



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Desarrollo e implementación de un microarreglo de DNA para
la detección de infecciones nosocomiales y genes bacterianos de
resistencia a fármacos: implementación preliminar

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADA EN BIOLÓGIA

P R E S E N T A

Ramirez Ronquillo Cynthia Llianela

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Carlos Pérez Plasencia

Tlalnepantla de Baz. Edo de México

Agosto 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTO A CUERPOS ACADÉMICOS Y FINANCIAMIENTO

AGRADEZCO AL DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA POR PROPORCIONARME EL USO DEL LABORATORIO DE GENÓMICA FUNCIONAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA SE AGRADECE EL APOYO TÉCNICO Y ASESORAMIENTO EN LA FASE EXPERIMENTAL

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA

AGRADECEMOS EL APOYO FINANCIERO OTORGADO POR PCONACYT MEDIANTE EL SISTEMA DE BECAS DE POSGRADO (CON NÚMERO DE REGISTRO: 377103). ADICIONALMENTE, AL FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL DEL SSA-IMSS-ISSSTE-CONACYT CONVOCATORIA S0008-2008-1; POR EL FINANCIAMIENTO OTORGADO AL PROYECTO DEL CUAL SE REALIZÓ EL PRESENTE TRABAJO: “USO DE MICRORNAs COMO UN NUEVO SISTEMA DE DIAGNÓSTICO DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO ASOCIADO A LA INFECCIÓN CON HPV”, CON CLAVE SALUD-2008-01-87130. DE IGUAL MANERA, AGRADECEMOS AL FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL DEL SSA-IMSS-ISSSTE-CONACYT CONVOCATORIA S0008-2009-1; POR EL FINANCIAMIENTO OTORGADO AL PROYECTO DEL CUAL SE REALIZÓ EL PRESENTE TRABAJO: “IDENTIFICACIÓN DE GENES BLANCO PARA EL MICRORNA MiR-21 EN CÉLULAS CERVICALES TUMORALES HUMANAS TRANSFORMADAS CON HPV”, CON CLAVE SALUD-2009-01-111892. AMBOS REGISTRADOS EN EL SIID.

Agradezco a los sinodales que participaron en la revisión de este proyecto:

Dr. Carlos Pérez Plasencia
Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras
M. en C. Irma Elena Dueñas García
Dr. Pedro Ramírez García
Dr. Sergio Vaca Pacheco

Agradecimientos personales

Gracias es una palabra fácil de decir pero difícil de sentir por eso siento que debo agradecerle a tantas personas en mi vida empezando por mis padres, todos ellos me enseñaron mucho en estos años, mi familia la cual estuvo presente en cada etapa retándome, poniéndome el ejemplo, apoyándome, cuidándome, enseñándome los valores que tengo y que muchas personas aprecian.

A mis profesores quienes tuvieron paciencia, la mayoría mucho cariño y siguen recordándome a pesar de haber dejado cada una de mis escuelas para superarme y conocer a nuevos maestros, 3 de estos me inspiraron a ser bióloga sin saberlo: la profesora Nery Becerra Tapia, profesora María Del Carmen Corona Corona y la profesora Beatriz Cuenca Aguilar, ambas me apoyaron durante la carrera hasta el final.

A mis amigos que de alguna forma están a mi lado ya sea por palabras, recuerdos, historias, objetos, acciones, etc. De verdad les agradezco creer en mí.

A las personas que conocí en el Laboratorio de Oncogenómica y me ayudaron de varias formas a concretar este proyecto, por el aprendizaje, la paciencia y las experiencias.

Índice

Resumen.....	1
Introducción	2
Definición de infección intrahospitalaria	2
Patógenos nosocomiales a nivel mundial y en México.....	4
Detección de infecciones intrahospitalarias	12
Cultivo.....	13
PCR	13
Microarreglos	14
Justificación.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares	16
Metodología.....	16
Diseño del microarreglo.....	16
Estandarización.....	18
Amplificación	18
Purificación	19
Marcaje	20
Hibridación	20
Resultados	21
Diseño del microarreglo.....	21
Estandarización.....	27
Hibridación	28
Discusión.....	31
Conclusión	34
Perspectivas.....	34
Bibliografía	35

Resumen

En México se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía del 2.1% hasta 15.8% y la letalidad asociada a estas es del 25.5%. La infección intrahospitalaria es la invasión del organismo por agentes bacterianos que ocasiona cambios locales y/o sistémicos, que de no ser controlados pueden llevar al deterioro y finalmente a la muerte del paciente. El impacto social y económico como el desvío de recursos de la atención primaria a secundaria y el aumento en la tasa de mortalidad son el resultado de las infecciones intrahospitalarias o nosocomiales (IN). En este trabajo, se diseñó un microarreglo capaz de identificar organismos presentes en IN; para ello, se diseñaron sondas de 20-37 nucleótidos (nt). Se obtuvo como resultado la hibridación de genes muy importantes para identificar mejor el perfil de resistencia de diversos microorganismos patógenos. Los resultados indican que aunque este diseño presenta valiosas aportaciones para la detección simultánea de patógenos así como de sus perfiles de resistencia a antibióticos, deben hacerse modificaciones en los criterios de selección de genes, de diseño de las sondas, principalmente el uso de sondas con longitud, contenido de GC y Tm similares pero lo suficientemente específicas para disminuir la aparición de falsos positivos.

Introducción

Definición de infección intrahospitalaria

Las enfermedades infecciosas han tenido un gran impacto en la salud pública desde hace mucho tiempo, tomando en cuenta su distribución e incidencia a nivel mundial. Según la Alianza Mundial para la Seguridad del Paciente de la OMS en todo momento hay en el mundo más de 1.4 millones de personas gravemente enfermas a consecuencia de estas infecciones. Entre el 5% y el 10% de los pacientes que son ingresados en hospitales en los países desarrollados contraen estas infecciones. En algunos países en desarrollo, el porcentaje de pacientes afectados puede superar el 25%. En México se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía del 2.1% hasta 15.8% y la letalidad asociada a estas es del 25.5% [Secretaría de salud 2011].

La infección intrahospitalaria es la invasión del organismo por agentes bacterianos que ocasionan cambios locales y/o sistémicos, que de no ser controlados pueden llevar al deterioro y finalmente a la muerte. La palabra nosocomial proviene del griego “nosos” que se refiere a enfermedad y “komien” que significa cuidado; por lo tanto, está asociada a un hospital o institución de salud. Estas infecciones son más frecuentes en pacientes en riesgo, como son neonatos, adultos mayores y en pacientes postoperatorios. Igualmente, los pacientes más susceptibles de adquirir una infección intrahospitalaria son aquellos que ingresan a una unidad de cuidados intensivos o están inmunocomprometidos. Los pacientes hospitalizados pueden adquirir una infección intrahospitalaria por diferentes fuentes, entre las que destacan el ambiente hospitalario, el uso de materiales contaminados en procedimientos invasivos, tales como catéteres intravasculares, urinarios, intubación endotraqueal, ventilación mecánica etc., así como por la contaminación con microorganismos provenientes de sitios anatómicos del propio paciente, como las fosas nasales, la cavidad oral, el tracto urogenital o la piel. De esta manera, se puede propiciar septicemia, bronconeumonía, infecciones del sistema nervioso central, endocarditis bacteriana, etc. [Salazar 2002].

El proceso de infección implica tres pasos bien definidos: contacto con las bacterias, colonización por las bacterias, e invasión [Heinzelman 2002]. El contacto con las bacterias es inevitable y es resultado de la interacción permanente del organismo con su medio circundante. La colonización se define como el crecimiento estable de las bacterias, lo cual lleva a la ruptura de las barreras de defensa del organismo, provocando la infección. En general, podemos clasificar las barreras naturales de nuestro cuerpo en tres tipos: físicas como la piel; químicas, un ejemplo sería la producción de inmunoglobulina A (IgA) en el tracto respiratorio superior, cuya acción germicida previene el crecimiento bacteriano en las vías aéreas y la vía digestiva alta, y el tercer tipo es biológica cuyo ejemplo sería el sistema inmunológico que actúa tratando de disminuir la concentración bacteriana, cuando se han sobrepasado los mecanismos anteriores y las bacterias han ingresado al organismo. Finalmente, la invasión es el proceso de daño al huésped u organismo [Navarrete 1999].

Las IN se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad, lo que se traduce no sólo en un incremento en los días de hospitalización y los costos de atención como ejemplos: *C. difficile* con un costo de 580 a 812 dólares y la bacteriemia asociada a catéteres (BAC) con un costo por infección estimado de \$34,508 a \$56,000 dólares; sino también se toma en cuenta el incremento en DALYS (años de vida ajustados de discapacidad) en la población [Secretaría de Salud 2011]. En el escenario médico se ha podido entender que una de las claves de la resolución de problemas como las infecciones, radica en el conocimiento específico y profundo de los agentes biológicos que las causan, al igual que los factores involucrados, ya que de esto dependerá el tratamiento adecuado y la prevención de este tipo de infecciones.

Patógenos nosocomiales a nivel mundial y en México

A continuación se enlistarán los patógenos con mayor presencia en instituciones hospitalarias en nuestro país y a nivel mundial.

Acinetobacter baumannii

Es un bacilo Gram negativo no fermentador aeróbico. La mayoría de las especies disponen de una cápsula liposacárida que les confiere resistencia a la fagocitosis [Noskin 2006]. Los principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos son resultado del intercambio genético, principalmente diferentes beta-lactamasas que hidrolizan los beta-lactámicos incluidos los carbapénicos OXA-23, CARB-5, TEM-1, TEM-2, cefalosporinas, en particular AmpC cromosómica, oxacilinasas y metaloenzimas, alteraciones de las proteínas ligadas a penicilinas (PBP), enzimas inactivadoras de los aminoglucósidos, alteraciones en las topoisomerasas y cambios en las porinas de la membrana externa (resistencia a quinolonas). Se han descrito mecanismos de virulencia *per se* entre los que destacan la estimulación del complemento, la inhibición de la fagocitosis por su cápsula polisacárida, la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias por la endotoxina A y la producción de enzimas lipolíticas [Noskin 2006, Jain 2004]. Entre las principales infecciones están: la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVMM) de presentación tardía, shock séptico, bacteriemias de origen respiratorio, urinario y de catéter, que son más frecuentes en los varones que en las mujeres y también conllevan una mayor estancia y un coste hospitalario más elevado [Zaragoza 2004, Zaragoza 2006, Cisneros 2002, Rodriguez 2006]. Las opciones de tratamiento son empleo temprano de antibióticos, si existe sospecha de infección, y al confirmarse la misma, el tratamiento debe ser al menos por 14 días; retiro de dispositivos y catéteres y descartar la seudobacteriemia [Mesalles 2008]

Bacillus anthracis

Es un bacilo Gram positivo, aerobio o anaerobio facultativo, en los cultivos pueden aparecer formando largas cadenas de bacilos con la apariencia de vagones de tren. La producción de betalactamasas, *hss* y *hrt* son factores de resistencia ya que le confieren la capacidad de resistir distintos grupos de antibióticos. En condiciones anaeróbicas y en presencia de bicarbonato, secreta una cápsula polipeptídica compuesta de ácido poli-D-glutámico, esta cápsula con carga negativa es uno de los principales factores de virulencia junto con las toxinas carbuncosas. La síntesis de esta cápsula está codificada por 3 enzimas cifradas en el plásmido px02: *capA*, *capB* y *capC*. Las 2 toxinas binarias “factor edema” (FE) y “factor letal” (FL) ambas se unen a la toxina llamada “antígeno protector” (AP) antes de que puedan entrar en una célula diana, como macrófagos o células dendríticas. Los tres componentes de la toxina también están codificados por un plásmido, llamado px-01. Causa la enfermedad de carbunco cutáneo, gastrointestinal y ántrax, su tratamiento consiste en el uso de bencilpenicilina [Mandell 2006].

Bacillus subtilis

Bacteria Gram-positiva, aeróbica que forma endosporas resistentes a factores ambientales, su diámetro es <0.9 micras, colonias de 2 a 4 mm de diámetro. Su mecanismo de resistencia se basa en genes como *bmr* cuya sobreexpresión genera resistencias elevadas a diversos fármacos como fluoroquinolonas; *vanA* que genera resistencia a vancomicina; los genes *capA*, *capB* y *capC* que producen una cápsula polisacárida que es uno de sus principales factores de virulencia [Kimura2003]. Produce meningitis, otitis, infección de heridas, neumonía, endocarditis, bacteriemia, etc. Se trata con amikacina, tobramycina, imipenem, ciprofloxacino y β -lactámicos.

Candida albicans

Es un hongo que forma tubos germinales e hifas así como clamidosporas o clamidoconidios. Forma parte de la flora de la piel, de las mucosas, del tracto gastrointestinal y de los aparatos genital y urinario del ser humano. La producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras favorecen la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero. Produce candidiasis cutánea, esofágica, vías urinarias, cardíaca y en vías respiratorias, vaginitis, candidemia, etc. Es la especie que origina un mayor número de candidiasis y es responsable de más del 50% de los casos. La estancia prolongada en la UCI aumenta las tasas de colonización entre el 50 y el 80% de los pacientes. Su tratamiento consiste en anfotericina B desoxicolato, anfotericina B complejo lipídico, anfotericina B liposomal, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fuconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina o nistatina [Mesalles 2008].

Clostridium difficile

Es un bacilo Gram positivo anaerobio obligado, formador de esporas, entre sus factores de resistencia encontramos a *tetM*, *catD* y *gyrA* que le confiere resistencia a antibióticos como tetraciclinas, cloranfenicol y fluoroquinolonas. Produce varias toxinas aunque las más activas son las A y B, puede estar en el suelo y suele estar presente en el ambiente pero forma parte de la flora intestinal normal, los principales reservorios son los hospitales, los hogares de ancianos y guarderías. Los factores de riesgo que llevan a la proliferación son: tratamiento antibiótico, enemas reiterados, sonda nasogástrica por periodos prolongados, cirugía de tubo digestivo e insuficiencia renal. El tratamiento para enfermedades como colitis pseudomembranosa o diarrea asociada a antibióticos como penicilinas, clindamicina o cefalosporinas, es con metronidazol también se puede usar vancomicina oral pero no se recomienda para evitar una cepa resistente [Baker 2009].

Clostridium perfringens

Es una bacteria Gram positiva con forma de bastón, anaerobio obligado con la capacidad de formar esporas, presenta flagelos peritricos. Es uno de los más distribuidos, el reservorio es el suelo, polvo, tubo digestivo, piel, las moscas contribuyen al transporte de las esporas. Forma biofilms para tener resistencia al estrés oxidativo, antibióticos y agentes bactericidas. Produce 14 toxinas siendo la enterotoxina alfa causante de gangrena gaseosa es responsable del 80% de los casos; mientras las enterotoxina C, causa enteritis necrosante, también daña la piel y tejidos blandos. El tratamiento consiste en administrar metronidazol o vancomicina [Miranda 2004].

Corynebacterium diphtheriae

Es un bacilo Gram positivo pleomórfico, no móvil, no encapsulado y no formador de esporas. Su nombre proviene del griego “korynee”, o “garrote”, que se refiere a sus extremos engrosados y “diphtheria” que significa “cuero”, por la característica membrana coriácea que genera. Características como gránulos metacromáticos y su morfología en empalizada en forma de “letras chinas” lo distinguen de otras especies. La especie se divide en 3 tipos: gravis, intermedia y mitis con base en la diferente morfología de las colonias en agar telurito, las reacciones de fermentación y al potencial hemolítico. La principal virulencia proviene de la acción de su potente exotoxina, que inhibe la síntesis protéica en las células de mamíferos pero no en las bacterias. Su tratamiento consiste en administrar Antitoxina IM o IV, Eritromicina, Penicilina Benzatina G seguida de Penicilina V potásica y Clindamicina [Mandell 2006].

Enterococcus faecalis

Comensal del tubo digestivo, anaerobio facultativo ubicado en el tracto gastrointestinal del hombre y otros animales entre sus factores de resistencia podemos encontrar a *ermB*, *mef* y *msr* sus factores de virulencia son *ace*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* y *hyl*. Se adhieren a las células cardiacas y epiteliales renales causando endocarditis, infecciones del tracto urinario y meningitis. Las infecciones que causa son tratadas con eritromicina, tylosina y ciprofloxacino [Li 2011].

Enterococcus faecium

Comensal del tubo digestivo, anaerobio facultativo ubicado en el tracto gastrointestinal del hombre y otros animales sus factores de resistencia son *vanA*, *streptogramina A*, *tetM* y *MDR* entre otros. Los factores de virulencia que tiene son: *esp*, *gel*, *hyl*, *agg* y *cyl*. Se adhieren a las células cardiacas y epiteliales renales causando endocarditis e infecciones urinarias, produce citolisina y se considera más virulenta que *E. faecalis*. El tratamiento consiste en administrar vancomicina, ampicilina y aminoglucósidos [Huys 2004, Li 2004].

Escherichia coli

Es un bacilo corto no formador de esporas, Gram negativo, frecuentemente con fimbrias que crece rápidamente en medios de cultivo simples con escaso glicerol y con glucosa como único nutriente. Incluye la producción de indol, falta de fermentación del citrato, resultados positivos en la prueba de rojo metilo y negativo en las reacciones de ureasa. Se caracteriza mejor por una combinación de serotipos relativamente complejos que incluyen 173 antígenos O (polisacáridos), 80 antígenos K (capsular) y 56 antígenos H (flagelar), los cuales pueden dividirse en antígenos parciales [Rodriguez 2002]. *Escherichia coli* coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal, pero hay descritos seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC).

Escherichia coli EPEC

Causa diarrea aguda o persistente, presenta un plásmido de virulencia denominado *E. coli*-adherence-Factor (EAF) causa lesiones a nivel intestinal debido a LEE (Locus of enterocyte effacement), el cual es una isla de patogenicidad (IP) de 35 kb ubicada en el cromosoma bacteriano que contiene los genes que codifican para la proteína de membrana externa denominada intimina (*eae*), los genes *esp* (por *E. coli* secreted proteins), el gen que codifica para el receptor translocado de intimina *Tir* (translocated intimin receptor) y los genes para la síntesis del sistema de secreción tipo III [Varela 2007].

Klebsiella pneumoniae

Bacteria Gram negativa, no motil y anaeróbica facultativa se encuentra en el agua, suelo, plantas y superficies mucosas de mamíferos como humanos y caballos. Sus factores de resistencia son *bla TEM*, *bla SHV*, *bla CTX-M*. Entre sus mayores factores de virulencia encontramos a *magA*, *rmpA* y los serotipos capsulares K1 y K2. Causa infecciones intra-abdominales y del tracto urinario, bacteremia, pneumonia nosocomial y sepsis especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Las infecciones son tratadas con amikacina, gentamicina, imipenem o ciprofloxacino [Pulido 2011, Wu 2009].

Listeria monocytogenes

Son cocobacilos cortos ubicuos en la naturaleza, aerobios intracelulares facultativos, presentan 4 flagelos que se pierden al ingresar al ser humano. Presenta resistencia natural a cefalosporinas de tercera generación, Aztreonam, Fosfomisin, ácido pipemidico, Dalfopristin y Sulfametoxazol por replicones integrativos y recombinación homóloga. Usa reguladores transcripcionales como *prfA* para producir factores de virulencia como *hly*, *plcA*, *plcB* y *inlA*. Ingresa por vía digestiva causando meningitis, gastroenteritis, endocarditis, etc. Las infecciones son tratadas con penicilina, ampicilina, eritromicina, cloranfenicol y rifampicina [Ruiz 2008].

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo Gram negativo flagelado no fermentador de lactosa que crece mejor en aerobiosis pero puede hacerlo también en anaerobiosis, y que se comporta como patógeno oportunista. Es la causa más frecuente de la infección nosocomial grave. Obliga a introducir el término de “panresistencia”, es decir, la sensibilidad disminuida a todos los antibióticos recomendados para su erradicación [Mesalles 2008]. Los principales mecanismos por los que *P. aeruginosa* adquiere resistencia a antibióticos se indican a continuación: 1) Porinas lentas: los canales lentos y estrechos producen resistencia al imipenem por la producción de la proteína OprD, 2) Bombas de resistencia-nodulación-división celular (RND) o de eflujo la bomba MexAB-OprM se expresa de forma constitutiva y proporciona resistencia a quinolonas, penicilinas y cefalosporinas antipseudomonas, 3) Enzimas

inactivadoras como AmpC cefalosporinas, PSE β -lactamasas, TEM, SHV y metalo-carbapenemasas 4) Por mutaciones como en el gen regulador para el sistema de eflujo, genes que codifican topoisomerasas y biopelícula una capa exopolisacárida formada por ácido D-macurónico y L-gulurónico [Mah 2003]. Uno de sus principales factores de virulencia es la producción de la exotoxina A. Causa neumonía asociada a ventilación, queratitis de córnea y fibrosis quística. Se trata con cefepima, ceftazidima, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, ciprofloxacino y levofloxacino.

Proteus mirabilis

Es una bacteria entérica Gram negativa miembro de las Enterobacteriaceae, es bien conocida por su capacidad de pasar a través de superficies sólidas. Una de las características más notables es un enjambre de motilidad, una forma especializada mediada por flagelos, durante el cual las células alargadas hiperflageladas, estas células migran aglomeradas en masa. Su patogénesis es mediada por una serie de factores de virulencia y la formación de biofilms cristalinos. Sobrevive en el tracto urinario debido a los factores de virulencia como: ureasa, flagelos, fimbrias, hemolisina y proteasa IgA. Siendo la Ureasa, que media la hidrólisis de la urea en amoníaco y dióxido de carbono, el más potente factor de virulencia de este organismo. Causa infección en vías urinarias, otitis y neumonía. Es tratada con ampicilina, amoxicilina y cefalexina [Pearson 2011, O'May 2009].

Salmonella entérica

Bacilos Gram negativos aero-anaerobios facultativos con un contenido en guanina-citosina 50-53%, no producen endosporas y son móviles por flagelación peritrica. Sus factores de resistencia los representan las betalactamasas como TEM, PSE, OXA, SHV, PER, CTX-M, CMY, ACC, DHA Y KPC, enzimas modificadoras de aminoglucósidos como las modificadas por los genes *aadA*, *aadB*, *aac*, *aphA*, enzimas modificadoras de fenicoles como *CatA* y *CatB*, bombas de expulsión como *tetA* y *tetB*. Los factores de virulencia son endotoxina, plásmidos como *pef*, *spv* y *rck*, fimbrias, lípido A (que es un lipopolisacárido) e islas patogénicas como *SPI1*. Causa fiebre entérica, infecciones paraintestinales, enteritis, enterocolitis, meningitis, neumonía, infección urinaria y gastroenteritis. El

tratamiento consiste en fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación [Martínez 2007].

Staphylococcus aureus

Son cocos Gram negativos, anaerobios facultativos, típicos de la microflora habitual de la piel. Su resistencia está mediada por la producción de enzimas extracelulares inactivadoras de la penicilina (β -lactamasas), inducibles y constitutivas, codificadas por el gen *blaZ*, el gen *mecA*, la expresión de la proteína PBP2a, modificación de la diana (ARNr 23s) por la acción de metilasas codificadas por el gen *erm* (A, B, Y), expulsión activa del antibiótico, codificado por genes *mrs* (A, B), *erp* (A), y *vga* (A, B), inactivación del antibiótico por genes *inu*, *vat* y *vgb*, modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o de proteínas ribosomales. Cuenta con islas patogénicas como *SaPI* y *vSa* como factores de virulencia. Las infecciones que causa son del tracto respiratorio, endocarditis e infecciones de la piel son tratadas con: glucopéptidos como vancomicina y teicoplanina, oxazolidinonas como linezolid, la combinación de quinupristina/dalfopristina, tigeciclina, daptomicina [Mesalles 2008].

Staphylococcus epidermidis

Estafilococo aerobio, no productor de coagulasa, muy frecuente en la piel humana y zonas como rostro, tórax y axilas. El gen *tca R* y su interacción con múltiples antibióticos le otorga una resistencia a varios fármacos. Su principal factor de virulencia es la formación de biofilm compuesta de una adhesina intracelular polisacárida *PIA*. Causa bacteremias asociadas a catéteres intravasculares, endocarditis. Son tratados con penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina y vancomicina [Wang 2011, Fredheim 2011].

Streptococcus pneumoniae

Es una bacteria alfa-hemolítica, se localiza en la flora habitual nasofaríngea y orofaríngea. Tiene resistencia a β -lactámicos como penicilina, cefalosporinas de primera y tercera generación, su mecanismo de resistencia está en relación con cambios en la afinidad de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP-penicilin-binding proteins). Está rodeada de una cápsula polisacárida que le protege de ser

fagocitado por leucocitos, también posee otras enzimas como neumolisina y neuraminidasa. Causa meningitis, neumonía, bacteremia. Los medicamentos como cefalosporinas y amoxicilina son los más usados en los tratamientos [Ruza 2003].

Streptococcus pyogenes

Es un coco beta-hemolítico no formador de esporas también conocido como Streptococcus del grupo A habitual del tracto respiratorio. Cuenta con varios factores de resistencia como *ermA*, *ermB*, *mefA* y a tetraciclinas con los genes *tetM* y *tetO*. En su pared presenta la proteína M que impide su fagocitosis, produce varias toxinas importantes para su virulencia: toxina eritrogénica, hialuronidasa, estreptoquinasa, DNasa y hemolisinas como estreptolisina O y estreptolisina S que descomponen los eritrocitos, plaquetas y leucocitos polimorfonucleares. Causa enfermedades como el Síndrome del Shock tóxico estreptocócico (SST), escarlatina, fiebre reumática aguda, fascitis necrosante tipo II o gangrena estreptocócica. Es muy sensible a las penicilinas y cefalosporinas pero si el paciente presenta alergia se recomienda la eritromicina [Ruza 2003].

Detección de infecciones intrahospitalarias

En los hospitales de todo el mundo el desarrollo y uso de una gran variedad de antibióticos, aunado a la capacidad de adaptación genética de las bacterias, ha resultado en el desarrollo de los linajes con resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos, la especial preocupación por la alta tasa de resistencia a los antibióticos observada en cepas de *A. baumannii*, en Estados Unidos se ha incrementado dramáticamente [Lockhart, 2007]. En el ser humano *P. aureginosa* produce una neumonía aguda y una sepsis acompañada de altas tasas de mortalidad [Solh 2008, Quinn 2003]. En muchos casos estas bacterias forman parte de nuestra flora intestinal como es el caso de *E. faecium* que ha surgido en las últimas décadas como un patógeno nosocomial importante con una alta resistencia a múltiples antibióticos [Murray 2000, Leavis 2006], al igual que *E. faecalis* se ha relacionado con rasgos inherentes de enterococos, lo que permite a la bacteria tolerar ambientes diversos y hostiles [Hancock 2006]. Esto es lo que le

da una gran importancia a las diversas técnicas de detección que deben ser cada vez más rápidas y eficientes. A continuación se describen las más usadas en la clínica y en laboratorios.

Cultivo

El diagnóstico de las infecciones bacterianas se efectúa mediante examen microscópico y cultivo de la muestra clínica obtenida del foco de infección que puede ser pus, orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, etc. Un aspecto fundamental es que las muestras recogidas del lugar de infección hayan sido tomadas, trasladadas y conservadas correctamente hasta su procesamiento. Al sembrar una muestra clínica en un medio de cultivo, las bacterias existentes empiezan a multiplicarse, además el aislamiento por cultivo permite su posterior identificación y el estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos. Los medios de cultivo deben contener los elementos nutritivos necesarios para permitir la multiplicación de las bacterias. Con frecuencia en el material clínico hay varios tipos de bacterias por lo que se utilizan medios sólidos específicos para aislar y separar cada una de las diversas bacterias en el material. La siembra se efectúa con un asa de nicrom sobre la superficie de agar estéril contenido en una placa de Petri, las placas se llevan a la estufa y durante la incubación de 18 a 24 horas con una temperatura de 35 a 37 °C; en ese periodo cada bacteria se multiplica dando lugar a unos agregados de millones de bacterias que forman colonias cuyo tamaño es de varios milímetros lo que las hace visibles. Al observar las colonias en los medios de cultivo deben evaluarse su tamaño, su forma, la textura (mucosa, lisa, rugosa), el brillo de la superficie y el aspecto de sus bordes, lo que permite inicialmente caracterizar el tipo de cepa [Prats 2006].

PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica utilizada como herramienta sumamente útil para diagnóstico de enfermedades infecciosas y parasitarias. La reacción se realiza cuando se mezclan el templado de ADN, dos iniciadores apropiados o Primers no mayores de 30 bases, la polimerasa Taq, dNTPs y el buffer. Una vez mezclados se inician los ciclos, en los cuales se lleva a

cabo la desnaturalización del ADN, alineamiento de los iniciadores, y la síntesis exponencial de los productos de amplificación [Zavala 2005]. Después de la identificación del microorganismo patógeno, se define el tratamiento adecuado, siendo éste un grupo de acciones orientadas a controlar cada uno de los componentes del complejo ambiente-bacteria-hospedero. Sin lugar a dudas, la PCR es una herramienta que permite el análisis y detección de agentes patológicos de manera eficiente y rápida; sin embargo, es limitado su análisis para la identificación en paralelo de cualquier agente patógeno, por lo que se han implementado otras estrategias moleculares basadas en microarreglos.

Microarreglos

A mediados de los 90, Schena *et al.* describieron por primera vez el desarrollo de un microarreglo para el monitoreo de la expresión de múltiples genes en paralelo. Las muestras de una placa de 96 pocillos fueron impresas en cristales de microscopía en una área de 3.5 x 5.5 mm. Las muestras una vez depositadas sobre el cristal fueron tratadas química y térmicamente para fijar el ADN a la superficie y desnaturalizarlo [Miranda 2008]. Posteriormente Lockhart *et al.* desarrollaron una tecnología que permitía medir la expresión de miles de genes en paralelo. El método desarrollado se basa en la cuantificación de la proporción relativa del ácido nucleico (ADN o ARNm) por hibridación sobre arreglos de alta densidad de sondas de ADN. Estas tecnologías han tenido un continuo desarrollo, con un aumento paulatino de la densidad de los *chips*, que en la actualidad es de 5 micras, y de la resolución del escáner para su lectura. Su soporte sólido, generalmente es de vidrio o silicio, al que se le ha adherido material genético formando una matriz de miles de puntos equi-espaciados. Cada punto contiene millones de clones de una secuencia específica asociada a un gen. Se le llama sonda (probe) al material inmovilizado sobre el vidrio y target al material que se agrega luego sobre el arreglo. El objetivo de esta tecnología es el análisis simultáneo de una gran cantidad de genes, actualmente ésta tecnología se aplica al análisis de la expresión génica, detección de mutaciones y polimorfismos, secuenciación, seguimiento de terapia, medicina preventiva, tamizaje molecular, toxicología de fármacos y diagnóstico molecular.

Justificación

Las infecciones nosocomiales tienen consecuencias sociales y económicas trascendentales. En el aspecto de la salud humana producen importantes afecciones como la bacteriuria (bacteriemia en vías urinarias), neumonía asociada a ventilación tardía, infección de sitios quirúrgicos, infección asociada a catéteres, infección intra-abdominal, infección del sistema nervioso central, etc. Incrementando así el desequilibrio existente entre la asignación de recursos para atención primaria y secundaria al desviar los escasos fondos con los que cuentan las instituciones de salud hacia el tratamiento de afecciones potencialmente prevenibles. La evidencia científica demuestra que la implantación de sistemas adecuados de vigilancia y control de las infecciones nosocomiales consiguen reducir las cifras globales de incidencia y mortalidad entre el 19 y el 41% [Geubbels 2006, Haley 1985]. Según una estimación, hay al menos 5, 000 tipos de virus y más de 300, 000 especies de bacterias que desafían a los seres humanos, muchos de los cuales son capaces de replicarse y evolucionar miles de millones de veces en una generación humana. Estas disparidades claramente coadyuvan a la persistencia infecciosa de los agentes patógenos, permitiendo la evolución de las cepas más virulentas que rápidamente exceden la capacidad de los seres humanos para responder a ellas [Williams 2005]. En este sentido es determinante obtener información de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos en agentes infecciosos por lo que este trabajo contribuirá al conocimiento y a la identificación precisa y rápida de los agentes patógenos para la atención adecuada de pacientes con infecciones nosocomiales o intrahospitalarias.

Objetivo general

Diseñar e implementar un microarreglo útil para la detección de agentes infecciosos comunes en hospitales mexicanos así como del perfil de resistencia de los patógenos identificados a los antibióticos más usados en la clínica.

Objetivos particulares

Estandarizar las técnicas para la implementación de un microarreglo

Diseñar un microarreglo con sondas de genes de resistencia, virulencia y metabolismo características de las cepas seleccionadas

Metodología

Diseño del microarreglo

Se diseñaron sondas de 20-37 nucleótidos (nt) empleando el programa Primer3, disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; con el objeto de calcular la mínima energía libre para el par sonda/complemento. De igual manera, se empleó dicho programa en la selección de sondas con un contenido idóneo de CGs y para el cálculo de TMs. De esta manera se seleccionaron sólo aquellas sondas que cumplan con los siguientes criterios: $T_m \geq 80^\circ\text{C}$, ΔG homodímero >212 Kcal/mol, y ΔG ajustada >255 Kcal/mol [Markham 2005]. Las bacterias seleccionadas responsables de infecciones nosocomiales y cuyo genoma es de acceso público fueron las siguientes: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* EHEC O:157, *Escherichia coli* EPEC, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*.

El diseño de sondas fue de 2 tipos: 1) *perfect match* o *PM*, las cuales contienen la secuencia complementaria del gen de interés y 2) *mismatch* o *MM*, las cuales tienen nucleótidos que no son complementarios a la secuencia que se pretende buscar, con el objeto de tener un sistema de detección que limite la aparición de

falsos positivos. Para el diseño de las sondas *MM* fue necesario realizar simulaciones teóricas contra la base de datos de KEGG (<http://www.genome.jp/>) así se evitó que fueran homólogas a genes ortólogos de otros organismos. Cada sonda fue alineada usando Basic Localment Search Tool (BLAST por sus siglas en inglés) ubicado en PUBMED para confirmar. Los genes seleccionados son los siguientes y corresponden 3 o 5 a cada especie de bacteria u hongo:

- *gyr A*
- *DNA gyrase subunit B*
- *mac B*
- *gyr B*
- *bla 1*
- *bla 2*
- *gro EL*
- *bmr a*
- *sat*
- *tet Efflux*
- *aaf1*
- *bgl 2*
- *tet(L)*
- *Glucokinase*
- *rsb W*
- *pep F*
- *collagen adhesin protein*
- *glycine betaine*
- *Toxin Hemolysin*
- *ATP-binding protein*
- *recombination*
- *protein f*
- *vanC2/3*
- *rec f*
- *aph(2'')-Id*
- *Pathogenecity Island*
- *pbp C*
- *erm (B)*
- *van B*
- *tet L*
- *ent A*
- *tetM*
- *Tn1545(transposon)*
- *van A*
- *multi-drug Resistance*
- *streptogramin A acetyltransferase*
- *sgr S*
- *van A*
- *omp A*
- *stx2A*
- *hyl A*
- *OmpA*
- *stx1A*
- *hep A*
- *csr A*
- *mdt E*
- *beta lactamase*
- *rfa Q*
- *ADC56064.1*
- *hly*
- *prf A*
- *Hydrolase*
- *exotoxin A*
- *mex C*
- *arm R*
- *ter Z*
- *acr B*
- *inv A*
- *acr R*
- *fli C*
- *rlu D*
- *cap5L*
- *clf B*
- *saPI_n2*
- *ica R*
- *pur R*
- *ure E*

- *ure D*
- *cps E*
- *T6P*
- *hexB1*
- *psp A,*
- *opp A*
- *opp*

Los microarreglos fueron impresos usando un sistema robótico de micro-deposición por contacto *SpotBot3* Personal Microarrayer, de la marca TeleChem Internacional (USA, CA) en la Unidad de Fisiología Celular de la UNAM. El tamaño promedio de los puntos o “spots” depositados en el arreglo fue de aproximadamente 150 micras. La concentración de los oligonucleótidos antes de la impresión fue ajustada a 50 μ M en 15% de glicerol-0.25 M de ácido acético. Se determinó si en la muestras de DNA existían genes de resistencia a los siguientes antimicrobianos de uso clínico: aminoglicosidos (estreptomina, astromicina, kanamicina), fluoroquinolonas (norfloxacina, enoxacina, ofloxacina), beta-lactamatos (ampicilina, amoxicilina, meticilina, oxacilina, cefotaxime), estreptograminas (lincomicina, streptogramina A), tetraciclinas (tetraciclina, minociclina) y glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina).

Estandarización

Amplificación

El DNA de las cepas tipo fue amplificado usando el kit Genome Plex[®] Complete Whole Genome Amplification (WGA) y REPLi-g Midi Kit descritos a continuación.

Genome Plex[®] Complete Whole Genome Amplification (WGA)

Se preparó una solución de 1 ng/ μ l, luego se le adicionó 1 μ l de buffer de fragmentación 10 X dentro de un tubo de PCR. Se calentó la mezcla de reacción a 95°C por 4 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo. Se le agregaron 2 μ l de 1X Library Preparation Buffer y 1 μ l de Library Stabilization Solution. Se agitó empleando vórtex y centrifugó para colocarlo en un termociclador a 95°C por 2 minutos. Se enfriaron las muestras en hielo, para centrifugarse y retornarlas al hielo, se adicionó 1 μ l de Library Preparation Enzyme luego se agitaron

empleando vórtex y centrifugaron rápidamente. Se colocaron las muestras en un termociclador y se incubaron a 16°C por 20 minutos, 24°C por 20 minutos, 37°C por 20 minutos, 75°C por 5 minutos y a 4°C. Se removieron las muestras del termociclador y centrifugaron rápidamente. La reacción Master Mix se preparó con 7.5 µl de 10 X Amplification Master Mix, 47.5 µl de Water, Molecular Biology Reagent y 5 µl de WGA DNA Polymerase añadiendo 15 µl a cada muestra. Se agitó empleando vórtex y se centrifugó rápidamente, poniendo en el termociclador en una Desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos y luego 14 ciclos para Desnaturalización a 94°C por 15 segundos y alineación/Extensión 65°C por 5 minutos. Se sacaron y guardaron a – 20°C

REPLI-g Midi Kit

Se preparó un Buffer D1 de Desnaturalización 9 µl de Reconstituted Buffer DLB y 32 µl de Nuclease-Free water y N1 de Neutralización 12 µl de Stop solution y 68 µl de Nuclease-Free water. Colocando 2.5 µl de la solución de DNA a 10 ng/µl, se le adicionó 2.5 µl de Buffer D1 mezclando con vórtex y centrifugando rápidamente. La primera incubación fue a temperatura ambiente por 3 minutos. Se adicionaron 5 µl de Buffer N1 mezclando con vórtex y centrifugando rápidamente. Se preparó el Master Mix en hielo: 10 µl de Nucleasa-Free water, 29 µl de REPLI-g Midi Reaction Buffer y 1 µl de REPLI-g Midi DNA Polymerase. Añadiendo a las muestras 40 µl de Master Mix. Incubando a 30°C de 8 a 16 horas, e inactivando por calor las muestras 3 minutos a 65°C y se guardaron a -20°C.

Purificación

La purificación fue realizada con un Kit QIAquick PCR Purification y con un protocolo recomendado por Kreatech. Se añadieron 5 volúmenes de Buffer PB para un volumen de la reacción PCR y se mezcló (si la mezcla era naranja o violeta se añadía 10 µl de acetato de sodio 3M pH 5.0 y el color debería volverse amarillo), colocando un QIAquick column en un tubo de 2 ml. Para la unión del ADN con la matriz de la membrana del filtro, se aplicó la muestra a la columna QIAquick y se centrifugó de 30 a 60 segundos a 13000 rpm, descartando el

sobrenadante. Se le añadieron 0.75 ml (750 µl) de Buffer PE, centrifugando de 30 a 60 segundos a 13000 rpm y descartando el sobrenadante. Se centrifugó en un tubo de 2 ml por 1 minuto a 13000 rpm para eliminar etanol. Se colocó la columna en un tubo QIAquick limpio de 1.5 ml. Para eluir el ADN, se añadió 50 µl de Buffer EB (10mM Tris-HCL, pH 8.5) y centrifugando por un minuto.

Marcaje

El marcaje se hizo con el kit BioPrime[®] Array CGH Genomic Labeling System, ULS[™]array CGH Labeling y NimbleGen Dual-Color DNA Labeling, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Hibridación

El arreglo fue pre-tratado antes de hibridarlo, para esto se preparó una solución de prehibridación 0.1X SDS, 5X SSC, 1% BSA (polvo) y Agua mili Q. El arreglo se colocó encima de un vaso de precipitados con agua hirviendo para usar el vapor por 10 segundos y repetir 3 veces, se usó un crosslinker para dar 2 pulsos de 120 mJ/cm², al sacarlo fue colocado en la cámara dentro del baño a 42°C por una hora (dentro de la cámara se encuentra la solución de prehibridación) el secado fue por centrifugación. Previo a la Hibridación se preparó la solución de hibridación con ADN de esperma de salmón, 2 µl de tRNA de levadura 4 µg/µl y Dig Easy para completar. Las muestras se resuspendieron en 20 µl de agua y 20 µl de solución de hibridación, se agitaron con vórtex y centrifugaron rápidamente para colocarlas en un termo block a 99°C por 5 minutos. Las muestras se inyectaron en cada arreglo el cual fue colocado en la cámara de hibridación por 24 horas a 42°C. Se prepararon las soluciones de lavado 0.01X SSC con 0.28 ml de 20X SSC y 559.7 ml de agua mili Q, 0.1X SSC con 2.8 ml de 20X SSC Y 557.2 ml de agua mili Q, 0.1X SSC, 0.1% SDS con 2.8 ml de 20X SSC, 5.6 ml de 10% SDS y 551.6 ml de agua mili Q y 2X SSC, 0.1% SDS con 112 ml de 20X SSC, 11.2 ml de 10% SDS y 996.8 ml de agua mili Q. Se precalentó la solución 2X SSC, 0.1% SDS a 42°C, sacando el arreglo y colocándolo dentro de la solución precalentada. Posteriormente, el arreglo fue transferido 0.1X SSC, 0.1% SDS se agitó por 5 minutos, el proceso se repitió con la solución 0.1X SSC agitando por 5 minutos y

finaliza con la solución 0.01X SSC agitando por 10 segundos. El arreglo fue secado mediante una centrifuga. El análisis de la imagen se realizó con el escáner GenePix (Molecular Devices) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para el análisis de los datos, se empleó el software de análisis GenePix Pro

Resultados

Diseño del microarreglo

El trabajo consistió en realizar un diseño para la impresión de las sondas correspondientes a los micro-organismos anteriormente enlistados. Este diseño se representa en la **Tabla 1**. Como se puede apreciar, se emplearon sondas que potencialmente identificarían genes de resistencia y virulencia presentes en dichas bacterias. De igual manera se imprimieron controles negativos que se pueden identificar en la **Figura 1**. ésta muestra la distribución de las sondas en el chip con una abreviación del nombre del organismo y el nombre de la sonda, en cuanto a las 8 MSS o miss match son para evitar falsos positivos, mientras las secuencias NKD2MU1F, NKD2MM1R y NKD2MM1F son los controles positivos. En la **Figura 2** se observan las variaciones entre los valores de número de nucleótidos resaltando como los valores más frecuentes de 26 a 30 nucleótidos, en el caso de la **Figura 3** la variación es de los valores de T_m teniendo la mayoría en 60°C y en la **Figura 4** se demuestra que las sondas se encuentran en el valor del 50%. La **Figura 5** es el chip de la **Figura 1** pero ésta se dividido en genes de virulencia, resistencia, metabolismo, vacíos, los controles y las sondas MM.

Tabla 1. Sondas de oligonucleótidos de los genes de resistencia, virulencia y metabolismo según el organismo al que pertenecen

Organismos	Sonda	Bas es	Secuencia	T °C	% GC
<i>A. baumannii</i>	GyrA	25	ATT GGT TGA TGG TCA GGG TAA CTT C	57	44
	DNA gyr B	28	CTC TAT TTT ATC AAA ATC CAA TCG GCT T	54.2	32.1
	Mac B	28	TTC GGC TTG GCG TTC AAC CCT AGA TCG A	64.8	53.5
<i>B. anthracis</i>	GyrB	29	GGT AGA TTA GCA GAT TGC TCT TCA AAA GA	56.8	37.9
	Bla 1	33	GGA AGC TGT TTC TTA CCA TCA AGA TAA AGG ACG	60.2	42.4
	Bla 2	22	ATG GTT TAA ACG CTG CAC CGC A	60.4	50
	GroEL	26	GGT GCG AAC CCA ATG GGT CTT CGT AA	62.8	53.8
<i>B. subtilis</i>	Bmra	30	CGA TCT CAG CAT CCG TCA CAT CTC GTT CTA	62.2	50
	Sat	30	CGA GAG ACC ACA TCC ACT TAT CAG GCA CAA	62.8	50
	Tet Efflux	24	TTG TGT TTG GAT TCA CCG CGT GTC	60.3	50
<i>C. albicans</i>	AAF1	28	ATC ACA TAG TCA GCC ACA ACC ACA ACC A	61.8	46.4
	BGL 2	26	ATT AGC TTC CAA GAT TAA TGA CAT CA	52.7	30.7
	Tet(L)	27	TAG GTT TCT TTG TGA ATT ATC TTT ATA	48.9	22.2
<i>C. difficile</i>	Glk	26	GCA CTT GGA GAG GCA AAG TTT GGA AG	60.3	50
	Rsb W	30	ACA GCA TCT GGA ATT GCC AAT AAG ATG GGT	61.8	43.3
	Pep F	28	TGT TAT TAA ACA TGC AAA TGG AGG AGT T	55.6	32.1
<i>C. perfringens</i>	Glk	30	TGG ACA TTC AAC TGT TGC ACC TGG AAC TGT	63.4	46.6
	Collagen adhesion protein	31	TGA TGG ATT ATT AAA TAA TGA TAC TGA TTT A	50.2	19.3
	Gly B glycine betaine	25	AGT GGT GGT GAG CAA CAG AGA GTA G	60	52
<i>C. diphtheriae</i>	Toxin Hemolysin	26	TCT TCT ACA CGA ATT GAC GCC TCT GG	60.2	50
	ATP-binding protein	30	ATG GCA CTA GCT GTG GTC TGC ATG TTT GCA	65.3	50
	Recombination protein f	30	AAC ATT GTT GAG GCC ATC GGC TAT GTG GCT	65.1	50
<i>E. casseliflavus</i>	VanC2/3	30	CAA GCC AAC CAG CAA GAA CAA ATC GAA GCT	63	46.6
	Recf	21	TTT ATC CAG ACC CAT GGC TTC	54.7	47.6
	Aph(2'')-Id	22	TGG CGT ACA AAG TGC TCC TAC G	59.3	54.5
<i>E. faecalis</i>	Pathogenicity Island	27	TGT TAC TTT GCT TTT CAT GTA TTG GTT	54.1	29.6
	PbpC	27	AAT CGT GTT GGT GGA ATT CAG GTT GGG	61.3	48.1
	Erm(B)	22	GCG GTT CAA ACT GTT GCT TGG T	58.9	50
	Van B	35	CGC TTC CCT ATT TGC TCT TTG AAA CGG ATT GTG CG	64.9	48.5
	TetL	29	ACT GTG GCA AGC GAA ATT ATG GCG ATT CT	62.3	44.8
<i>E. faecium</i>	EntA	25	TAA ACA GAC ACA ACT TAT CTA TGG G	52.5	36
	tetM, Tn1545(transposon)	20	CAT CGA AGT GCC ACC GAA TC	56.3	55
	Van A	26	CAT TCA CAT CGA AGT GCC ACC GAA TC	60	50
	Multi-drug Resistance	27	AAC AAA GGG AAA TGT TAC TTG ATG CAC	56.5	37
	Streptogramin A acetyltransferase	26	GTT CGG TGA ATA TCC AAG GTA CGC TT	58.8	46.1
<i>E. coli K12</i>	SgrS	25	GCA ACC AGC ACA ACT TCG CTG TCG C	64.8	60
	VanA	30	GTG AGC CGA ATA CCG CTA ACT TTG TAC AGG	61.9	50
	OmpA	26	TTC TGC TTC TTC CAG GTA GTG TGT GG	60.3	50

Tabla 1. Continuación

Organismos	Sonda	Bases	Secuencia	T °C	% GC
<i>E. coli</i> EHEC	Stx2A	28	CAC TCA CTG GTT TCA TCA TAT CTG GCG T	60.3	46.4
	HlyA	24	TCC TCT TTC TTT CCT GGC TGC TGC	61.4	54.1
	OmpA	24	AAG TGC TTG GTC TGT ACT TCC GGT	60.3	50
	Stx1A	24	CCA TTC GTT GAC TAC TTC TTA TCT	52.3	37.5
<i>E. coli</i> EPEC	HepA	30	GCT GAC CTA TAT CGG TAC TCG CCT TGA TAC	60.9	50
	CsrA	23	TAA AGG GCA ACC AGG TAC GTA TT	56.1	43.4
	HepA	30	GCT GAC CTA TAT CGG TAC TCG CCT TGA TAC	60.9	50
	MdtE	30	AAT ACC GTT GTT ATT CTG CGG CGC GAT GCT	65.2	50
<i>K. pneumoniae</i>	Beta lactamase	27	GTG AAT CAG CAA AAC GCC GGG TTA TTC	60.5	48.1
	RfaQ	26	TAT CGC GGT GAT CTG GCC AAA AGA TC	60.8	50
	ADC56064.1	25	ATC CGC GCC GGG TTC AAC GGG CCG C	73.5	76
<i>L. monocytogenes</i>	PlcA	37	CTG CAG CAT ACT GAC GAG GTG TGA ATG TTA ATG AAG T	63.4	43.2
	Hly	30	GAT GCA TCT GCA TTC AAT AAA GAA AAT TCA	55.3	30
	PrfA	25	AAC ACC CGC AGC TCC GCA TGA TAT T	62.9	52
<i>P. aeruginosa</i>	Hydrolase	27	CGC ATC CTG TTC CAT GCT CTG CTC GAC	64.7	59.2
	Exotoxin A	26	GCG CTC GAG CCT GCC GGG CTT CTA CC	70.5	73
	MexC	31	TGC TGT TCC AGA TCG ATC CGG CAC CGC TGA A	68.7	58
	ArmR	24	AAC AAA CCG TCC CGC ACC GAG ACC	65.5	62.5
<i>P. mirabilis</i>	AcrA	26	GAT TAA TTT TTG CAT TAG TCA CTG TA	50.4	26.9
	TerZ	30	GTA GTT ATG TAG AAG CAG GAA CAT CTT TGT	56.7	36.6
	AcrB	30	ATG GTG TAC AAA CAG GTT TCT TTG GTT GGT	60.6	40
<i>Salmonella</i> spp	InvA	27	TGG CGA TAG CCT GGC GGT GGG TTT TGT	67.8	59.2
	AcrR	26	GAG CTA TCA GAA TCC AAT ATT GGT GA	54.6	38.4
	FliC	26	GGC TTT AGC CTC TGT CAA ATC AGC AT	59.4	46.1
<i>S. aureus</i>	RluD	30	GTT CAT CCA TCA CCA GGG CAT TAT ACC AAT	60.3	43.3
	Cap5L	28	ATG ATG TGT GGA TTG GTG CAA ATG TAA T	57.6	35.7
	CifB	30	CAA CGA ATG ATG CTA ATA GCA TAG CAA CAA	57.7	36.6
	SaPln2	27	AGG TGT ATT AGA TAA TGA AGG TAT GGT	53.4	33.3
<i>S. epidermidis</i>	IcaR	21	GTA TTT ACG TGC GTT TAT TTG	48	33.3
	PurR	21	TGA CAC AAT ACC TCA TGA ACC	52.4	42.8
	UreE	26	TGA TTA TAG AAG AAA TTC AAG GAA AT	49	23
	UreD	27	TAT TCA TCT AAT GGC CAA GAT TTC ACG	55.4	37
<i>S. pneumoniae</i>	CpsE	24	TTG TTA GAG AGA CAG AAC TTG AAC	52.5	37.5
	Trehalose-6-phosphate	26	GCT TTC TGT GTG GAA TTA CTA TAA AT	51.7	30.7
	HexB1	22	CTC CTA GTG CCC TAT ATC TTT G	52	45.4
	PspA	21	GAT CAA CAA GCT GAA GAA GAC	51.4	42.8
<i>S. pyogenes</i>	OppA	29	AAC CTT CCC AGT TCA ATT AGA TTA CCC TG	58.3	41.3
	OppB	26	ACT GGT TTG AAG CAC GCG GTT GAC GA	64.4	53.8
	MefA	27	CGC GAT GGT CTT GTC TAT GGC TTC ACT	62.1	51.8
	NKD2MM1F	25	GTT GAA GTT ATT GAG TTG GAT ACG T	53.3	36
	NKD2MM1R	25	CAA ATT AAT AAA AAA CCA ACG TTA A	47.5	20
	NKD2MU1F	25	TGA AGT TAT TGA GTT GGA TAT GTG G	53	36

CHIP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	MSS	MSS	MSS	Cdiff_Glk	Cdiff_Glk	Cdiff_Glk	Calb_Tet	Calb_Tet	Calb_Tet	Abau_MacB	Abau_MacB	Abau_MacB	Abau_DNA
2	MSS	MSS	MS	EntF_tetM	EntF_tetM	EntF_tetM	EntF_EntA	EntF_EntA	EntF_EntA	Ecass_Recf	Ecass_Recf	Ecass_Recf	MS
3	Cper_Glk	Cper_Glk	Cper_Glk	Cdiff_PepF	Cdiff_PepF	Cdiff_PepF	Cdiff_RsbW	Cdiff_RsbW	Cdiff_RsbW	Ban_Bla 2	Ban_Bla 2	Ban_Bla 2	Bar_Bla
4	EntF_StA	EntF_StA	EntF_StA	EntF_MDR	EntF_MDR	EntF_MDR	EntF_VanA	EntF_VanA	EntF_VanA	Efaec_Pisl	Efaec_Pisl	Efaec_Pisl	EcasAph(Id)
5	MSS	MSS	MSS	Cper_Glyb	Cper_Glyb	Cper_Glyb	Cper_Cp	Cper_Cp	Cper_Cp	Bsub_Sat	Bsub_Sat	Bsub_Sat	BsuBm
6	MSS	MSS	MSS	EcoK_VanA	EcoK_VanA	EcoK_VanA	EcoK_SgrS	EcoK_SgrS	EcoK_SgrS	Efaec_Erm(B)	Efaec_Erm(B)	Efaec_Erm(B)	MS
7	Cdip_Rf	Cdip_Rf	Cdip_Rf	Cdip_ATP	Cdip_ATP	Cdip_ATP	Cdip_TH	Cdip_TH	Cdip_TH	Calb_BGL	Calb_BGL	Calb_BGL	CallAAF
8	EHEC_HyIA	EHEC_HyIA	EHEC_HyIA	EHEC_Stx2A	EHEC_Stx2A	EHEC_Stx2A	EcoK_OmpA	EcoK_OmpA	EcoK_OmpA	Efaec_TetL	Efaec_TetL	Efaec_TetL	Efaec_Van
9	EMPTY	EMPTY	EMPTY	Pae_Exotoxin A	Pae_Exotoxin A	Pae_Exotoxin A	Pae_Hydrolase	Pae_Hydrolase	Pae_Hydrolase	UPEC_HepA	UPEC_HepA	UPEC_HepA	EHECStx
10	EMPTY	EMPTY	EMPTY	Spneu_T6p	Spneu_T6p	Spneu_T6p	Spneu_CpsE	Spneu_CpsE	Spneu_CpsE	Sau_Cap5L	Sau_Cap5L	Sau_Cap5L	EMP
11	Pmir_AcrA	Pmir_AcrA	Pmir_AcrA	Pae_ArmR	Pae_ArmR	Pae_ArmR	Pae_MExC	Pae_MExC	Pae_MExC	UPEC_MdtE	UPEC_MdtE	UPEC_MdtE	UPEHep
12	Spyo_OppA	Spyo_OppA	Spyo_OppA	Spneu_PspA	Spneu_PspA	Spneu_PspA	Spneu_HexB1	Spneu_HexB1	Spneu_HexB1	Sau_SaPln2	Sau_SaPln2	Sau_SaPln2	SauCif
13	EMPTY	EMPTY	EMPTY	Pmir_AcrB	Pmir_AcrB	Pmir_AcrB	Pmir_TerZ	Pmir_TerZ	Pmir_TerZ	Kpne_ADC56064.1	Kpne_ADC56064.1	Kpne_ADC56064.1	KpneRfa
14	EMPTY	EMPTY	EMPTY	Spyo_MefA	Spyo_MefA	Spyo_MefA	Spyo_OppB	Spyo_OppB	Spyo_OppB	Sep_PurR	Sep_PurR	Sep_PurR	EMP
15	Sal_FliC	Sal_FliC	Sal_FliC	Sal_AcrR	Sal_AcrR	Sal_AcrR	Sal_InvA	Sal_InvA	Sal_InvA	Lmon_Prfa	Lmon_Prfa	Lmon_Prfa	LmonHly
16	NKD2MU 1F	NKD2MU 1F	NKD2MU 1F	NKD2MM 1R	NKD2MM 1R	NKD2MM 1R	NKD2MM 1F	NKD2MM 1F	NKD2MM 1F	Sep_UreD	Sep_UreD	Sep_UreD	SepUre

Figura 1. Diseño del chip en cada arreglo. Por laminilla se imprimieron 16 chips, cada sonda se encuentra por triplicado.

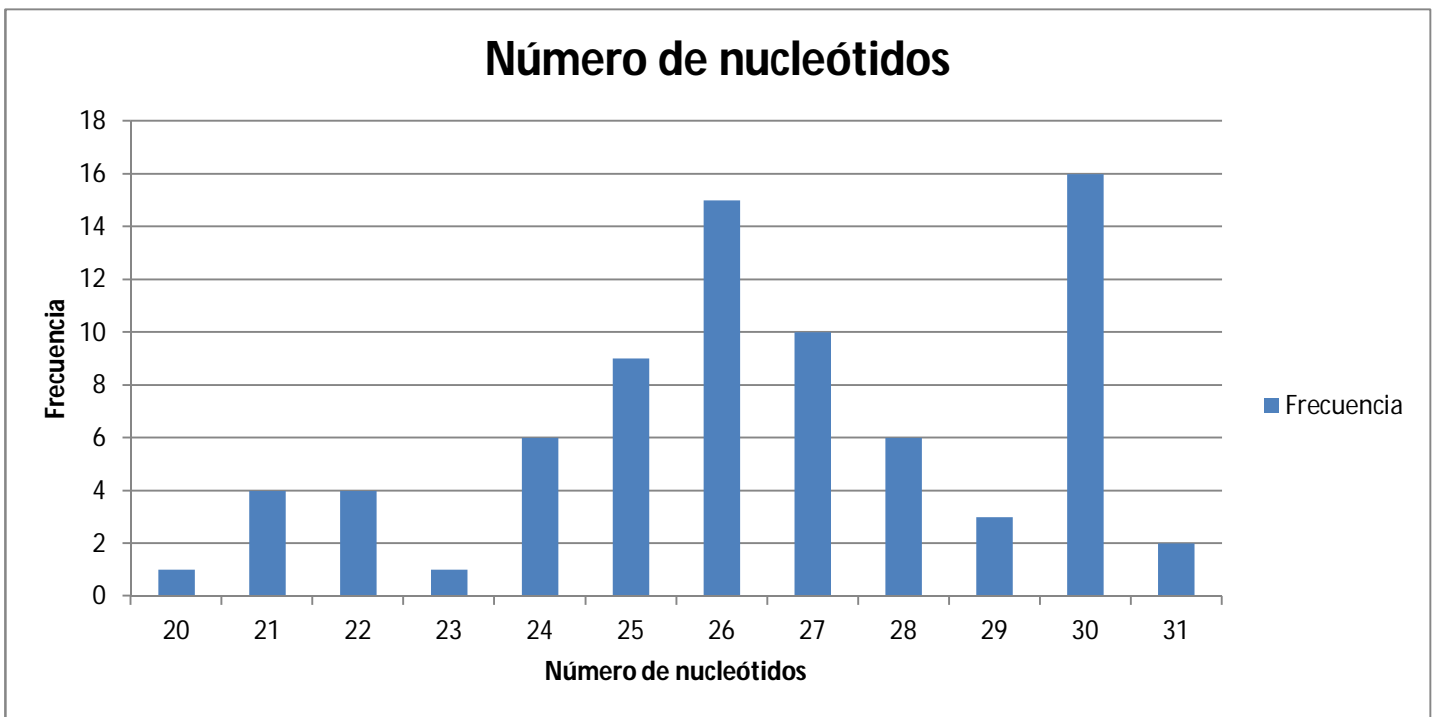


Figura 2. Variación entre el número de nucleótidos de las sondas seleccionadas

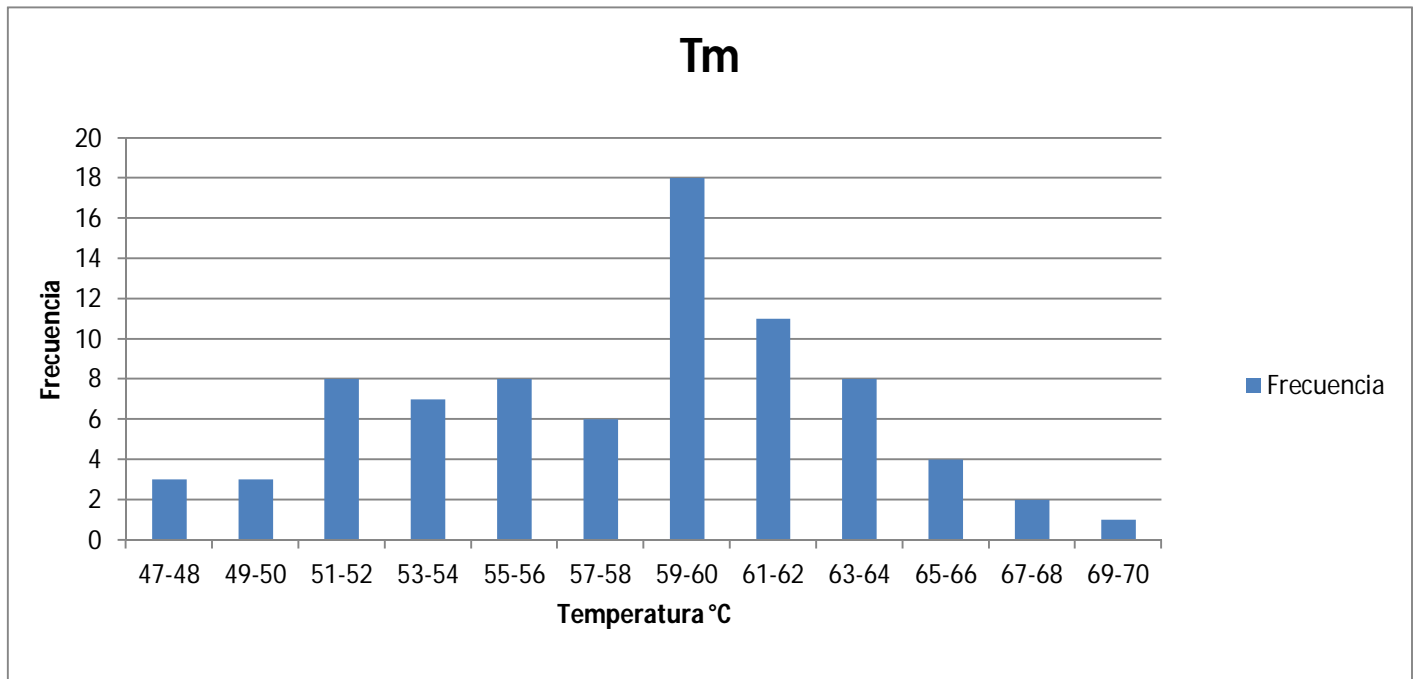


Figura 3. Variación entre las T_m de las sondas

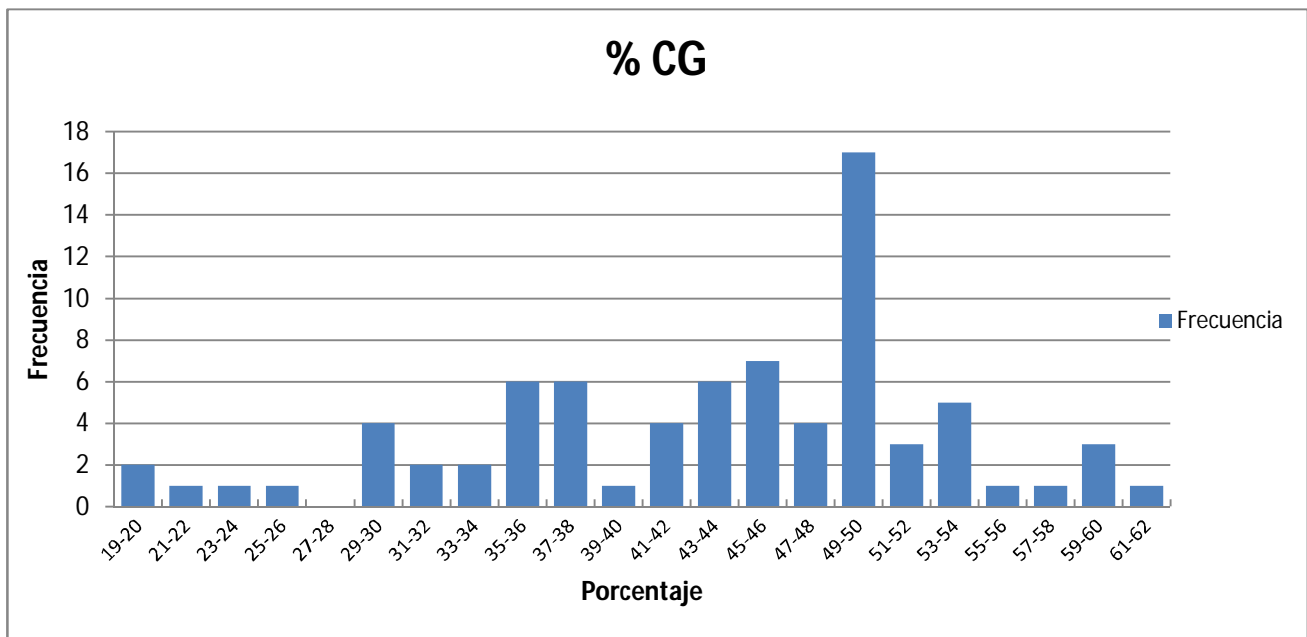


Figura 4. Variación entre los porcentajes de CG

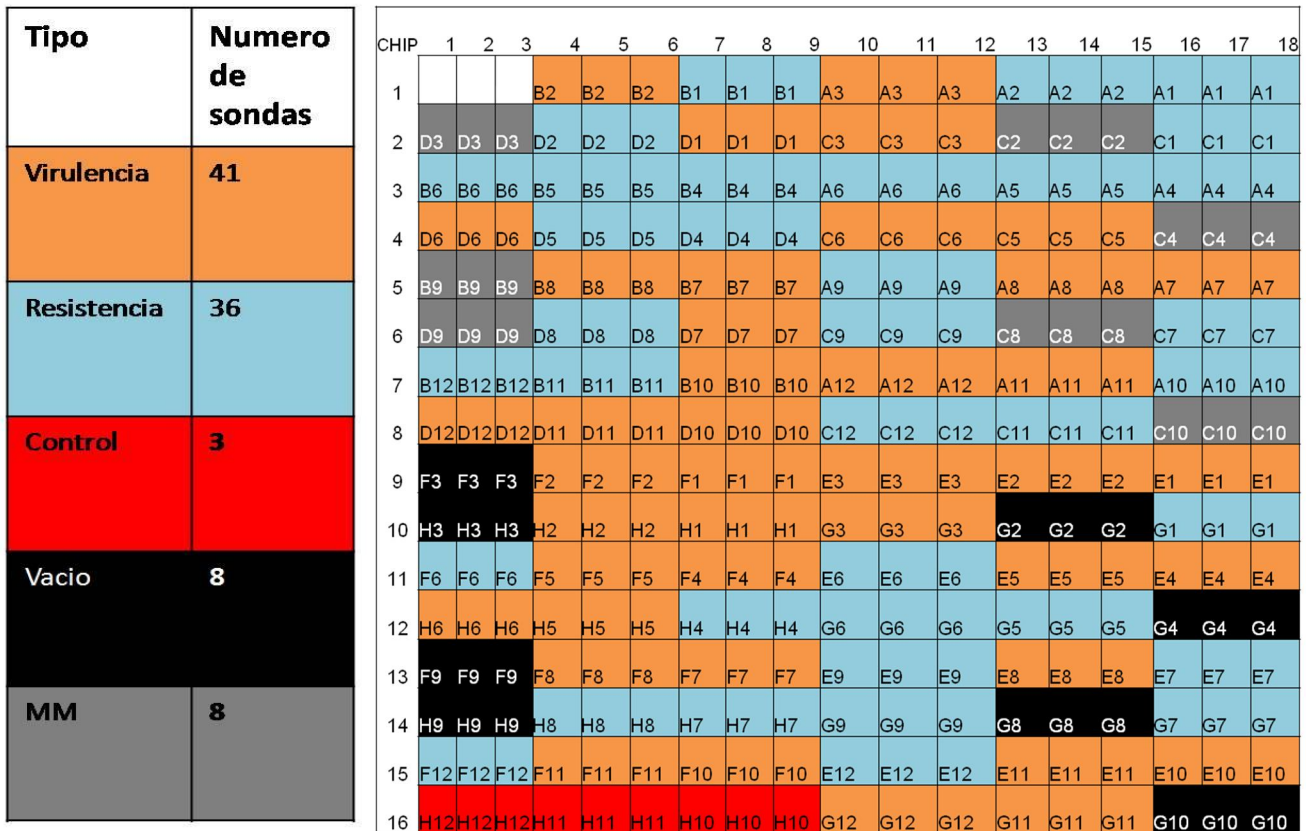


Figura 5. DISEÑO DEL CHIP CON LOS DIFERENTES TIPOS DE SONIDAS

Estandarización

La **Tabla 2** muestra los resultados de la amplificación, purificación y marcaje del DNA de los organismos usados en la hibridación. Estos datos son resultado del uso de los distintos kits descritos en la metodología, además los colores en verde y rojo representan los valores más altos y más bajos respectivamente.

Tabla 2. Datos obtenidos durante la estandarización de DNA bacteriano de los organismos que fueron hibridados

Organismo	Amplificación	Purificación	Marcaje	
	ng/μl	ng/μl	pmol/μl	ng/μl
<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii</i>	1462.16	259.975	28.6	743.7
<i>Candida albicans</i>	2122.44	167.19	3.5	91.6
<i>Clostridium difficile</i>	2312.44	84.96	12	945.1
<i>Clostridium perfringens</i>	1761.6	149.093	9.5	969
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2091.73	202.623	19.8	784
<i>Enterococcus faecalis</i>	1824.32	206.197	4	114.6
<i>Enterococcus faecium</i>	1598.26	214.354	17.3	1015.4
<i>Escherichia coli EPEC</i>	1717.87	287.74	27.4	757.8
<i>Escherichia coli CFT073</i>	1892.18	317.766	6.4	802.6
<i>Escherichia coli MG1655</i>	no amplificado	1281.07	4	395.5
<i>Homo sapiens</i>	no amplificado	243.745	12.8	341.3
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>	1936.77	318.452	16	1117.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	1930.55	196.45	20.2	883.5
<i>Pseudomonas aureginosa strain Boston 41501</i>	1587.05	241.099	11.1	942
<i>Proteus mirabilis Hauser</i>	1490.49	224.15	11.5	884.8
<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus Rosenbach strain 328</i>	1793.41	145.431	2.9	79.5
<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus Rosenbach strain FPR3757</i>	1920.23	153.799	4.9	612
<i>Staphylococcus epidermidis strain RP62A</i>	2033.55	193.939	9	877.6
<i>Streptococcus pneumoniae ATCC 33400</i>	2432.34	112.827	3.3	117.6
<i>Streptococcus pyogenes Rosenbach strain T1</i>	1858.98	169.71	3.6	109.9

Hibridación

La hibridación fue realizada y el orden del DNA de los organismos usados se observa en la **Figura 6** y **Figura 7**, donde encontramos los esquemas que muestran el orden con el que fueron cargadas las muestras. En el primer chip se usó DNA humano (Hs) en combinación con los DNA bacterianos y el segundo no cuenta con esta condición; ya que sólo se hibridó un chip con DNA de humano, ambas placas cuentan con 16 chips representados en la **Figura 1**.

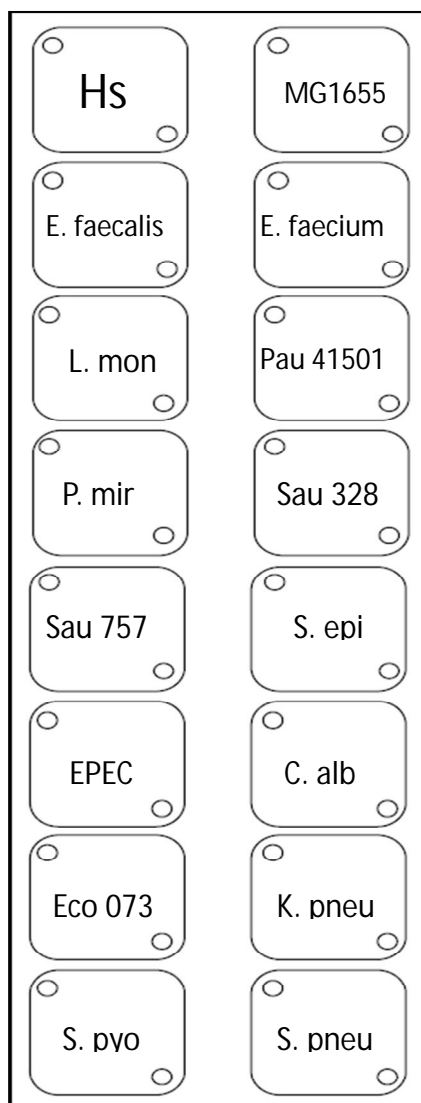


Figura 6. Arreglo 1, con el orden de los DNA obtenidos de micro-organismos de referencia empleados.

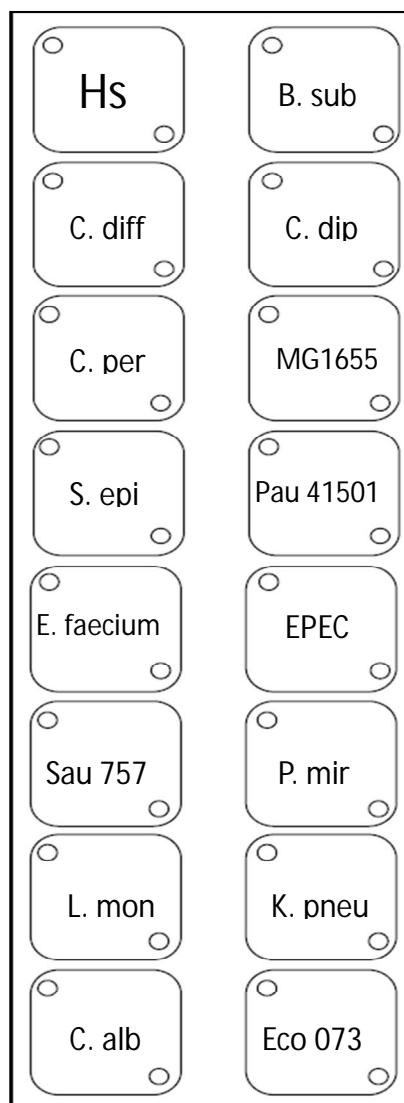


Figura 7. Arreglo 2, con el orden de los DNA obtenidos de micro-organismos de referencia empleados.

Después de obtener las imágenes se procedió a analizarlas, empleando el software GenePix Pro. Previamente se construyó una plantilla para poder identificar cada sonda en el arreglo. Dicha plantilla se puede observar en la **Figura 4** y **Figura 5**, en las que aparece en forma de círculos grises sobre el fondo negro. Para cuantificar la señal se emplea la intensidad de pixeles que están dentro del círculo delimitado, restando la señal de fondo o el background. En las **Figuras 4** y **5** se observa con claridad que la señal positiva para las sondas hibridadas se encuentra en tres puntos; cada uno de ellos representa las sondas hibridadas por triplicado.

Tabla 3. Organismos enlistados con los resultados de ambas pruebas. P representa la hibridación positiva, Resistencia los genes de resistencia que no se esperaban y otros serían los genes de virulencia o metabolismo

Nombre	sondas	p	Resistencia	Otros
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3			
<i>Bacillus anthracis</i>	4			
<i>Bacillus subtilis sub spp. Spizizeni</i>	3	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	3	1	2	3
<i>Clostridium difficile</i>	3	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	3	1	0	0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	3	0	0	0
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	3			
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	5	1	0
<i>Enterococcus faecium</i>	5	0	0	0
<i>Escherichia coli MG1655</i>	3	0	0	0
<i>Escherichia coli EHEC</i>	10			
<i>Escherichia coli CFT073</i>	10	6	3	5
<i>Escherichia coli EPEC</i>	10	7	3	1
<i>Klebsiella pneumoniae sub spp. Pneumoniae</i>	3	1	2	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	3	6	5
<i>Pseudomonas aeruginosa Boston 41501</i>	4	0	0	0
<i>Proteus mirabilis Hauser</i>	3	3	4	2
<i>Salmonella spp</i>	3			
<i>Staphylococcus aureus Rosenbach FPR3757</i>	4	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus Rosenbach 328</i>	4	0	0	3
<i>Staphylococcus epidermidis RP62A</i>	4	1	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae ATCC 33400</i>	4	3	1	0
<i>Streptococcus pyogenes Rosenbach T1</i>	3	2	0	0

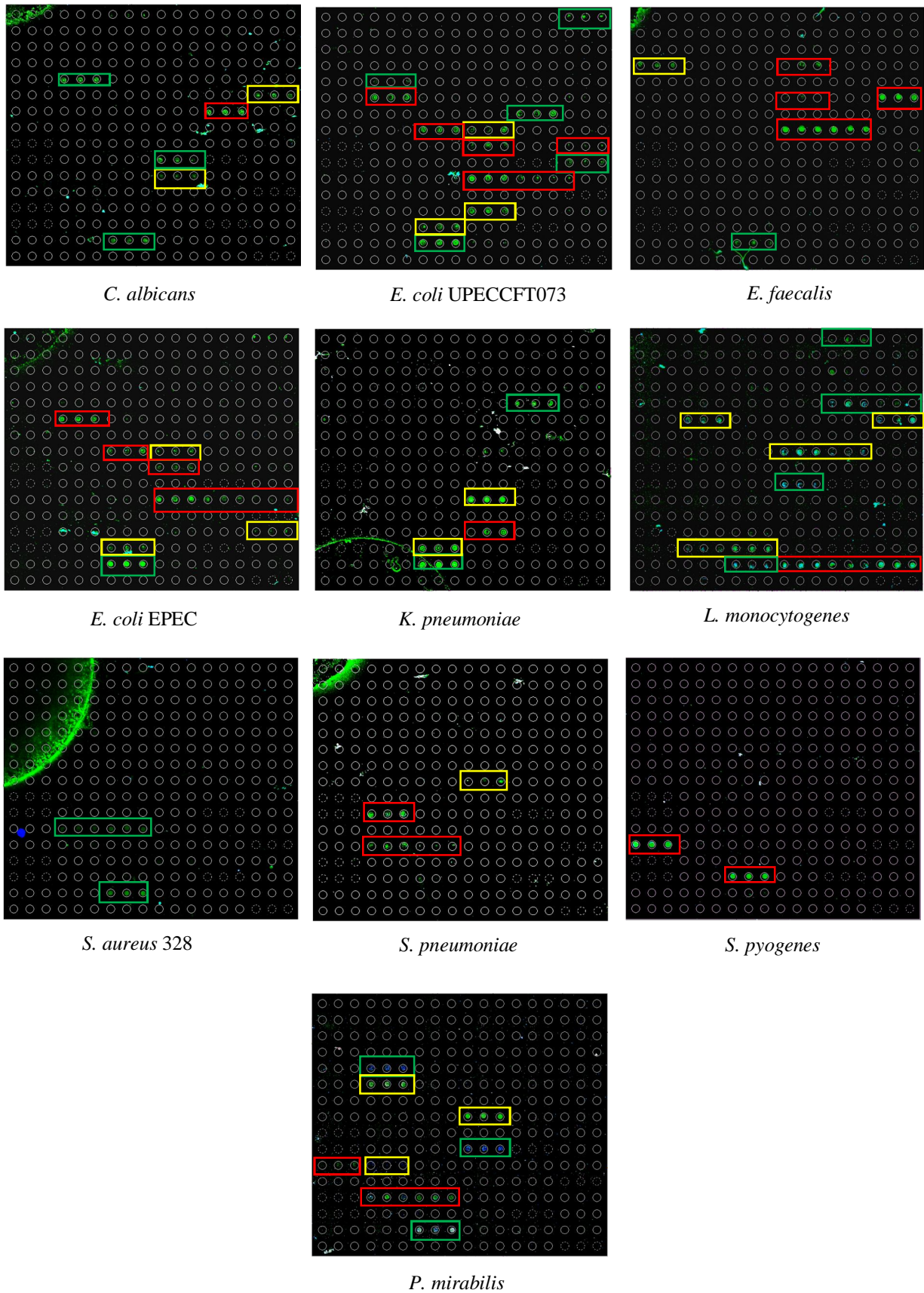


Figura 8. Resultados representativos de la **Figura 2** las sondas resaltadas en rojo son las positivas, las amarillas son las de resistencia que hibridaron a parte de las que estaban contempladas y las verdes genes de virulencia y metabolismo

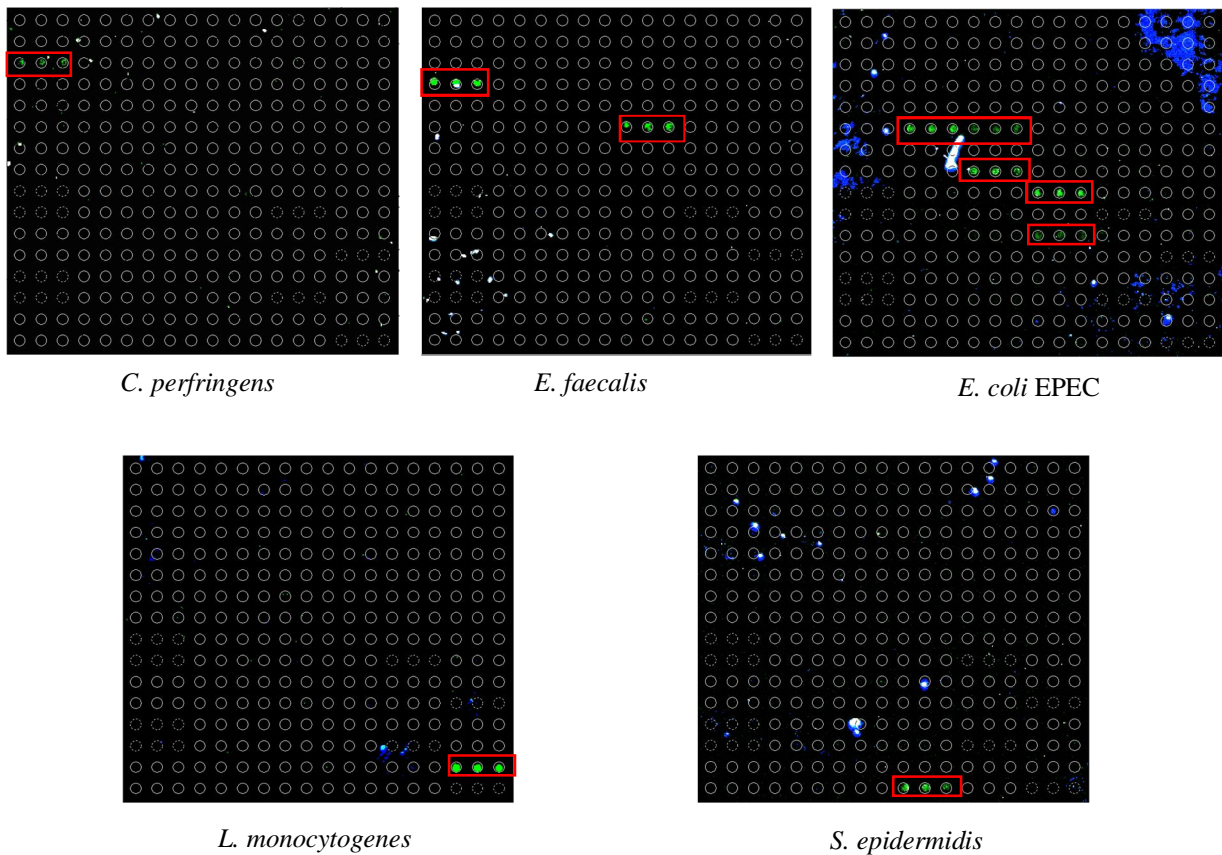


Figura 9. Resultados representativos de la Figura 3 las sondas resaltadas en rojo son las positivas, las amarillas son las de resistencia que hibridaron además de las que estaban contempladas y las verdes genes de virulencia y metabolismo

Discusión

Las enfermedades infecciosas han tenido un gran impacto en la salud pública tanto en nuestro país como a nivel mundial. De acuerdo con datos oficiales de la OMS, en todo momento hay en el mundo más de 1.4 millones de personas gravemente enfermas a consecuencia de estas infecciones. Por otra parte, las Infecciones Nosocomiales que son causadas por agentes infecciosos presentes en las unidades hospitalarias se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad, lo que se traduce no sólo en un incremento en los días de hospitalización, además en los costos de atención como ejemplos: *C. difficile* con

un costo de 580 a 812 dólares y la bacteriemia asociada a catéteres (BAC) con un costo por infección estimado de \$34,508 a \$56,000 dólares. Entre el 5% y el 10% de los pacientes que son ingresados en hospitales en los países desarrollados contraen estas infecciones. En algunos países en desarrollo, el porcentaje de pacientes afectados puede superar el 25%. En México las cifras son sumamente variables, con reportes que van desde 2.1% hasta 15.8% de infecciones hospitalarias. Para combatir estas infecciones uno de los retos principales es conocer cuál es el agente patógeno que se encuentra infectando al paciente; el presente trabajo se inserta en este esfuerzo inicial, conocer los patógenos y los factores de resistencia presentes en individuos infectados.

Con base a los resultados se encontró que en la **Tabla 1** hay una gran variación entre los valores de T_m, %GC y el número de pares de bases de los oligonucleótidos utilizados para identificar a los patógenos de interés en este trabajo; estas variaciones las podemos observar en las **Figuras 2, 3 y 4**. A pesar de la gran variación en estos parámetros para los oligonucleótidos utilizados; se demostró de manera general la utilidad para la detección de patógenos causantes de IN. El ADN humano no fue detectado mostrando que el microarreglo diferenció entre éste y el ADN de las bacterias, lo que muestra su funcionalidad para comparar el ADN de pacientes sanos y los que presentan IN.

Los datos de la **Tabla 2** fueron tomados en cuenta para elegir los DNA utilizados debido a que solo algunos DNA fueron estandarizados para cargarlos en ambas pruebas. La diferencia de temperaturas es uno de los factores más importantes durante la hibridación porque dependiendo de ésta se obtiene una mayor especificidad en este caso fue a 42° C. Las **Figuras 8 y 9** que representan las imágenes obtenidas de ambos arreglos de los patógenos representativos en los que hubo hibridación y en conjunto con las que no lo hicieron se realizó el conteo correspondiente generando una tabla. En la **Tabla 3** encontramos que en general hay menos sondas positivas de las esperadas, este resultado es por la similitud de secuencias entre genes de los diferentes organismos en especial nos podemos referir a la sonda *invA* de *Salmonella* por su hibridación en 7 de los chips, se encontraron genes de resistencia a algunos antibióticos los cuales no se esperaban por lo que se puede decir que en los perfiles de resistencia encontrados resaltan *E. coli* con *tetL* y *oppB*, en *E. faecalis* *StA*, *K*.

pneumoniae con *oppB*, *L. monocytogenes* con *pbpC*, *vanA* y *tetL* y *S. pneumoniae* con *tetL*, todos reportados en PUBMED pero para *P. mirabilis* se hibridaron *glyB*, *vanA*, *tetL* y *armR*, *L. monocytogenes* fueron *vanB*, *mefA* y *oppB*, *K. pneumoniae* con *mdtE*, *E. coli* con *Blact* y *C. albicans* con *pbpC* y *mdtE* estos no han sido reportados o encontrados en PUBMED asociados al DNA de estos organismos. La **Figura 9** no nos dió tantas hibridaciones como la **Figura 8** sin embargo lo que se obtuvo en esta, sirvió para confirmar varias sondas y tomar en *E. coli* las sondas pertenecientes al mismo género nos permitió obtener mejores resultados. Para *E. coli* fue interesante e importante diferenciar entre las 3 cepas usadas según las sondas que hibridaron.

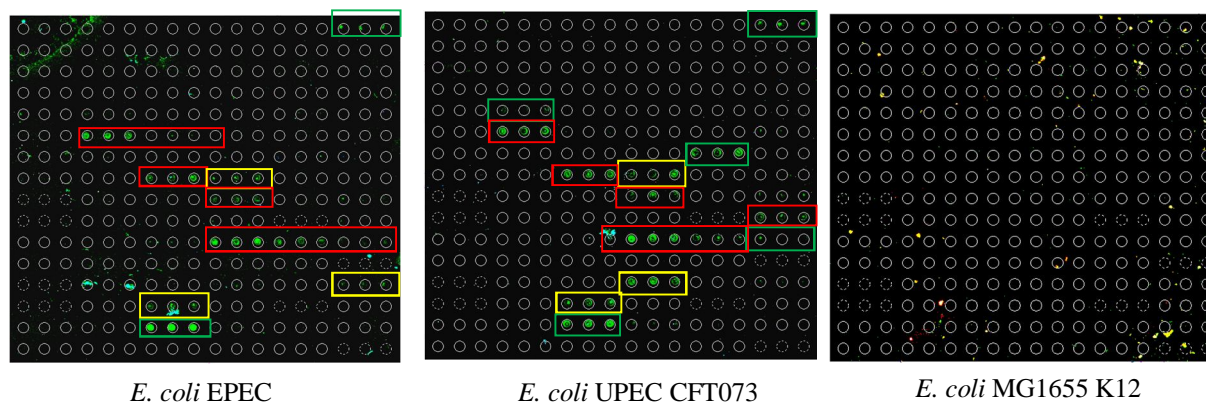


Figura 10. Comparación de las 3 cepas de *E. coli*

Con base en la **Figura 10** se encontró que la *E. coli* EPEC es la más patogénica al tener un gen positivo más que *E. coli* UPEC CFT073 y en el caso de *E. coli* K12 ninguna sonda hibridó lo cual indica que como se sabe no es patogénica, así que era de esperarse ese resultado. Champagne et al. 2011 diseñaron un microarreglo para la detección de genes de resistencia y virulencia en especies de Enterococcus encontrando que en *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. casseliflavus* el gen de resistencia a tetraciclinas es común en los 3. En este trabajo solo se encontró en *E. faecalis* y *E. faecium* aunque no se había contemplado para *E. faecalis*.

Perreten *et al.* 2005 encontró que varios de los perfiles no coincidían con los resultados de otras pruebas, pero también la presencia de genes que no esperaba encontrar en varios organismos como la resistencia a tetraciclinas, en este caso fue igual debido a la presencia del gen *tetL*. De acuerdo con el trabajo de Call *et al.* 2003 la resistencia a tetraciclinas en *E. coli* está comprobada aunque su trabajo sólo se enfoca a la resistencia de estos tratamientos, sin embargo, también da una pauta para reflexionar acerca de los organismos que causan las infecciones nosocomiales teniendo en cuenta que la detección temprana y precisa nos permitirá tratarlas de una manera más efectiva.

Conclusión

Los resultados indican que aunque este diseño presenta valiosas aportaciones para la detección simultánea de patógenos así como de sus perfiles de resistencia a antibióticos, deben hacerse modificaciones en los criterios de selección de genes, del diseño de las sondas, contenido de GC y Tm similares pero lo suficientemente específicas para disminuir la aparición de falsos positivos. Así como se debe estandarizar la metodología de la amplificación y purificación de las muestras de sangre infectadas para obtener el DNA bacteriano presente.

Perspectivas

Dentro de las perspectivas de este trabajo está el rediseño del arreglo considerando los parámetros de tamaño de las sondas, contenido de GC y Tm para evaluar y usar este diseño con muestras clínicas.

Bibliografía

1. Baker RB. 2009. Atlas de enfermedades infecciosas en pediatría. Ed. Médica Panamericana. Pág. 53-54.
2. Call DR, Bakko MK, Krug MJ, Roberts MC. [Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays](#). Antimicrob Agents Chemother. 2003 Oct; 47(10):3290-5. PubMed PMID: 14506043; PubMed Central PMCID: PMC201141.
3. Champagne J, Diarra MS, Rempel H, Topp E, Greer CW, Harel J, Masson L. [Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry](#). Appl Environ Microbiol. 2011 Apr; 77(8):2625-33. doi: 10.1128/AEM.00263-11. Epub 2011 Feb 18. PubMed PMID: 21335389; PubMed Central PMCID: PMC3126350.
4. Cisneros JM, Rodríguez Baño J. 2002. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. Clin Microbiol Infect. 8:687-9.
5. Fredheim EG, Granslo HN, Flægstad T, Figenschau Y, Rohde H, Sadovskaya I, Mollnes TE, Klingenberg C. [Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin activates complement](#). FEMS Immunol Med Microbiol. 2011 Nov; 63(2):269-80. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00854.x. PubMed PMID: 22077230.
6. Geubbels E.L., Nagelkerke N.J., Mintjes-De-Groot A.J., Vandenbroucke-Grauls C.M., Grobbee D.E., De Boer A. S. 2006. Reduced risk of surgical site infections through surveillance in a network. Int J Qual Health Care. 18:127-33.
7. Haley R.W., Culver D.H., White J.W., Morgan W.M., Emori T.G., Munn V.P., et al. 1985. The efficacy of infection surveillance control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. Am J Epidemiol.; 121:182-205.

8. Hancock LE, Gilmore MS Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, eds. 2006. Pathogenicity of enterococci. In: Gram-positive pathogens. Washington DC: ASM Press. Pág. 299–311.
9. Heinzelman Michael, M. D., Ph. D, Scott Melanie, M.R.C.S (Ed.) Lam Tina, M.D. 2002. Factors predisposing to bacterial invasion and infection. American Journal of Surgery: 183(2).
10. Honorato Pérez Jesús. 2005. Enfermedades infecciosas entenderlas, evitarlas y combatirlas. Editorial Everest. España. Pág. 22.
11. Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J. [Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from food](#). Appl Environ Microbiol. 2004 Mar; 70(3):1555-62. PubMed PMID: 15006778; PubMed Central PMCID: PMC368340.
12. Jain R, Danziger LH. 2004. Multidrug-resistant Acinetobacter infections: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother. 38: 1449-59.
13. Kimura K, Itoh Y. [Characterization of poly-gamma-glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of Bacillus subtilis encapsulated with poly-gamma-glutamate](#). Appl Environ Microbiol. 2003 May; 69(5):2491-7. PubMed PMID: 12732513; PubMed Central PMCID: PMC154523.
14. Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol.9:454–460.

15. Li-Kou Zou, Hong-Ning Wang, Bo Zeng, Jin-Niang Li, Xu-Ting Li, An-Yun Zhang, Ying-Shun Zhou, Xin Yang, Chang-Wen Xu, Qing-Qing Xia. 2011. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China NEW MICROBIOLOGICA, 34, 73-80.
16. Lockhart, S. R., M. A. Abramson, S. E. Beekmann, G. Gallagher, S. Riedel, D. J. Diekema, J. P. Quinn, and G. V. Doern. 2007. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. J. Clin. Microbiol. 45:3352–3359.
17. Mah T, Pitts B, Walker G, Stewart P, O’toole G. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature. 426: 306-10.
18. Mandell Gerald L, Bennett John E, Dolin Raphael. 2006. Enfermedades infecciosas principios y práctica. Elsevier. España. Pág. 2485.
19. Markham N, Zuker M. 2005. DNAMelt web server for nucleic acid melting prediction. Nucleic Acids Res, 33: W577-W581.
20. Martínez Álvarez Noelia. 2007. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Tesis Doctorado. España. Universidad de Oviedo Departamento de Biología Funcional Área de Microbiología.
21. Mesalles San Juan E., Reig Valero R. 2008. Infecciones por microorganismos multiresistentes en el paciente crítico. Edika Med. España. Pág. 55-70, 91-99, 103-114, 133-139.

22. Miranda C, Rojo MD. 2004. *Clostridium perfringens*: infecciones de piel y tejidos blandos. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.
23. Miranda Jamilet, Bringas Ricardo. 2008. Análisis de datos de microarreglos de DNA: Antecedentes de la tecnología y diseño experimental. *Biotechnología Aplicada* 2008; 25:82-89.
24. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med.* 2000; 342: 710–721.
25. Navarrete N, Armengol-Sánchez G: Costos secundarios por infecciones nosocomiales en dos unidades pediátricas de cuidados intensivos. *Salud Publica Mex* 1999, 41:51-58.
26. Noskin GA. En: *Acinetobacter*. Contemporary diagnosis and management of antimicrobial-resistant-bacteria. Newton(PA): Handbooks in healthcare; 2006. P. 122-147.
27. O'May A. G., S. M. Jacobsen, M. Longwell, P. Stoodley, H. L. T. Mobley, M. E. Shirtliff. 2009 May. [The high-affinity phosphate transporter Pst in *Proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation.](#) *Microbiology.* 155(Pt 5): 1523–1535. Doi: 10.1099/mic.0.026500-0. PMID: PMC2889415.
28. Pearson M. Melanie, Alejandra Yep, Sara N. Smith, Harry L. T. Mobley. 2011 July. [Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the Murine Urinary Tract: Virulence and Nitrogen Assimilation Gene Expression](#) *Infect Immun.* 79(7): 2619–2631. doi: 10.1128/IAI.05152-11. PMID: PMC3191972.

29. Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehricht R, Kuhnert P, Frey J. [Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria.](#) J Clin Microbiol. 2005 May; 43(5):2291-302. PubMed PMID: 15872258; PubMed Central PMCID: PMC1153730.
30. Prats Pastor Guillermo. 2006. Microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. Pág. 18, 24, 25, 28.
31. Pulido IY, Mantilla JR, Valenzuela ME, *et al.* Distribución de genes codificadores de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de hospitales de Bogotá, D.C., Colombia. Biomédica 2011; 31:15-20.
32. Quinn J. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* infections in the intensive care unit. Semin Respir Crit Care Med. 24:61–68.
33. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli* Salud Pública Mex 2002; 44:464-475.
34. Rodríguez Baño J, Marti S, Ribera A, Fernandez Cuenca F, Dijshoorn L, Nemeč A, *et al.* Nosocomial bacteremia due to an as yet unclassified Acinetobacter genomic species 17-like strain. J Clin Microbiol. 2006; 44: 1587-9.
35. Ruiz-Bolivar Zulema, Poutou-Piñales Raúl Alberto, Carrascal-Camacho Ana Karina. Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. NOVA - Publicación Científica en CIENCIAS BIOMÉDICAS - ISSN: 1794-2470 Vol.6 No. 10 JULIO - DICIEMBRE DE 2008:101-236.
36. Ruza Francisco. 2003. Cuidados intensivos pediátricos. Capitel Editores. Pág. 1610-1612.

37. Salazar-Holguin H, Mireles-Huerta M. 2002. Infecciones Nosocomiales en un hospital de segundo nivel. *Rev Med IMSS*, 40: 43-51.
38. Secretaria de salud. 2011. "Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. Mexico, DF.
39. Solh AA, Akinnusi ME, Wiener-Kronish JP, Lynch SV, Pineda LA and Szarpa K. 2008. Persistent infection with *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator associated pneumonia. *Respir Crit Care Med*. 178:513–519.
40. Varela Gustavo et al. 2007 *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Rev. Méd. Urug.* [online]. Vol.23, n.3 [citado 2012-11-28], pp.153-163.
41. Wang X, Niu C, Sun G, Dong D, Villaruz AE, Li M, Wang D, Wang J, Otto M, Gao Q. [ygs is a novel gene that influences biofilm formation and the general stress response of *Staphylococcus epidermidis*](#). *Infect Immun*. 2011 Mar; 79(3):1007-15. doi: 10.1128/IAI.00916-10. Epub 2010 Dec 20. PubMed PMID: 21173311; PubMed Central PMCID: PMC3067518.
42. Williams E. Mary, Glassman Bruce, Szumski Bonnie, Cothran Helen. 2005. Epidemics opposing viewpoints. Greenhaven press. United States of America. Pág.17
43. Wu KM, Li LH, Yan JJ, Tsao N, Liao TL, Tsai HC, Fung CP, Chen HJ, Liu YM, Wang JT, Fang CT, Chang SC, Shu HY, Liu TT, Chen YT, Shiau YR, Lauderdale TL, Su IJ, Kirby R, Tsai SF. [Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis](#). *J Bacteriol*. 2009 Jul; 191(14):4492-501. doi: 10.1128/JB.00315-09. Epub 2009 May 15. PubMed PMID: 19447910; PubMed Central PMCID: PMC2704730.

44. Zaragoza R, Artero A, Sancho S, Navarro J, Gonzalez R, Nogueira J. 2004. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in an intensive care unit: risk factors and influence on outcome. 44 rd ICAAC. Washington. Abstract K-1558.
45. Zaragoza R, Camarena J, Artero A, Sancho S, Gonzalez R, Navarro JC, Nogueira j. 2006. Influence of genotypic patterns and carbapenem resistance on outcome in *Acinetobacter baumannii* bacteremia (ABB) in an intensive care unit (ICU). Aten years study ICAAC. San Francisco. Abstract K-1504.
46. Zavala Castro Jorge Eduardo. 2005. Manual de técnicas básicas de biología molecular. UADY. Pág. 117-118.