PCR (REP, ERIC y BOX) con *P. aeruginosa* obtenidas del cepario del Hospital de Infectología
2. Tipificar mediante la rep-PCR las cepas bacterianas de *P. aeruginosa* aisladas de infecciones intrahospitalarias durante junio del 2004 a junio del 2005 del Hospital de Infectología, CMNR.

HIPÓTESIS

La tipificación molecular de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la técnica de rep-PCR permitirá identificar cepas relacionadas a un brote nosocomial del Hospital de Infectología CMNR durante el período de junio del año 2004 a junio del año 2005.

MATERIAL Y MÉTODOS:

A) Lugar de realización

El estudio será realizado en la Unidad de Investigación Médica de Inmunología e Infectología, Sección de Bacteriología y Servicios Clínicos del Hospital de Infectología del CMNR.

B) Diseño del Estudio

Observacional, descriptivo, transversal, prospectivo.

C) Criterios de selección

C.1) Criterios de inclusión

- a. Serán incluidas todas las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital de Infectología del CMNR con infección intrahospitalaria durante el período de junio del 2004 a junio del 2005.

C.2) Criterios de no inclusión

- a. Todas las cepas bacterianas aisladas durante el período de junio del 2004 a junio del 2005 que no correspondan a una infección intrahospitalaria.
- b. Todas las cepas bacterianas aisladas que no correspondan a *P. aeruginosa*
- c. Todas las cepas bacterianas que sean de pacientes de otro hospital
- d. Todas las cepas bacterianas que sean de pacientes pediátricos

C.3) Criterios de eliminación

- a. Todas las cepas bacterianas aisladas de una infección intrahospitalaria de las que no se obtuviera ADN.

D) Variables del estudio

D.1) Infección intrahospitalaria.

Definición conceptual: Es toda condición sistémica o localizada que resulta de la reacción adversa a la presencia de microorganismos o sus toxinas. Se considera intrahospitalaria, si existe evidencia que no estaba presente o en incubación al momento del ingreso del paciente al hospital. Para muchas infecciones intrahospitalarias bacterianas eso significa que la infección usualmente se hace evidente 48 horas o más, luego de la admisión al hospital.

Definición operacional: Será considerada infección intrahospitalaria aquella infección (neumonía, infección de vías urinarias, etc) reportada por el médico, enfermera, etc., y que reúna los criterios de acuerdo al CDC.

D.2) Brote intrahospitalario.

Definición conceptual: Es la ocurrencia de dos o más casos de infección nosocomial, asociados epidemiológicamente en un número mayor a lo esperado; y en hospitales donde dicha ocurrencia epidemiológica sea nula, la presencia de un solo caso se define automáticamente como un brote de infección nosocomial

Definición conceptual: Se considerará un brote infeccioso nosocomial cuando la tasa mensual de una infección particular excede el 95% de intervalo de confianza basado en la tasa del año previo para ese mes, estando justificada una investigación (5), la cual estará dirigida a conocer si el brote es causado por una sola cepa o si es causado por cepas diferentes.

D.3) rep-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa de secuencias repetitivas)

Definición conceptual. Es un método rápido de tipificación genética que amplifica el DNA de regiones repetitivas esparcidas en el genoma que permite distinguir a nivel de cepas bacterianas y que incluye la amplificación de regiones repetitivas del DNA por tres

secuencias repetitivas diferentes que usan distintos primers o iniciadores como: REP-PCR, ERIC-PCR, y elementos BOX.

Definición operacional. Dado que el sistema de tipificación de rep-PCR incluye tres familias de secuencias repetitivas para tipificar definiremos cada protocolo individualmente.

D.2.2.1) ERIC-PCR. Procedimiento que por medio de PCR y utilizando dos iniciadores específicos nos permite la amplificación de fragmentos de tamaños diferentes (amplicones) que corresponden a regiones de DNA repetitivo extragénico de bacterias grampositivas y gramnegativas. Los productos de PCR serán analizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, para generar un patrón de huella digital de DNA el cual es específico para cada clona o cepa bacteriana. Estas huellas digitales se usarán para demostrar relación entre los microorganismos del mismo género y especie, al comparar las bandas de las diferentes cepas por visualización directa y/o a través de un software que permitirá agrupar a las cepas y discriminar su relación..

D.2.2.2) REP-PCR. Procedimiento que por medio de PCR y utilizando dos iniciadores específicos nos permite la amplificación de fragmentos de tamaños diferentes (amplicones) que corresponden a regiones de DNA repetitivo extragénico de bacterias grampositivas y gramnegativas. Los productos de PCR serán analizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, para generar un patrón de huella digital de DNA el cual es específico a las clonas o cepas bacterianas. Estas huellas digitales se usarán para demostrar relación entre los microorganismos del mismo género y especie, al comparar las bandas de las diferentes cepas por visualización directa y/o a través de un software que permitirá agrupar a las cepas y discriminar su relación.

D.2.2.3) BOX A. Procedimiento que por medio de PCR y utilizando un iniciador específico nos permite la amplificación de fragmentos de tamaños diferentes (amplicones) que corresponden a regiones de DNA repetitivo extragénico de bacterias grampositivas y gramnegativas. Los productos de PCR serán analizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, para generar un patrón de huella digital de DNA el cual es específico a las clonas o cepas bacterianas. Estas huellas digitales se usarán para demostrar relación entre los microorganismos del mismo género y especie, al comparar las bandas de

las diferentes cepas por visualización directa y/o a través de un software que permitirá agrupar a las cepas y discriminar su relación..

E) Descripción del estudio

FASE 1: La estandarización de la técnica se realizará con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 proporcionada por el laboratorio clínico del Hospital de Infectología. La cepa se sembrará en medio sólido y líquido de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) para extraer el DNA a partir de una colonia y/o de cultivo líquido puro. Una vez obtenido el DNA se estandarizará la temperatura de alineamiento en un termociclador de gradientes para tener una amplificación sin inespecificidad y también se estandarizará el grado de astringencia modificando la cantidad de $MgCl_2$ así como la cantidad de DNA a utilizar.

FASE 2: Una vez estandarizada la técnica se procederá a coleccionar muestras de casos de infección intrahospitalaria. El epidemiólogo, el microbiólogo, la enfermera sanitarista y la tesista, tendrán comunicación diaria para notificar cuando existan aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de infección intrahospitalaria.

METODOLOGÍA

1.- Aislamientos e identificación de bacterias gramnegativas

El aislamiento de las bacterias se realizará en medios de enriquecimiento diferenciales o selectivos de acuerdo al origen de los especímenes como son: gelosa sangre (con eritrocitos de carnero al 5%), gelosa chocolate y agar MacConkey o Agar azul de metileno-eosina (EMB). El aislamiento de bacterias se hará por estría cruzada. Los cultivos se incubarán de 34°C a 37°C. Una vez desarrolladas las colonias en cada uno de los medios, se analizará el crecimiento con relación al medio donde se promovió el desarrollo, como son: características de morfología colonial, prueba de oxidasa, colonias fermentadoras o no de la lactosa, etc, posteriormente se teñirán frotis por la técnica de Gram para evidenciar la morfología microscópica. Después de esto se procederá a su identificación con la aplicación de pruebas bioquímicas por método automatizado.

2.- Estandarización de rep-PCR (Box, Eric y Rep):

Se iniciará la estandarización con la extracción de DNA de la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2.1 Extracción de DNA (utilizando el reactivo de trizol BBL/invitrogen)

a) Lisis y homogenización de la muestra:

- 1.- Resuspender la colonia tomada del cultivo puro en 500µl de agua inyectable y añadir 500µl de reactivo de trizol en un tubo eppendorf de 1.5ml
- 2.- Homogenizar en vortex de 30-60seg
- 3.- Incubar 5min a temperatura ambiente

b) Separación de fases:

- 4.- Adicionar 100 µl de cloroformo, tapar los tubos y agitar en vortex 30-60seg, incubar 2-3min a temperatura ambiente
- 5.- Centrifugar 15min 14 rpm a 4°C (Micro Centrifugette 4214)

6.- Eliminar la fase acuosa que contiene el RNA. El DNA se encuentra en la interfase y fase orgánica

c) Precipitación del DNA:

7.- Precipitar el DNA de la fase orgánica adicionando 150 μ l de etanol absoluto.

Mezclar la muestra por inversión

8.- Incubar 2-3 min. a temperatura ambiente. Es recomendable dejar 30min a -20°C .

En esta etapa se puede quedar precipitando el DNA a -20°C .

9.- Centrifugar a 7500rpm 5min a 4°C

d) Lavado del DNA:

10.- Lavar el botón de DNA con 500 μ l de solución de citrato de sodio al 0.1M en etanol al 10%

11.- Incubar 30min a temperatura ambiente en agitación suave

12.- Centrifugar 7500 rpm 5 min. a 4°C (Micro Centrifugette 4214) (eliminar el sobrenadante)

13.- Repetir el mismo procedimiento desde el paso 10 al 12

14.- Resuspender el DNA en 80 μ l de etanol al 75%

15.- Incubar a temperatura ambiente 20-30min (mezclar rapidamente)

16.- Centrifugar 7500 rpm durante 5min a 4°C (Micro Centrifugette 4214)

17.- Eliminar el sobrenadante

18.- Secar o eliminar el etanol en Speed back (vacufuge eppendorff)

19.- Resuspender en 50 μ l de agua inyectable

20.- Calentar 56°C durante 15min en Thermomixer compact eppendorf

21.- Cargar 5 μ l en un gel de agarosa al 1%

2.2. Separación de DNA por electroforesis.

2.2.1 Preparación gel de agarosa. Si bien el DNA puede ser separado en virtud de su carga y tamaño bajo el influjo de un campo eléctrico se requiere de un soporte sólido o matriz para tal propósito (agarosa, poliacrilamida etc.). La elección del soporte a utilizar y la concentración a la cual se utilizará depende del tamaño de las moléculas a separar. En este estudio se utilizaran geles de agarosa al 2-3 % ya que los productos

obtenidos tienen tamaños entre 3 Kb y 200 pb. Como la concentración del gel esta expresada en %, para preparar un gel al 2%

se pesaran en una balanza digital (Sartorius 0.001gr – 5 gr) 2 gr de agarosa, los cuales se disolveran en 100ml. de buffer TBE 1X y se solubilizará totalmente calentando a temperatura de ebullición en un horno de microondas (Samsung). Se adicionan 2.5 µl de Bromuro de Etidio que es un análogo de las bases nitrogenadas que constituyen el DNA y puede intercalarse reversiblemente entre éstas y es capaz de emitir fluorescencia naranja por excitación con luz ultravioleta, lo que hace posible visualizar el DNA.

2.2.2. TBE (Tris – borate –buffer). Se utilizará como buffer de corrimiento y en la preparación de los geles.

Solución Stock 10X : 890Mm Tris base, Ph 8.3, 890Mm ácido bórico y 25 mM EDTA.

2.3 Iniciadores y secuencias:

Los iniciadores que se utilizarán y sus secuencias se describen a continuación:

Iniciadores	Secuencia	Temperatura de alineamiento (Tm)	Referencia
BOX A1R	5'-CTACggCAAaggCgACgCTgACg-3'	76.5	Versalovic <i>et al.</i> 1994 (24)
ERIC 1R	5'-ATgTAAgCTCCTggggATTAC-3'	65.1	Versalovic <i>et al.</i> 1991 (12)
ERIC 2R	5'-AAgTAAgTgACTggggTgAgCg-3'	66.4	Versalovic <i>et al.</i> 1991(12)
REP 1R	5'-IIIIcGICgICATCIggC-3'	62.5	Versalovic <i>et al.</i> 1991 (12)
REP 2R	5'-ICgICTTATCIggCCTAC-3'	55.1	Versalovic <i>et al.</i> 1991 (12)

2.4 Mezcla de reacción de PCR:

COMPONENTES PCR	CANTIDADES (μL)		
	ERIC	REP	BOX
dNTP 10mM	1	1	1
Buffer 10X	5	5	5
MgCl ₂ 25mM	5	5	5
Iniciador 1R 20 pmol	1.5	1.5	1.5
Iniciador 2R 20 pmol	1.5	1.5	-----
Taq polimerasa Promega U/μl	2	2	2
DNA bacteriano	10	10	10
Agua estéril	24	24	24

2.5 Perfil térmico:

2.5.1 ERIC:

TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (MIN)	No. DE CICLOS
94	3	1
94	1/30seg	35
52	1	
68	8	
68	8	1

2.5.2 REP:

TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (MIN)	No. DE CICLOS
95	7	1
94	1	30
53	1	
72	8	
72	15	1

2.5.3 Box:

TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (MIN)	No. DE CICLOS
95	7	1
94	1	30
53	1	
65	8	
65	16	1

3.- Análisis de los patrones de bandas generados por la rep-PCR

Los productos de PCR serán separados por electroforesis con buffer TBE a 60 volts (fuente de poder marca Bio Rad Power Pac 250v/3aA/300w), en un gel de agarosa al 2% (Agarose high gel strength marca Molecular Biology Grade Research Organics) teñido en bromuro de etidio. Se usarán marcadores de peso molecular de DNA de 1kb y 100 pb (marca INVITROGEN y BioLabs). Los gels se revisarán en un analizador de imágenes con luz ultravioleta y un software (Kodak ID EDAS 290) para obtener la imagen en la computadora. El patrón de bandas obtenido que constituye una huella digital de cada cepa de *P. aeruginosa* será analizado por visualización directa y/o métodos computarizados con el fin de establecer las diferencias entre los patrones de banda y/o la relación entre éstas.

4.- Aspectos éticos

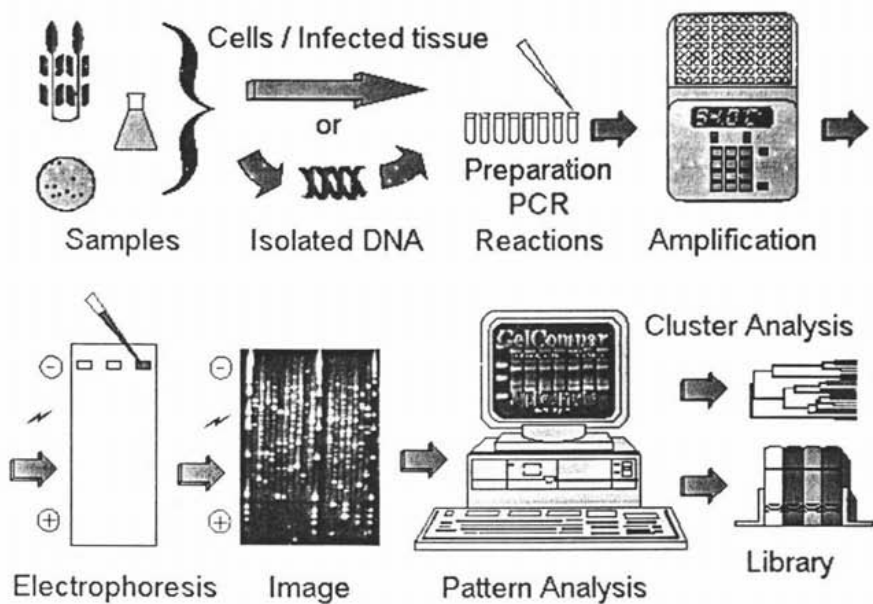
Dado que en el estudio no se realiza ninguna intervención en los pacientes este protocolo se ajusta a los principios de la Ley General de Salud Mexicana y a los principios de la Declaración de Helsinki.

5.- Análisis estadístico

Se realizará un análisis del patrón de bandas del DNA de las cepas aisladas por visualización directa y/o métodos automatizados, para determinar si la rep-PCR es capaz de discriminar si las cepas están estrechamente relacionadas o no y de las cepas con el mismo patrón de bandas, se solicitará expediente de cada uno de los pacientes para determinar si estuvieron asociados epidemiológicamente en el momento de adquirir la infección.

Esquema general de la realización de la rep-PCR.

rep-PCR genomic fingerprinting protocol



RESULTADOS

1.- PRIMERA FASE: Estandarización de la técnica

Se inició estandarización con la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, de la cual se extrajo ADN(en 5 tubos ependoff) con reactivo de trizol como se describió en metodología.

Una vez obtenido el ADN y visto en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, por medio de un transiluminador de luz ultravioleta, se cuantificó en un espectrofotómetro obteniendo los siguientes resultados:

DNA	ABSORBANCIA 260 nm	µg/ml
Ps1	01683	0841.5
Ps2	0.3624	1812
Ps3	0.2333	1166
Ps4	-----	-----
Ps5	0.1724	0086.2

Los iniciadores se resuspendieron en 500µl de agua destilada y se calentaron 20min a 56°C, después se cuantificaron en un espectrofotómetro como se muestra en la siguiente tabla:

INICIADORES	ABSORBANCIA 260nm	µg/ml
BOX	0.2198	1099
ERIC 1	0.2389	1194.5
ERIC 2	0.2398	1199
REP 1	0.2162	1081
REP 2	0.2859	1429.5

Se utilizó la siguiente ecuación para preparar alicuotas de 20pmol de cada uno de los iniciadores:

$$\mu\text{g/ml} = (\text{abs } 260\text{nm}) (\text{dilución}) (\text{factor})$$

$$20 \text{ pmol} = \frac{\text{volumen que se desea preparar}}{(\mu\text{g/ml}) (0.008)}$$

$$\text{BOX AIR } 20 \text{ pmol} = \frac{50}{(1099) (0.008)} = 50/8.792 = 5.68 = 44.3 \mu\text{l agua} + 5.68\mu\text{l BOX AIR}$$

De manera que para preparar 50µl de Box a una concentración de 20pmol se requirió añadir a 5.68µl del iniciador de Box, 44.3µl de agua estéril, como se muestra en la ecuación anterior y de la misma forma para cada uno de los demás iniciadores como se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$\text{ERIC IR 20 pmol} = \frac{50}{(1194)(0.008)} = 50/9.55 = 5.23 = 44.77 \mu\text{l agua} + 5.23 \mu\text{l ERIC IR}$$

$$\text{ERIC 2R 20 pmol} = \frac{50}{(1199)(0.008)} = 50/9.592 = 5.21 = 47.39\mu\text{l agua} + 5.21 \mu\text{l ERIC 2R}$$

$$\text{REP IR 20 pmol} = \frac{50}{(1081)(0.008)} = 50/8.648 = 5.78 = 44.22 \mu\text{l agua} + 5.78 \mu\text{l REP IR}$$

$$\text{REP 2R 20 pmol} = \frac{50}{(1429.5)(0.008)} = 50/11.436 = 4.37 = 45.62 \mu\text{l agua} + 4.37\mu\text{l REP 2R}$$

De acuerdo a Maniatic para PCR se recomienda usar 0.1µg/ml de ADN bacteriano, por lo que si el volumen final de la reacción de PCR es 50 µl entonces:

$$\begin{aligned} 0.1\mu\text{g} &= 1000 \text{ ml} \\ x &= 50 \mu\text{l} \\ x &= 0.005 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Se utilizó tubo con ADN de PstI con 841.5µg/ml entonces aplicando la ecuación anterior quedaría:

$$841.5\mu\text{g} = 1000 \text{ ml}$$

$$0.005\mu\text{g} = x$$

$$x = 0.00594$$

Se hizo una dilución 1:100 del ADN:

$$495 \mu\text{l agua} + 5\mu\text{l ADN}$$

En 5 µl de ADN original se tienen 4.20µg entre 500 = 0.0081 µg/ml entonces para PCR se requiere 0.005µg, se tomó un µl de la dilución 1:100 por lo que se adicionó 10 veces mas de ADN.

1.1 Estandarización de ERIC

Se procedió a la preparación de PCR con los componentes y concentraciones ya mencionados, con los iniciadores ERIC y con la cepa de referencia para definir la mejor temperatura de alineamiento mediante un gradiente de temperatura como se muestra en la figura 1:

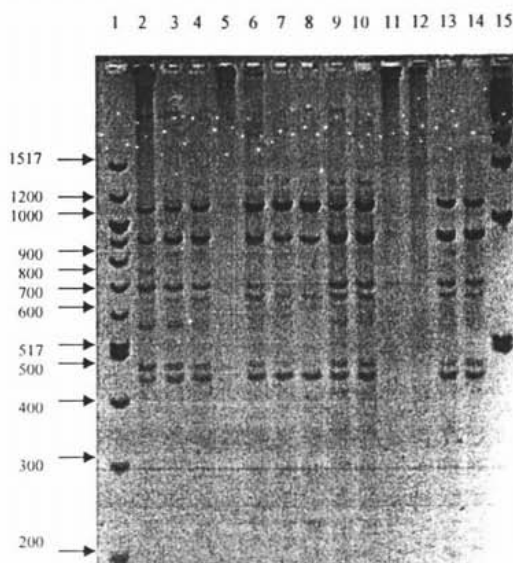


Fig 1: Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se muestra un gradiente de temperatura de alineamiento. Se utilizó ADN de la cepa de referencia. Carril 1) Marcador de peso molecular 100pb BioLabs; carril 2) 46.4°C; carril 3) 49°C; carril 4) 51.8°C; carril 5) 54.5°C; carril 6) 57.0°C; carril 7) 59.1°C; carril 8) 60.7°C; carril 9) 51.8°C; carril 10) 54.5°C; carril 11) 51.8°C; carril 12) 54.5°C; carril 13) 51.8°C; carril 14) 54.5°C; carril 15) Marcador de peso molecular marca biolabs de 1kb. Del carril 2 al 8 en la mezcla de reacción de PCR se añadió 1µl de ADN y se cargaron en el gel 13µl del producto de PCR con 7µl de buffer de carga. En el carril 9 y 10 se añadió a la mezcla de reacción de PCR 10µl de ADN. En el carril 11 se añadió a la mezcla de reacción de PCR 1µl de DNA con 10µl de buffer de carga. Del carril 12 al 14 se añadió a la mezcla de reacción de PCR 1µl de ADN con 3µl de taq polimerasa marca promega (en el resto de carriles se tenía 2µl de taq polimerasa)

Se determinó de acuerdo con este gel de agarosa que la temperatura donde se tenía mejor amplificación era de entre 51.8 y 54.5, por lo que se eligió una temperatura promedio de 52°C, también concluimos que añadir 10µl de ADN a la mezcla de reacción de PCR era mejor que 1µl, por mejor resolución de las bandas y que añadir mayor cantidad de taq polimerasa no influía en una mejor amplificación.

Se extrajo ADN de cepas del laboratorio de 4 pacientes: 50, 67, 72, 76, con reactivo de trizol y se cuantificó midiendo absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro con luz ultravioleta como se muestra en la siguientes tabla:

MUESTRA	ABSORBANCIA 260 nm	µg/ml
50	0.002	10
67	0.397	1985
72	0.005	25
76	0.016	80

Se elaboró un gel de agarosa al 4% para determinar si un gel mas concentrado que 2% como el anterior definía mejor las bandas, debido a que los fragmentos de ADN a amplificar son muy pequeños, de la misma forma se probaron diferentes diluciones de los ADN extraídos, así como diferentes cantidades de producto de PCR, se corrió el gel a 60volts como se muestra en la figura 2:

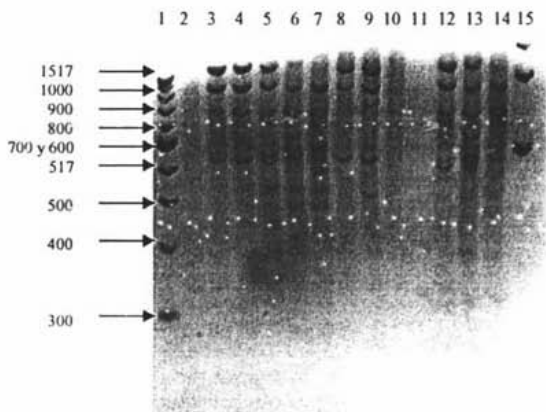


Fig. 2: Gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio, visto en transiluminador de luz ultravioleta, carril 1) Marcador de peso molecular de 100pb de biolabs, carril 2) ADN de Ps 1 diluido 1:100 (se cargaron 10µl de producto de PCR), carril 3) ADN Ps 2 dilución 1:100 (se cargaron 5µl de producto de PCR), carril 4) ADN Ps 3 dilución 1:100 (se cargaron 5µl de producto de PCR), carril 5) ADN Ps 4 dilución 1:100 (se cargaron 10µl de producto de PCR), carril 6 (de éste carril en adelante se cargaron 12µl de producto de PCR): ADN Ps 50 dilución 1:50, carril 7) ADN Ps 67 dilución 1:100, carril 8) ADN Ps 72 dilución 1:2, carril 9) ADN Ps 72 dilución 1:5, carril 10) ADN Ps 76 dilución 1:2, carril 11) control negativo, carril 12) tubo 2 mas 3µl de taq polimerasa, carril 13) ADN Ps 50, carril 14) ADN Ps 67 y carril 15) Marcador de peso molecular de 1kb de invitrogen.

De acuerdo con estos resultados se establecieron los siguientes parámetros de trabajo:

- No es necesario realizar un gel de agarosa al al 4% ya que al 2% se tiene una buena resolución y separación de los productos de PCR.
- 1.5µl de taq polimerasa (1U/µl) son suficientes para la amplificación.
- El uso de un marcador de 1 kb (1kb DNA ladder cat no 10381-010 marca invitrogen) nos permite dar una mejor aproximación del tamaño de los productos de PCR obtenidos.

- Un corrimiento a 60volts es suficiente para tener una separación adecuada de los productos de PCR.
- El uso de buffer TBE en el corrimiento electroforético nos ayuda a dar mejor resolución de los fragmentos de ADN obtenidos en comparación con el buffer TAE.

Una vez estandarizada la técnica de ERIC se procedió a estandarizar la técnica de REP.

1.2 Estandarización de REP

De la cepa de referencia se utilizó tubo 2 (1812µg/ml), con dilución del ADN (para obtener una concentración final de 60 ng/ml de ADN), con el perfil térmico ya descrito anteriormente, pero, no hubo amplificación. Se utilizaron 2 diferentes marcas de taq polimerasa: Promega y Biolabs. No hubo amplificación. Se cargó ADN a una concentración final de 60ng/ml. No hubo amplificación. Se probó falla del termociclador, al realizar programa de Rep PCR tanto en termociclador que se había estado usando (Eppendorf) y en otro diferente (biometra) (fig 3).

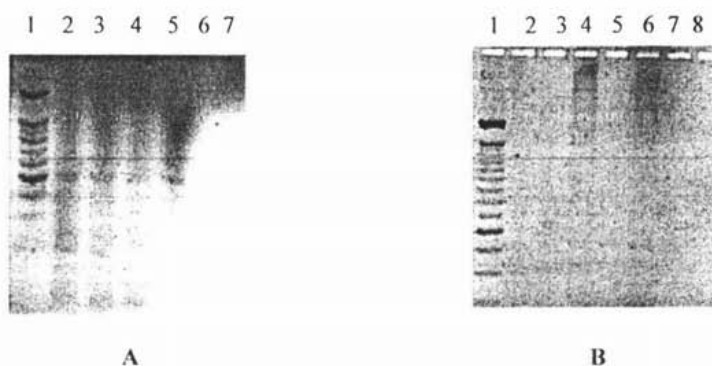


Fig 3. Gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio visto en un transiluminador de luz ultravioleta. A) termociclador marca Eppendorf y B) Termociclador marca biometra. carril 1) marcador de peso molecular de 100 pb de marca invitrogen: carriles 2,3,4,5,6,7,8) mismo producto de PCR con iniciador de REP-PCR, con DNA de cepa de referencia.

No hubo amplificación. Se utilizaron nuevos dNTPs, MgCl₂, Buffer 10X de PCR, la polimerasa de hot start, taq polimerasa de promega y marca amplicasa, para descartar contaminación, pero, no hubo amplificación. Se observó al correr el ADN extraído en un gel de agarosa al 1% que se obtenía ARN remanente (fig 4).

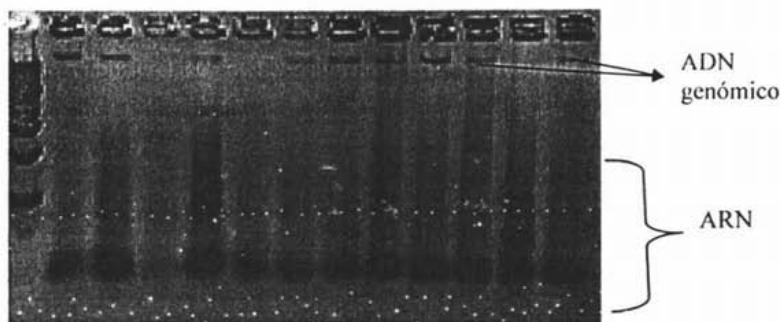


Fig 4: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio visto en un transiluminador de luz ultravioleta. Carril 1) Marcador de peso molecular de 1kb marca invitrogen; carril 2 al 12 ADN genómico extraído con reactivo de trizol, de muestras de pacientes del cepario del laboratorio clínico.

Pensando que los restos de ARN marcados en la figura anterior, interfería con la amplificación, se obtuvo ADN con DNazol y por ebullición para obtener un DNA mas puro (fig 5) con las técnicas que se describen a continuación:

Extracción de DNA con DNazol BD Reagent Life Technologies:

1. Lisis

1.1 Mezclar 1 ml de DNazol con 0.5ml de la suspensión bacteriana y homogenizar en vortex

2. Precipitación del DNA

2.1 Adicionar 0.4ml de isopropanol a la mezcla anterior y mezclar en vortex

2.2 Incubar 5 min a temperatura ambiente

2.3 Centrifugar 7500 rpm durante 5min a 4°C (Micro Centrifugette 4214)

3. Lavado de DNA

3.1 Eliminar el sobrenadante y adicionar al precipitado 0.5ml de DNazol

3.2 Agitar en vortex hasta que el boton de DNA este completamente disuelto

3.3 Centrifugar 7500 rpm durante 5min a 4°C (Micro Centrifugette 4214) (eliminar el sobrenadante)

3.4 Lavar el boton de DNA con 1 ml de etanol al 75%

3.5 Centrifugar 7500 rpm durante 5min a 4°C (Micro Centrifugette 4214)

4. Solubilizacion del DNA

4.1 Eliminar el etanol del lavado por decantacion

4.2 Eliminar el etanol remanente por Speed back (vacufuge eppendorff)

4.3 Resuspender el boton de DNA en 200µl de agua mQ.

Extracción de DNA por ebullición:

1. En un tubo eppendorff de 1.5ml colocar 200µl de agua mQ
2. Resuspender una colonia
3. hervir durante 10min
4. Centrifugar 7500 rpm durante 5min a 4°C (Micro Centrifugette 4214)
(eliminar el sobrenadante)
5. Resuspender en 25µl de agua mQ

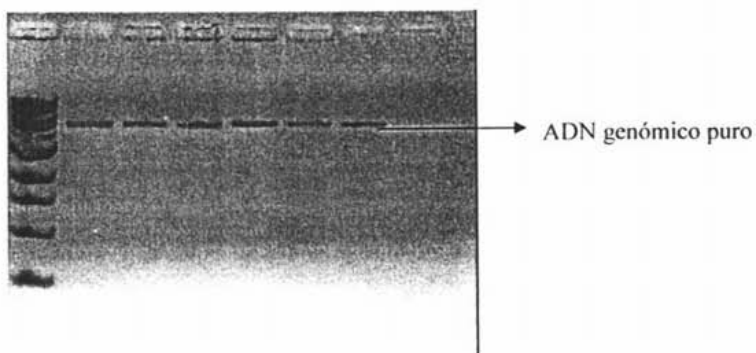


Fig 5: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, visto en un transiluminador de luz ultravioleta. Carril 1) Marcador de peso molecular de 1kb de marca biolabs; del carril 2 al 7) ADN genómico extraído de muestras del cepario del laboratorio clínico, con DNAzol, en donde se observa que ya no hay residuos de RNA

Pero aun así no hubo amplificación, se corrieron los iniciadores y otros iniciadores de proyectos diferentes a éste, para determinar si los iniciadores estaban degradados (figura 6).

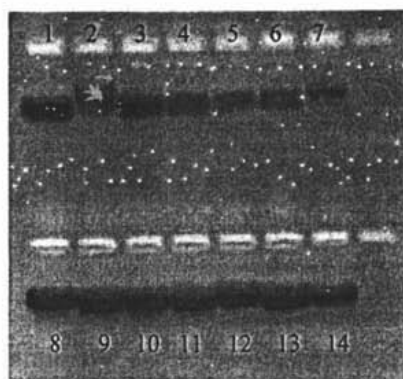


Figura 6: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, con buffer TBE, visto en un transiluminador de luz ultravioleta. Carril 1) Iniciador Box, carril 2) Eric 1R, carril 3) Eric 2R, carril 4) Rep1R, carril 5) Rep 2R, carril 6) Eric 1R 20 pmol, carril 7) Eric 2R 20 pmol, carril 8) iniciador N53-1, carril 9) N53-2, carril 10) T7-5, carril 11) T7-6, carril 12) ESAT 6, carril 13) ESAT 6S, carril 14) ESAT 6SII

Al no haber ninguna alteración se modificó la temperatura de alineamiento a 40°C, obteniendo amplificación, por lo que se intentó iniciar con la segunda fase del estudio, probando la técnica que ya estaba estandarizada (ERIC) con las muestras de infecciones intrahospitalarias, colectadas hasta el momento de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión del protocolo, sin obtener amplificación, por lo que se probó BOX y ERIC, encontrando amplificación de BOX pero no de ERIC (fig 7).

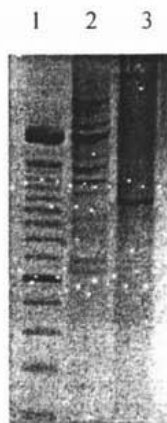


Fig 7: Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio visto en un transiluminador de luz ultravioleta. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100pb de marca invitrogen, carril 2) DNA tubo Ps 5 con 15µl de producto de PCR de Box, carril 3) DNA tubo Ps 5 con 15µl de producto de PCR de ERIC.

Se determinó que los iniciadores de ERIC estaban degradados, por lo que para continuar con la segunda fase del estudio se solicitaron nuevos iniciadores de ERIC.

1.3 Estandarización de BOX

Una vez estandarizada ERIC y REP, se procedió estandarizar BOX de la misma manera que con REP, modificando la temperatura de alineamiento a 53°C y llevando el DNA a una concentración final de 30ng/ml.

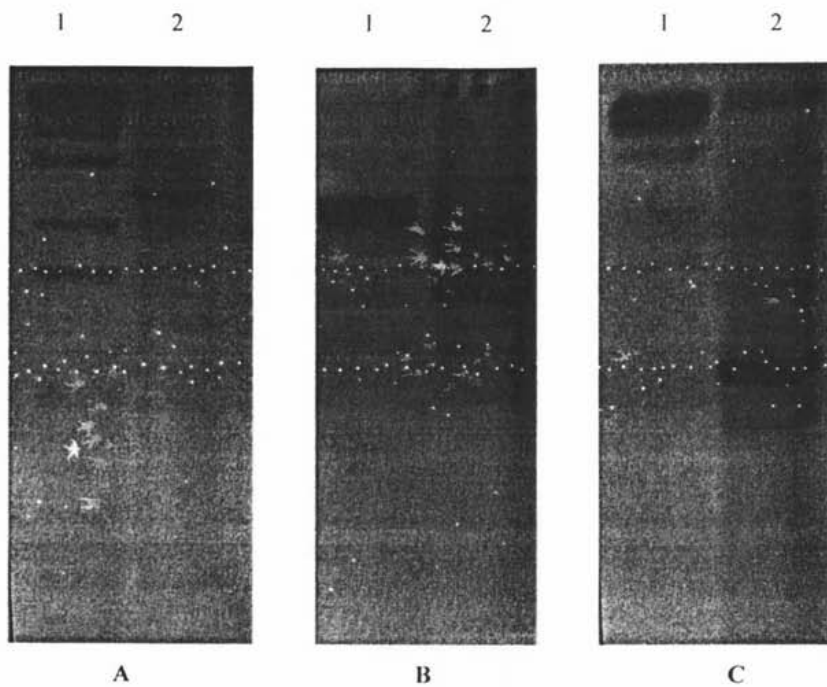


Fig. 8: Gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Carril 1) Marcador de peso molecular de 1 kb marca invitrogen; carril 2) cepa de referencia ATCC. **A** Técnica de Rep; **B** técnica de Box; **C** técnica de Eric

De acuerdo con la figura 8 se da por terminada la fase de estandarización y se procede a realizar la segunda fase del estudio.

2.- SEGUNDA FASE: Aplicación de la técnica en casos de infecciones intrahospitalaria por *Pseudomonas aeruginosa*

Se obtuvieron 235 aislamientos del período comprendido entre 01 de junio del 2004 al 31 de junio del 2005, de los cuales 164 fueron excluidas porque pertenecían a pacientes de otro hospital, pediátricos y ambulatorios, de las 73 cepas restantes únicamente 28 fueron corroborados como infecciones nosocomiales, sin embargo solamente se logró recuperar ADN de 17 de los 28 aislados a los cuales se les extrajo ADN con reactivo de trizol, se cuantificaron en espectrofotómetro y se hicieron diluciones de ADN para obtener una concentración final de 60 ng/ml para ERIC y REP PCR y 30 ng/ml para BOX.

Las técnicas de REP-PCR (Rep, Eric y Box) de las cepas de infecciones nosocomiales debidas a *Pseudomonas aeruginosa* durante el período ya señalado antes y su patrón de bandas identificado por transiluminador de luz ultravioleta se muestran a continuación:

REP-PCR

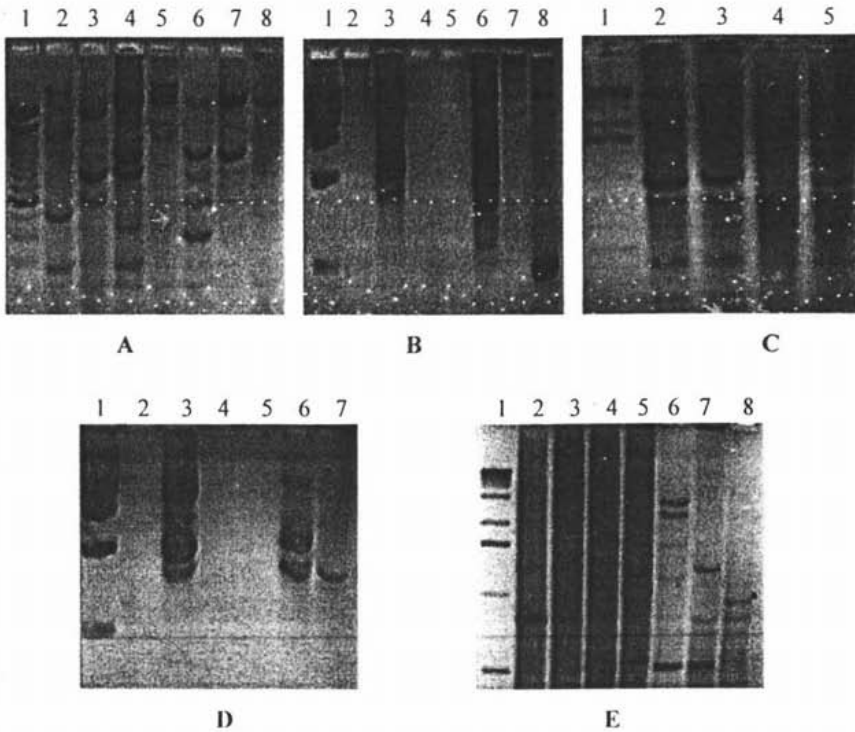


Fig 9: Geles de agarosa al 2% con TBE teñidos con bromuro de etidio, productos de REP-PCR vistos en un tras iluminador de luz ultravioleta. **A** carril 1) Marcador de peso molecular 100pb biolabs; carril 2) cepa de referencia ATCC; carril 3) paciente cepario; carril 4) paciente 1; carril 5) paciente 2; carril 6) paciente 3; carril 7) paciente cepario; carril 8) paciente 5. **B** carril 1) Marcador de peso molecular de 1 kb de biolabs, carril 3) paciente 1, carril 6) paciente 4; carril 7) paciente 5; carril 8) paciente 6. **C** carril 1) Marcador de peso molecular de 1 kb de invitrogen; carril 2) paciente del cepario; carril 3) paciente 1; carril 4) paciente cepario; carril 5) paciente 7; **D** carril 1) Marcador de peso molecular de 1 kb de biolabs; carril 3) paciente 7; carril 6) paciente 10; carril 7) paciente 11. **E** carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb invitrogen; carril 5) paciente 14; carril 6) paciente 15; carril 7) paciente 17; carril 8) paciente 2.

Es posible determinar a simple vista hay bandas muy bien definido entre cada una de las cepas.

Las comparaciones que podemos hacer en esta técnica, de acuerdo con estos geles, es que la cepa del paciente 1 que corresponde al carril 4 de la figura A y al carril 3 de la figura B,

donde tenemos que el patrón de bandas es muy similar, sin embargo, no corresponde al mismo peso molecular de cada una de las bandas comparadas entre los diferentes geles, es decir en ambos geles la primera banda gruesa corresponde al mismo peso molecular, sin embargo, la segunda banda gruesa en el gel A corresponde a un peso menor de 600pb y en el gel B corresponde a 600pb. Además entre estas dos comparaciones podemos añadir que hay un patrón de bandas de menor peso molecular en gel A pero no en B. El carril 3 del gel C es la misma cepa del paciente 1 y también tiene el mismo patrón de bandas que el carril 4 de la figura A. Con la cepa del paciente 5 ocurre algo similar donde el carril 8 de la figura A y el carril 7 de la figura B corresponden a esta cepa. Y por último comparando las bandas de la cepa del paciente 7, que es el carril 5 de la figura C vs carril 3 de la figura D, nos damos cuenta que no es el mismo, a pesar de corresponder al mismo ADN y a la misma técnica de PCR, pero estos productos de PCR fueron realizados en tiempos diferentes.

BOX-PCR

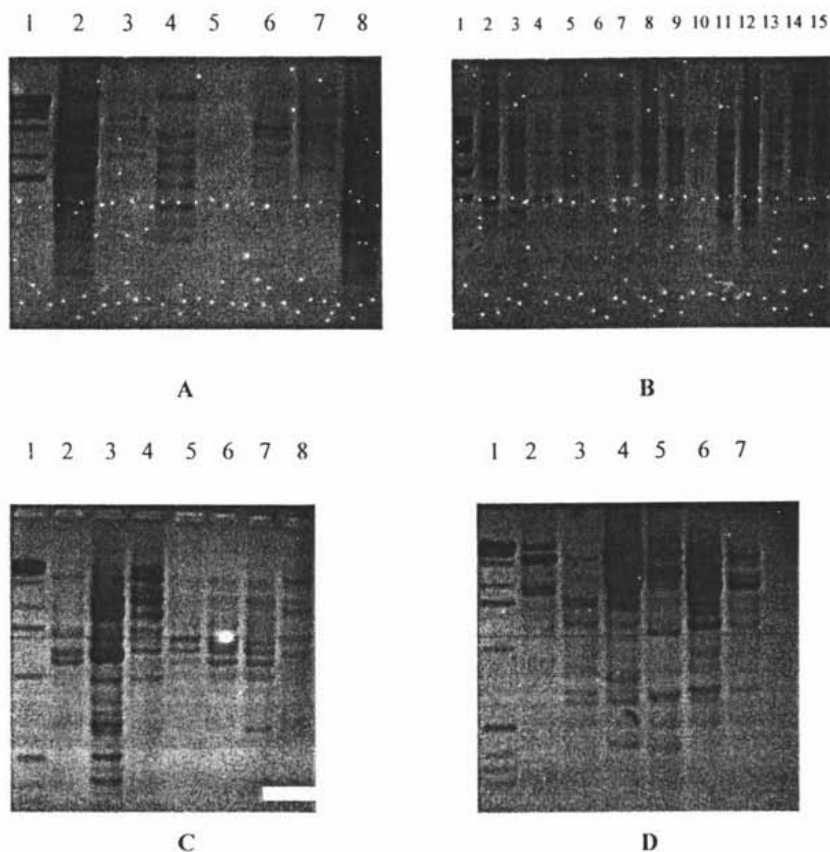


Fig 10: Geles de agarosa al 2% con TBE teñido con bromuro de etidio. **A** Carril 1) Marcador de peso molecular de 1kb de invitrogen; carril 2) paciente cepario; carril 3) paciente 1; carril 4) paciente 2; carril 7) paciente 4; carril 8) paciente 5. **B** Carril 1) marcador de peso molecular 1kb de biolabs; carril 2) cepa de referencia ATCC; carril 3,4,5,8,10 y 12) paciente cepario; carril 6) paciente 2; carril 7) paciente 3; carril 9) paciente 6; carril 11) paciente 1; carril 13) paciente 7; carril 14) paciente 8; carril 15) paciente 9. **C** Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb de invitrogen; carril 2) paciente 8; carril 3) paciente 9; carril 4) paciente 10; carril 5) paciente 12; carril 6) paciente 13; carril 7) paciente 14; carril 8) cepa de referencia ATCC. **D** Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb de invitrogen; carril 2) paciente 15; carril 3) paciente 16; carril 4) paciente 17; carril 5) paciente 2; carril 6) paciente 16; carril 7) Cepa de referencia ATCC.

También con esta técnica es posible identificar por visualización directa un patrón de bandas diferente de cada una de las cepas.

Podemos identificar un patrón de bandas muy similar entre el carril 8 de la figura C y el carril 7 de la figura D que corresponden a la cepa de referencia ATCC, sin embargo, el carril 2 de la figura B también corresponde al mismo ADN y aun así no hay una similitud entre las bandas. En el carril 4 de la figura A y el carril 6 de la figura B corresponden a la misma cepa del paciente 2, donde se puede observar que no hay similitud en las bandas. Lo mismo podemos observar en el carril 3 y el carril 11 de las figuras A y B respectivamente donde la cepa corresponde al paciente 1, sin embargo, no hay correlación en el patrón de bandas, ni siquiera en el número de estas. También la cepa del paciente 9, carril 15 de la figura B y carril 3 de la figura C no tienen similitud en el patrón de banda.

ERIC-PCR

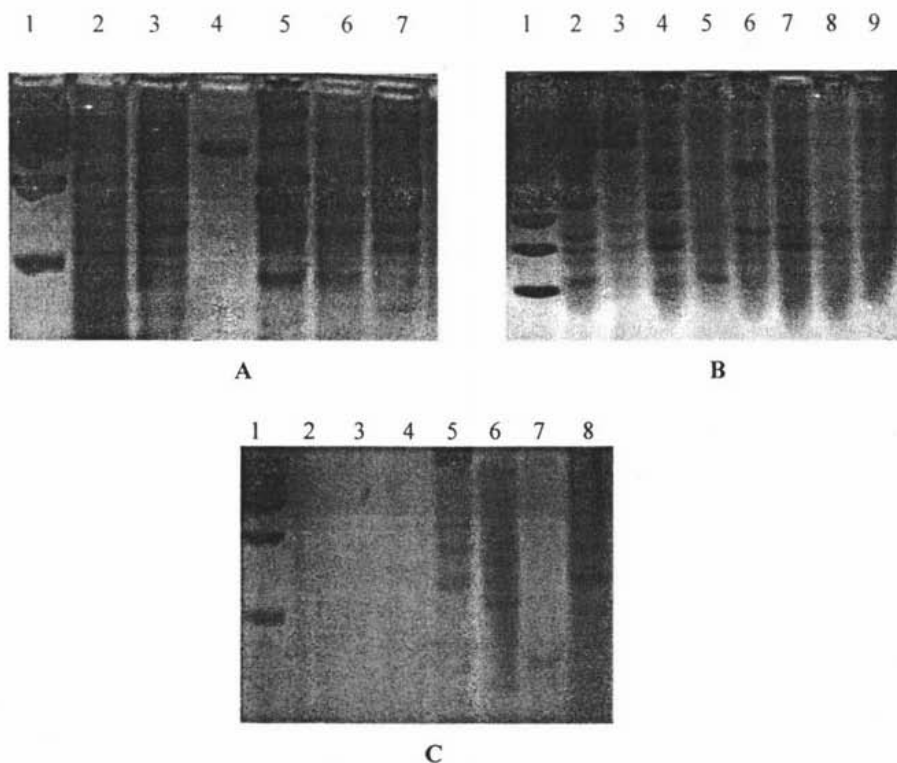


Fig 10: Geles de agarosa al 2% con TBE teñido con bromuro de etidio. **A** Carril 1) Marcador de peso molecular de 1 kb de biolabs, carril 2,3,4 y 6) paciente cepario; carril 5) paciente 1; carril 7) paciente 4. **B** Carril 1) Marcador de peso molecular de 100pb de biolabs; carril 2) paciente 1; carril 3 y 4) paciente 4; carril 5) paciente 14; carril 6) paciente 15; carril 7) 16; carril 8) paciente 17; carril 9) paciente 2. **C** Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb de biolabs; carril 5) paciente 15; carril 6) paciente 16; carril 7) paciente 17; carril 8) paciente 2.

En esta técnica los patrones de banda son similares que en las dos técnicas anteriores, donde podemos comparar la cepa del paciente 1 que corresponden al carril 5 de la figura A y el carril 2 de la figura B, observándose el mismo patrón de bandas, de la misma intensidad, pero no podemos decir lo mismo con la comparación de la cepa del paciente 4 donde tenemos que el carril 7 de la figura A y los carriles 3 y 4 de la figura B corresponden a esta cepa, pero de diferentes productos de PCR (es decir, PCR hechas en tiempos diferentes) y no hay similitudes.

DISCUSION

Debido al impacto que tienen las infecciones nosocomiales en los hospitales, se inicio este proyecto con la finalidad de implementar una técnica fácil y económica para poder identificar brotes nosocomiales, debido a que el estándar de oro (la electroforesis de campos pulsados) es una técnica muy cara, que requiere un equipo especial. De acuerdo con la literatura la Rep-PCR comparada con el estándar de oro, es considerada una técnica con un buen nivel de discriminación entre cepas₍₂₃₎.

De los 28 aislamientos corroborados como infecciones nosocomiales únicamente se pudo extraer ADN de 17 cepas, debido a que las otras 11 cepas, no fueron viables (no se logró recuperarlas después de tenerlas en congelación).

De estas 17 cepas, con la REP únicamente en 14 se pudo amplificar las secuencias de este iniciador, ya que se probaron todos los ADN extraídos con diferentes técnicas (trizol, DNazol, hervido) y con ninguno se obtuvo amplificación. Con BOX, se obtuvo amplificación en 16 cepas. Con la cepa del paciente 11 no se logró obtener amplificación probando todos los ADN extraídos. Con ERIC, únicamente pudimos obtener amplificación de 6 cepas, esto último debido a que los iniciadores se degradaron.

Aunque cada una de estas técnicas son fáciles, en cuanto a preparación se refiere, estas PCR requieren un tiempo largo para llevarse a cabo (en total de 5 a 6 hrs), debido a que los tiempos de polimerización son excesivamente largos (8 min/ciclo). Por otra parte, la diferencia de temperaturas de alineamiento y el requerimiento de un número de ciclos diferentes para cada una de ellas , hace difícil la realización de las 3 técnicas en un mismo día. En los diversos trabajos revisados de la literatura, solamente se han utilizado dos técnicas en cepas gramnegativas (REP y ERIC)₍₁₃₎ y BOX se había utilizado para cepas grampositivas₍₁₅₎. Solamente hay un trabajo en la que se ha utilizado BOX para bacterias gramnegativas₍₂₅₎, que fue precisamente para *P. aeruginosa*. Sin embargo, en esta referencia, no se publican los geles obtenidos, los cuales habrían sido de mucha utilidad para tener una base en cuanto al patrón de bandas que debimos haber esperado. Es necesario destacar que ésta es la única referencia en donde se ha analizado *P. aeruginosa* mediante la técnica de REP-PCR (utilizando únicamente iniciadores para BOX). Se decidió realizar el proyecto utilizando los iniciadores de Rep, Eric y Box para amplificar el ADN de *P. aeruginosa* considerando que el conjunto de estas tres secuencias repetidas en el

ADN nos permite hacer un análisis con mayor fuerza discriminatoria que nos ayude a establecer o descartar relación entre cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de diferentes pacientes con infecciones nosocomiales.

Cuando se obtuvo la estandarización de la técnica de ERIC y al intentar iniciar con la segunda fase del estudio, no hubo amplificación de ERIC, por lo que se comparo ERIC vs BOX, realizando una PCR con cada uno de estos iniciadores y con el mismo DNA, al no haber amplificación de ERIC, pero si de BOX se determinó que los iniciadores de ERIC se habían degradado, una vez obtenidos nuevos iniciadores de ERIC, no se pudo completar el estudio con esta técnica ya que nuevamente se degradaron, quedando incompleta la segunda fase. Al realizar el análisis de la secuencia del iniciador ERIC 2 (que es el que se degradó en dos ocasiones) con la ayuda del programa Plasmid que nos permite identificar la formación de estructuras secundarias internas o bien la formación de dímeros entre cadenas del mismo iniciador, no se detecto la presencia de este tipo de secuencias dentro de ERIC 2 y es realmente difícil de explicar porque se degrado este iniciador (la cual se corroboró por visualización en un gel de agarosa) ya que su secuencia es muy semejante en cuanto a su contenido de AT y CG al de ERIC 1 el cual permaneció estable. Tampoco es atribuible a una falla en la síntesis, primero porque en un inicio amplificó, lo que descarta una alteración en su secuencia y la casa comercial que elaboró los iniciadores en las dos ocasiones fueron diferentes.

Pero considerando que todavía teníamos las otras dos técnicas para realizar la comparación entre las cepas, continuamos con el proyecto. Aunque la literatura menciona un buen poder de discriminación entre las cepas, esto no sucedió en este trabajo debido a que una misma cepa amplificada con la misma técnica nos puede dar bandas iguales o diferentes, como fue descrito en la sección de resultados, de tal manera y debido a que no hay reproducibilidad entre una misma cepa con una misma técnica, no podemos realizar una comparación valida entre las diferentes cepas de cada una de las técnicas.

Ademas hay que destacar que cuando se intento realizar geles para fotografia, es decir conjuntar productos de PCR que dieron una buena amplificación anteriormente con otras que también amplificaron, con DNA diferentes, para poder hacer una buena comparación entre ellas, tuvimos el problema que no se visualizó el patrón de bandas esperado en el gel.

de tal manera que parece ser que los productos de PCR también son muy inestables y no es posible ver su patrón de bandas después de algún tiempo.

Sin embargo, al analizar el gel de la figura 1 que es fue la única ocasión en que se amplificó en una misma corrida de PCR un mismo producto que fue el ADN de *P. aeruginosa* ATCC, se observa que el patrón de bandas obtenido es el mismo, lo que sugiere que lo mencionado anteriormente en cuanto al comportamiento de los productos de PCR de los especímenes de los pacientes no sea debido a una falta de reproducibilidad de la técnica, sino a falla de estabilidad de los productos de PCR.

CONCLUSIONES

La Rep-PCR que amplifica tres tipos de secuencias repetidas extragénicas en el DNA de bacterias y que se propone que podría ser útil para poder discriminar entre cepas productoras de brotes nosocomiales, es estandarizable, sencilla y mas económica que el estándar de oro (electroforesis de campos pulsados) sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, concluimos que la Rep-PCR es reproducible siempre y cuando los especímenes sean procesados en un mismo tiempo, tanto de extracción de ADN como de corrimiento de los productos de PCR, ya que es probable que nuestros resultados sean un reflejo de la inestabilidad de los productos de PCR, de tal manera que el poder discriminatorio de la prueba debe determinarse con trabajos posteriores pero considerando esta inestabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Justo SC. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-026-SSA2-1998, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. Tomo DLVIII No. 22 México, D.F. 30 de Marzo 2000.
2. Ponce de León RS. Guía Práctica en Infecciones Intrahospitalarias. 1ª. Ed. 2000.
3. Gaynes RP. Surveillance of Nosocomial Infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997;18:1-6
4. George DL. Epidemiology of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients. *Clin Chest Med* 1995;16:29-40
5. Estadísticas del Servicio de Epidemiología del Hospital de Infectología, CMNR.
6. Olive D. M. and Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37: 1661-1669.
7. Lupski, James R. *Molecular Epidemiology and Its Clinical Application*. 1993; 273: 1363-1364.
8. Lipuma, J J. Molecular tools for epidemiologic study of infectious diseases. *Pediatric Infect Dis* 1998; 17:667-675.
9. Goering R. Molecular Epidemiology of Nosocomial Infection: Analysis of Chromosomal Restriction Fragment Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993;14:595-600.
10. Busch, U. and Nitschko, H. Methods for the differentiation of microorganisms. *J of Chromatography*. 1999; 722:263-278.
11. Struelens, JM. Molecular Epidemiologic Typing Systems of Bacterial Pathogens: Current Issues and Perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 1998; 93: 581-585.
12. Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. Distribution of repetitive DNA sequences in cubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19:6823-6831.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

13. Hulton, C. S. J., C. F. Higgins, and P. M. Sharp.. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1999;15:825–834.
14. Sharples, G. J., and R. G. Lloyd. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6503–6508.
15. Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, and R. Hakenbeck. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*2000:3479–3483.
16. Kwon, D.-H., F. A. K. El-Zaatari, J.-S. Woo, C.-L. Perng, D. Y. Graham, and M. F. Goo. Rep-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 1998; 43:980–987.
17. Anneke Van Der Zee, Harold Verbakel, Johan-Carlo Van Zon, Ine Frenay, Alex Van Belkum, Marcel Peeters, Anton Buiting, And Anneke Bergmans Molecular Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains: Comparison of Repetitive Element Sequence-Based PCR with Various Typing Methods and Isolation of a Novel Epidemicity Marker. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, Vol. 37 p. 342–349
18. Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & de Bruijn, F. J. 1994 Specific Genomic Fingerprints of Phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and Strains Generated with Repetitive Sequences and PCR *Appl Environ Microbiol* 60, 2286-2295.
20. Georghiou, P. R., R. J. Hamill, C. E. Wright, J. Versalovic, T. Koeth, D. A. Watson, and J. R. Lupski. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital-associated strains by molecular techniques. *Clin Infect Dis* 1995; 2000:84–94.
21. Vila, J., M. A. Marcos, and M. T. Jimenez de Anta.. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* 1996;44:482–489.
23. Liu, P. Y.-F., and W.-L. Wu. 1997. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of

Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 28:19–28.

24. In *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews*, (EXTRACCIÓN DNA Y PCR) pp. 151-171. Edited by G. Caetano-Anolles & P. M. Gresshoff. New York: John Wiley 1997

25. Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol* 2004;53:1089-1096.