



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

Caracterización molecular de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*
aisladas de pacientes hospitalizados por electroforesis de campos
pulsados (PFGE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ALBERTO REYES CHÁVEZ

ASESORES: DRA. MA. DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA

M.C. GABRIELA DELGADO SAPIEN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX

2010



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Caracterización Molecular de cepas de Pseudomonas aeruginosa
aisladas de pacientes Hospitalizados, por Electroforesis de
Campos Pulsados (PFGE)

que presenta el pasante: Reyes Chávez Alberto
con número de cuenta: 09656568-3 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Noviembre de 2009.

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón

SECRETARIO Dra. Ma. del Rosario Morales Espinosa

PRIMER SUPLENTE Dra. Gabriela Bárcenas Morales

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez

Lo que Ayer creía todo el mundo y lo que cree usted hoy.....

No lo creerán mañana..... más que los más Necios.

SIR. FRANCIS CRICK...

Agradecimientos:

A mis padres:

María de Carmen Chávez Aramis y Tomás Reyes Flores

Por todo el apoyo y confianza brindado a lo largo de toda mi vida.

A TODOS MIS HERMANOS:

Por innumerables muestras de apoyo y cariño,

Por la motivación, crítica y la siempre la oportuna guía.

Por todo... y muchas cosas más que me han permitido cerrar este ciclo.

Agradecimiento:

Al Biólogo José Luís Méndez Sánchez (Pepe)

Y la QFB. Gabriela Delgado S. (Gaby)

Por toda la paciencia, ayuda técnica prestada así como por todos los comentarios, críticas y sugerencias durante toda la parte experimental y escrita del proyecto.

Al Programa de Apoyo Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

Por el financiamiento para la realización del proyecto (IN2068083).

ÍNDICE

Págs.

| | | |
|---------|---------------------------------|-----|
| | Índice general. | i |
| | Abreviaturas | iii |
| | Índice de figuras y tablas | iv |
| 1 | RESUMEN | A |
| 1.1 | Resumen | A |
| 2. | INTRODUCCIÓN | 0 |
| 2.1 | Introducción | 1 |
| 2.1.1. | Características físicas. | 2 |
| 2.1.2. | Características químicas. | 4 |
| 2.1.3. | Factores de virulencia. | 6 |
| 2.1.4. | Lipopolisacárido. | 8 |
| 2.1.5. | Exotoxina A. | 8 |
| 2.1.6 | Exotoxina S. | 9 |
| 2.1.7. | Exotoxina T. | 10 |
| 2.1.8. | Exotoxina U. | 10 |
| 2.1.9. | Hemolisina C. | 10 |
| 2.1.10. | Flagelo. | 12 |
| 2.1.11. | Pili. | 13 |
| 2.1.12. | Elastasa. | 14 |
| 2.1.13. | Rhamnolípidos. | 14 |
| 2.1.14. | Sistema de secreción tipo tres. | 17 |
| 2.1.15. | Alginato. | 19 |
| 2.1.16. | Sensing quórum. | 21 |
| 2.1.17. | β -Lactamasas. | 23 |
| 2.1.18. | Bombas de expulsión. | 25 |
| 2.1.19. | Porinas. | 25 |
| 2.1.20. | Pigmento. | 26 |
| 2.1.21. | Epidemiología. | 27 |
| 2.1.22. | Tratamientos. | 30 |

| ÍNDICE. | Págs. |
|--|-------|
| 2.1.23. Tipificación genética. | 32 |
| 2.1.24. Electroforesis de campos pulsados (PFGE). | 35 |
| 3. JUSTIFICACION. | 36 |
| 3.1. Justificación. | 37 |
| 4. OBJETIVOS. | 38 |
| 4.1. Objetivos. | 39 |
| 5. MATERIAL Y METODOS. | 40 |
| 5.1. Material y métodos. | 41 |
| 6. RESULTADOS | 51 |
| 6.1. Resultados. | 52 |
| 7. DISCUSIÓN. | 57 |
| 7.1. Discusión. | 58 |
| 8. CONCLUSIONES. | 66 |
| 8.1. Conclusiones. | 67 |
| 9.1. Apéndice (Parámetros que afectan la Electroforesis de Campos pulsados). | 69 |
| 9.2. Apéndice (Criterios de interpretación para tipificación molecular de PFGE). | 72 |
| 9.3. Apéndice (Soluciones y reactivos). | 77 |
| 9.4. Apéndice (Equipo de laboratorio). | 82 |
| 9.5. Apéndice (Tamaño de fragmentos de cepas de <i>P. aeruginosa</i>). | 83 |
| 10. Bibliografía | 85 |

Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| Exo A | Exotoxina A. |
| Exo S | Exotoxina S. |
| Exo T | Exotoxina T. |
| Exo U | Exotoxina U. |
| LPS | Lipopolisacarido. |
| TL | Fosfolípido termolábil. |
| Las A | Elastasa A. |
| SSTIII | Sistema de secreción tipo tres. |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa. |
| RAPD | Amplificación de fragmentos polimórficos al azar. |
| MLST | Multilocus sequense typing. |
| PFGE | Pulsed- field gel electrophoresis. |
| IL | Interleucina. |
| TNF | Factor de necrosis tumoral. |
| SQ | Sensing quórum. |
| GTP | Trifosfato de guanosina. |
| ADP | Adenocin difosfoto. |
| Da | Daltons. |
| PMN | Polimorfonucleares. |

| Índice de Figuras y Tablas | Págs. |
|---|--------------|
| Figura 1. Tinción de Gram de <i>P. aeruginosa</i> . | 3 |
| Figura 2. Formación de colonias. | 4 |
| Figura 3. Hemólisis completa en medio agar sangre (β Hemólisis). | 11 |
| Figura 4. Flagelo polar único. | 12 |
| Figura 5. Rhamnolípidos. | 15 |
| Figura 6. Motilidad en medio solido tipo swarming. | 16 |
| Figura 7. Sistema de secreción tipo III (sistema de inyección de proteínas). | 18 |
| Figura 8. Componentes de alginato. | 19 |
| Figura 9. Proceso de formación de biofilm. | 20 |
| Figura 10. Sensing quórum (sistema de control). | 22 |
| Figura 11. Píocianina (colorante con actividad redox). | 26 |
| Figura 12. Diagrama de flujo de técnica de campos pulsados. | 42 |
| Figura 13. Orden de colocación de cepas. | 49 |
| Figura 14. Gel representativo de los perfiles electroforéticos. | 52 |
| Figura 15. Representación de física del gel. | 53 |
| Figura 16. Diagrama de los 19 perfiles <i>P. aeruginosa</i> . | 55 |
| Figura 17. Cámara de electroforesis. | 68 |
| Figura 18. Parámetros para considerar a dos perfiles idénticos. | 72 |
| Figura 19. Criterio para identificar a dos perfiles probablemente relacionados. | 73 |
| Figura 20. Criterio para identificar a dos perfiles posiblemente relacionados. | 74 |
| Figura 21. Criterio para identificar a dos perfiles no relacionados. | 75 |
| Tabla 1. Pruebas bioquímicas de <i>Pseudomonas</i> . | 5 |
| Tabla 2. β -Lactamasas. | 24 |
| Tabla 3. Tratamiento. | 31 |
| Tabla 4. Listado de cepas. | 43 |
| Tabla 5. Criterios de tipificación molecular. | 71 |
| Tabla 6. Criterios de Tipificación Molecular de Tenover & Arbeit. | 76 |

1. Resumen.

P. aeruginosa es un microorganismo genética y fenotípicamente versátil, lo que le permite expresar y reprimir la transcripción de genes clave, dichos genes promueven la variabilidad de fase, la secreción de factores específicos de patogenicidad y esto le permite sobrevivir en soluciones con bajas concentraciones de nutrientes.

P. aeruginosa es un microorganismo Gram-negativo, aerobio, móvil, no fermenta los azúcares, reduce los nitratos a nitritos, es fisiológicamente versátil, está ampliamente distribuido en el suelo, agua, aguas residuales, intestino de mamíferos y en plantas. Este microorganismo puede ser patógeno para el hombre, así como también para otros seres vivos incluyendo plantas, insectos y animales (4, 6-9, 44).

La infección por *P. aeruginosa* está generalmente restringida a pacientes hospitalizados que presentan factores pre disponentes para adquirir la infección por este microorganismo, como lo son la presencia de enfermedades de tipo maligno (cáncer), hematológico (neutropenia), metabólico (diabetes) o que presentan condiciones críticas propiciadas por la instalación de dispositivos como catéteres, sondas, ventiladores(29).

El estudio, identificación y tipificación de las diversas bacterias tanto a nivel local como regional han permitido confirmar la presencia de los agentes infecciosos causantes los brotes epidemiológicos. Pero el surgimiento y resurgimiento de nuevos agentes patógenos más resistentes a los diferentes fármacos han ampliado y permitido el uso de técnicas de tipificación molecular como: ribotyping, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de fragmento polimórficos de DNA del inglés (random amplification of polymorphic DNA RAPD), tipificación de secuencias multilocus (multilocus sequense typing MLST), electroforesis de campos pulsados (pulsed- field gel electrophoresis PFGE)(30-45).

En este trabajo se desarrolló y estandarizó un protocolo de tipificación molecular para campos pulsados para *P. aeruginosa*, permitiendo un gran ahorro en los tiempos así como en los costos de los reactivos utilizados en cada uno de los pasos del procedimiento experimental (amplificación, estandarización de inóculo, lisis, proteólisis y patrones de corrimiento).

El desarrollo de este protocolo permitió la tipificación molecular de 19 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes hospitalizados admitidos en unidad de cuidados intensivos, nefrología, hematología y cirugía del hospital de especialidades del centro médico nacional IMSS, Siglo XXI. Y nos permite observar y concluir que estas cepas presentan una amplia diversidad molecular, ya que al analizarlos de acuerdo con los criterios descritos por Tenover y Albeit no existe una relación epidemiológica entre los perfiles de estas cepas bacterianas. Del mismo modo estos datos nos sugieren observar con mayor cuidado la diversidad en los perfiles y almacenarlos para poder utilizarlos en futuros estudios, con la finalidad de prevenir la generación y proliferación de nuevas clonas con mayor potencial patógeno.

2. INTRODUCCIÓN

2. Introducción.

Son pocas las especies del género de *Pseudomonas* que se consideran importantes en la clínica, como lo son *Pseudomonas aeruginosa*, *P. pseudomallei*, *P. mallei*, *P. maltophilia* (actualmente nombrada *Stenotrophomonas maltophilia*) y *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*). Todas estas especies han sido asociadas con infecciones, como patógenos oportunistas primarios en el huésped inmunocomprometido (1, 2).

P. aeruginosa es un microorganismo Gram-negativo, aerobio, móvil, no fermenta los azúcares, reduce los nitratos a nitritos, es fisiológicamente versátil, está ampliamente distribuido en el suelo, agua, aguas residuales, intestino de mamíferos y en plantas. Este microorganismo puede ser patógeno para el hombre, así como también para otros seres vivos incluyendo plantas insectos y animales (4, 6-9, 44).

En 1850, Sédillot cirujano francés observó la formación de pus de color azul en vendajes de heridas en soldados lesionados. Así como en 1860, el médico Fundas aisló el pigmento piocianina (de color azul). Para el 1862, el médico Lücke con el auxilio del microscopio describió lo que al parecer eran unos pequeños vibrios. Veinte años después en 1882, el médico Gessard describe al microorganismo responsable de la pigmentación de las heridas. En 1900, el médico Migüla le proporciona el nombre *Pseudomonas aeruginosa* cuya etimología de griego y del latín *Pseudos*: falso, *minas*: unidad (falsa unidad) y *aeruginosa*: aeruginus (rubor cobrizos) respectivamente. Con el surgimiento de las diferentes técnicas de tipificación molecular se le ha colocado en el grupo I, de acuerdo con su perfil ribosomal (RNAr) (17).

En el año de 1986, de acuerdo con el Sistema Internacional de Tipificación Antigénica (ISAT) se logra la tipificación de 20 serotipos (33-35).

Para el año 2000 se publica la secuencia completa del genoma de la cepa PAO1 que puede ser consultada en la página (www.pseudomonas.com) el cuál consta de 5.9 megabases (Mb) (32, 42, 85) y está formada por 5570 genes (37).

2.1.1. Característica Físicas.

Gracias a las técnicas genéticas generadas en las últimas tres décadas del siglo XX *P. aeruginosa* se ha podido ubicada dentro del phylum: proteobacteria, en la clase: gammaproteobacteria el cuál es compartido con bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* entre otras y en el orden: pseudomonasdalel y gracias a los avances en la tipificación molecular por el ribotipo (ribotipificación) se le ubica a este microorganismo dentro de la familia: pseudomonasdaceae, en el grupo: fluorecente, el cuál comparte con *P. fluorescenenens*, *P. putida* (6, 9, 16).

- Reino: Bacteria.
- Phylum: Proteobacteria.
- Clase: Gammaproteobacteria.
- Orden: Pseudomonasdalel.
- Familia: *Pseudomonasdaceae*.
- Género: *Pseudomonas*.
- Especie: *aeruginosa*.

Su morfología, es descrita como un bastón recto o ligeramente curvo con una longitud de 1.5-3.0 μm , por 0.5-0.8 μm de ancho, es Gram negativo, no esporulado **Figura I**, obtiene su energía de la oxidación de azúcares, no fermenta la glucosa por lo que se agrupa dentro de los Bacilos Gram Negativos (No Fermentadores de Glucosa), posee un flagelo único polar, crece en un amplio rango de temperatura entre 10 ° C a 42 ° C, con un intervalo óptimo de 30°C a 37 °C (1-19).



Figura 1. *Pseudomonas aeruginosa* Tinción de Gram (Gram negativa) bastón ligeramente curvo 0.5-0.8 μ m a 1.5-3.0 μ m, no esporulado, posee flagelo, crece en temperaturas de 10°C a 42°C.

P. aeruginosa es sensible a la desecación, pero sobrevive en el agua a temperatura ambiente durante varios meses. Sus requerimientos nutricionales son mínimos y es capaz de metabolizar una gran variedad de sustratos orgánicos, lo que la hace capaz de sobrevivir y multiplicarse en ambientes húmedos y líquidos (3).

La infección por *P. aeruginosa* está generalmente restringida a pacientes hospitalizados que presentan factores predisponentes para la colonización de este microorganismo: enfermedades de tipo maligno (cáncer), hematológico (neutropenia), metabólico (diabetes) o que presentan condiciones críticas propiciadas por la instalación de dispositivos (catéteres, sondas, ventiladores, etc.) que rompen las barreras físicas y evade los comprometen la respuesta inmunitaria. En el diagnóstico temprano de las infecciones por este microorganismo parte en la identificación, el aislamiento así como en la determinación de los patrones de susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos, conociendo todos estos factores y la relación epidemiológica entre cepas, se propone la aplicación de la terapia específica que permita generar un pronóstico favorable para el paciente (1-23).

2.1.2. Características Químicas.

P. aeruginosa produce un olor dulzón característico a uvas ó maíz, crece en agar sangre (AS) y MacConkey (MC), produciendo en estos medios colonias grandes de bordes regulares, translúcidas color grisáceas con centro oscuro, la mayoría de las cepas producen un resplandor metálico, algunas colonias son mucoides o lisas por la producción de alginato **Figura 2**, es catalasa positiva y degrada la gelatina **Tabla 1**. Esta bacteria además posee la enzima citocromo oxidasa, produce pigmentos hidrosolubles como la piocianina (color azul) y la pioverdina (fluorescencia de color amarillo verdoso) que fluoresce bajo la luz ultravioleta, su demostración requiere la presencia de magnesio (Mg), hierro (Fe), y otros iones, los medios que inducen la producción de estos pigmentos, son el King B (pioverdina) y King A (piocianina), el Seller y el Agar Mueller-Hilton (3-9,17).



Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa*, sembrada en agar sangre AS produce colonias redondas con bordes regulares, translúcidas de color gris. temperatura optima de crecimiento es de 30-37° C, puede crecer a temperaturas entre 10 a 42° C

Tabla 1. Pruebas bioquímicas básicas para la identificación Para *Pseudomonas* spp (17).

| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>P. alcaligenes</i> | <i>P. chloroaphis</i> | <i>P. citrorii</i> | <i>P. fluorescens</i> |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Catalasa | + | + | + | + | + |
| Oxidasa | + | + | + | + | + |
| No ₃ -No ₂ | + | - | NR | NR | + |
| No. Flagelo | 1 | 1 | >1 | >1 | >1 |
| 4 ° C | NC | N | C | NC | C |
| 41° C | C | C | NC | NC | NC |
| MacConkey | C | C | C | C | C |
| Carbohidratos | | | | | |
| Glucosa | A | - | A | A | A |
| Inositol | - | - | A | A | A |
| Trealosa | - | - | A | - | A |
| Mic. Test. | | | | | |
| Hidrólisis de arginina | + | + | + | - | + |
| Hidrólisis de esculina | - | - | - | - | - |
| Gelatina 22° C | + | V | + | - | + |
| Lisina descarboxilasa | - | - | - | - | - |
| Lecitina | - | - | V | + | + |
| Lipasa | + | - | - | - | - |
| Hidrólisis de almidón | - | - | - | - | - |

C, crece: NC, No crece: NR No resultado; A produce ácido; V variable

2.1.3 Factores de virulencia.

P. aeruginosa es un microorganismo genética y fenotípicamente versátil, lo que le permite expresar y reprimir la transcripción de genes clave, que promueven la variabilidad de fase y la secreción de factores específicos de patogenicidad. Esto le permite sobrevivir tanto en soluciones con bajas concentraciones de nutrientes o en soluciones con concentraciones elevadas de compuestos orgánicos complejos como el petróleo y algunos de sus derivados como la gasolina. Por otro lado esta habilidad de controlar la producción de proteínas, lípidos y carbohidratos complejos se refleja en su alto nivel de colonización y proliferación en insectos, plantas, animales y el hombre (1-23,29).

A nivel hospitalario se ha logrado el aislamiento de diversas cepas bacterianas de *P. aeruginosa* que presentan un amplio rango de similitudes y diferencias fenotípicas (producción de alginato), bioquímicas (resistencia a antimicrobianos) y antigénicas (seroespecificidad) lo que le permite mimetizar su patogenicidad y facilitar la colonización en un reducido número de organismos como la cepa PAO1 o con la capacidad de colonizar y comprometer la salud de grandes poblaciones como la PA14 (31-35, 42).

La patogenicidad de la bacteria es resultado de la presencia de varios factores de virulencia secretados y asociados a su superficie. Los antígenos mejor estudiados en los últimos años, son las proteínas complejas que forman las estructuras asociadas a la superficie, entre las que se encuentran: pili, flagelo, lipopolisacárido, alginato y la producción de un sistema de secreción tipo III (SSTT). Este último que se encarga de introducir directamente proteínas efectoras conocidas como exotoxinas como la Exo U (fosfolipasa) y Exo S (ADP_ribosilasa) al citoplasma de la célula huésped. El sistema de secreción tipo III (SSTT) depende de la interacción con la célula eucariota (tisular) ya que es un mecanismo clave para la invasividad y citotoxicidad, los productos secretados por este sistema incluyen: toxinas de bajo peso molecular como fenazinas, rhamnolípidos, cianida, enzimas ribosilantes de adenocin difosfato (ADP), producción de una elastasa, una exotoxina A, una fosfolipasa y una proteasa alcalina. La gran mayoría de los genes que

codifican para estos factores se encuentran distribuidos a lo largo del cromosoma bacteriano (29,42).

2.1.4 Lipopolisacárido.

Lipopolisacárido (LPS) cubre ampliamente la superficie celular de *P. aeruginosa* y contrario a lo observado en las enterobacterias, está compuesto de tres estructuras químicas diferentes la banda A (α), Corazón o Core y la banda B (β) cada una con especificidad antigénica. La banda A es la endotoxina con una estructura antigénicamente común a todas las cepas de *Pseudomonas*. El Corazón (Core) se encuentra entre ambas bandas y presenta una actividad antigénica muy inferior. La banda B o serotipo β es el antígeno somático específico O, el cuál es termoestable y característico de la especie *pseudomonas*, es el principal componente antigénico y la base para el sistema de seroespecificidad somática (especificidad de grupo O). Éste determinante de antigénico le da a la bacteria capacidad de adherirse a los tejidos epiteliales, le confiere resistencia a la fagocitosis, a la acción de anticuerpos y al sistema del complemento. De acuerdo con el Esquema Internacional de Tipificación Antigénica se distinguen 20 tipos del antígeno "O" (del O:1 al O:20), al mismo tiempo se han hechos estudios donde se confirma la existencia de una asociación entre la banda β y el tipo de infección en pacientes con infección crónica urinaria persistente, en pacientes con neumonía y en particular con pacientes con fibrosis cística (23-26, 28, 52).

2.1.5. Exotoxina A.

La exotoxina A (toxA) es codificada por el gen *tox A*, el cuál es regulado por los genes *regA* y *regB*, su expresión es estimulada por la presencia de bajas concentraciones de metales en el medio. La toxina tiene un peso molecular de 71,500 Daltons (Da) y se compone de dos subunidades (A y B) con sus dominios respectivos. La unidad B tiene un peso de 37,000 Da, presenta los subdominios R y T. El dominio R es el responsable de la unión al receptor de la célula eucariota blanco. Mientras que el dominio T permite la translocación de la unidad A al interior de la célula. La unidad A tiene un peso molecular de 21,000 Da, presenta un sólo dominio denominado C, que es la parte activa de la toxina, con un mecanismo de acción muy similar a la toxina diftérica (9).

La toxina A es letal a bajas concentraciones ($DL_{50} < 0.01$ mg/Kg), esta proteína penetra en la célula blanco por un mecanismo de endocitosis, formando una vesícula con un pH bajo, es considerada el factor de virulencia más importante que actúa por dos vías:

- Disminuyendo el consumo de oxígeno e inactivando a las mitocondrias
- Inactivando el factor de elongación 2 (EF-2), componente esencial para la elongación de cadenas polipeptídicas a nivel ribosomal. Produce destrucción tisular, inhibición de la síntesis proteínas, interrumpe la actividad celular y la respuesta de macrófagos (3, 9, 10).

1.1.6. Exotoxina S.

La exotoxina S (exo S) es una proteína citotóxica y con actividad de ADP-ribosilasa en diversas estructuras intracelulares, como la vimetina del citoesqueleto, en las proteínas (Ras, Rab5, Ra14 y Rap) que se enlazan con el trifosfato de guanosina (GTP) de pequeña proteína G causando la muerte celular, Puede funcionar también como una adhesina que permite la unión de los glicolípidos sobre el epitelio respiratorio, protege a la bacteria contra el ataque de polimorfonucleares (PMN) y macrófagos. Esta proteína citotóxica presenta gran importancia epidemiológica ya que se relaciona en un 40 % de las infecciones en pacientes con quemaduras de tercer grado (9, 48).

1.1.7. Exotoxina T.

La exotoxina T (exo T), es una enzima con actividad Mono-ADP-ribosiltransferasa (mADPRTs) en las proteínas intracelulares CrK I y CrK II, causando inhibición en la reorganización celular del citoesqueleto de actina que está íntimamente relacionada con la patogenicidad de *P. aeruginosa*, ya que inhibe procesos de diferenciación celular, evita la adhesión, la endocitosis, causa apoptosis en las células infectadas y favorece la diseminación bacteriana (56).

1.1.8. Exotoxina U.

La exotoxina U o exo U, potente citotóxica con actividad fosfolipasa A2 que es inyectada a la célula eucarionte a través de un complejo sistema de proteínas denominado sistema de secreción tipo III (SSTT), actúa en la C- Jun NH(2)-terminal por la vía de cinasa, estimula la fosforilación y activación de la cinasa 4 vía nitrógeno cinasas. La C- Jun NH(2) cinasa-terminal y C- Jun estimulan los niveles transcripcionales produciendo marcados daños *in vivo* e *in vitro* en el tejido que lleva a la muerte celular (48, 58)

1.1.9. Hemolisina C.

La hemolisina C o fosfolipasa C, es una enzima con un alto valor diagnóstico en los estudios de gabinete, el sitio activo de la fosfolipasas C es la fosforilcolina (principal componente tenso activo) a nivel de tejido pulmonar. *P. aeruginosa* produce dos tipos de fosfolipasas **Figura 3**. La fosfolipasa termolabil (TL) o fosfolipasa C hemolítica (PLC-H), proteína de gran tamaño de 77 kDa que hidroliza los fosfolípidos de la membrana epitelial para obtener fosfato inorgánico, destruye la membrana citoplasmática e inactiva las opsoninas y la fosfolipasa termoestable

(TE) no hemolítica (PLC-N), es un glucolípido con actividad fosfolipasa, es considerada como un factor no patogénico (7, 9, 58).



Figura 3. Agar Sangre (AS) al 5%, se observa hemólisis completa (la β hemólisis) lisis completad de globo los rojos *P. aeruginosa*

La síntesis de TL y TE son estimuladas en una relación de 8 a 30 por la presencia de carbohidratos y la deficiencia de fosfato inorgánico, en conjunto producen β -hemólisis en el medio agar sangre (AS) (el halo transparente característico). La fosfolipasa C junto con el lipopolisacárido promueven la producción de altos niveles de factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas (IL-1B, IL 6), interferón gamma (IFN γ) en pacientes con fibrosis cística (FQ). A nivel pulmonar interactúa con las proteínas MIP-1 α y MIP-2, contribuyendo con cambios patológicos y generando necrosis en la superficie en el tejido pulmonar (7).

2.1.10. Flagelo.

P. aeruginosa presenta un único flagelo polar, que le permite la migración en forma planctónica (libre) **Figura 4**, es esencial en la infección aguda, comparte la forma estructural de anclaje con la estructura proteínica del sistema de secreción tipo III. El flagelo es un órgano conformado por tres estructuras: el cuerpo basal, segmento de unión “gancho” y el filamento helicoidal.

El cuerpo basal ancla al flagelo con la célula y el “gancho” une al cuerpo basal con el filamento. El filamento está formado de una proteína de alto peso molecular denominada flagelina, proteína compleja responsable de la motilidad rápida y pululante de la bacteria, está implicado en la adherencia y colonización, es considerado un significativo factor de virulencia termolábil. Hay más de 40 genes implicados en la biosíntesis flagelar que son controlados por el regulador FleQ, y con la ayuda del factor sigma (FliA) se induce la expresión de los genes flagelares clase II, III, IV que activan al gen *fli C*, el cuál codifica a la flagelina (58). Se ha observado que al unirse la flagelina con el receptor Toll-like 5 (TLR5) activan NF - κ B induciendo la expresión de mediadores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral, interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL8), óxido nítrico por macrófagos y células epiteliales de las vías respiratorias. La biosíntesis de alginato y flagelo son inversamente regulada por el factor sigma de AlgT (Alg U, σ 22) (48, 58, 61).



Figura 4. *Pseudomonas aeruginosa* presenta un único flagelo polar que le permite la migración en forma planctónica (libre), es esencial para la infección aguda, comparte la forma estructural de anclaje con la estructura proteica del sistema de secreción tipo III.

2.1.11 Pili.

Los pili tipo IV son producidos por un gran número de microorganismo Gram negativos (*Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella bivis*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas ssp.*), se extienden a lo largo de toda la superficie de la célula presentando una estructura constituida del residuo metilado fenil-alanina N-terminal, el cuál media la adherencia a las células epiteliales, por medio de las mucinas (proteínas de elevado peso molecular secretadas por las células calciformes y las glándulas mucosas de las vías respiratoria) permitiendo el enlace con los glucofingolípidos asialo GM₁ y asialo GM₂. El pili tipo IV que sintetiza *P. aeruginosa* está codificados por 21 genes, siendo el más importantes el gen *pilBCD* que codifica para las proteínas PilB, PilC, y Pil D fim. Éstas proteínas se agrupan en una estructura tridimensional que es muy similar a la producida por *N. gonorrhoeae* (58).

El pili tipo IV guarda una relación estructural muy estrecha con el sistema de secreción tipo II, con el cuál comparte 5 de sus 16 componente. Estos componentes forman Pil A, que es una subunidad estructural del pili tipo IV y recibe el nombre de pseudopili. El precursor (pseudopili) posee una unidad N Terminal muy conservada, la cual contiene pequeños y positivos cambios en el péptido líder (fenilalanina) seguido de un alto dominio hidrofóbico de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. El péptido líder es removido durante la exportación de la peptidasa específica prepilin. La peptidasa prepilines cataliza la metilación del residuo N-terminal del péptido líder (fenilalanina) madurando la proteína, permitiendo a la bacteria adherirse al receptor blanco GalNAcβ1-4Gal en la región carboxilo terminal de las células epiteliales (59).

2.1.12. Elastasa.

P. aeruginosa produce dos tipos de elastasas: elastasa alfa α (LasA) y la elastasa beta β (LasB) que actúan concertadamente en los enlaces peptídico de la elastina, la red de colágeno y la fibronectina (28).

La elastasa A actúa cortando a la elastina y favoreciendo la acción de la LasB (que es una zinc metal proteasa de matriz 2 [MMP-2]). A altas concentración estas proteínas degradan los componentes del complemento C1, C3b, la transferrina (liberando el hierro al medio extracelular), generando radicales hidroxilos, inactiva al interferón γ (IFN γ), al factor de necrosis tumoral (TNF), a los anticuerpos IgA, e IgG, la interleucina 2 (IL-2), inhibe la quimiotaxis de leucocitos polimorfo nucleares (PMN), reducen actividad de las células asesinas naturales (NK), inactiva al factor de complemento C1. En las células de la cornea producen queratitis, en pacientes con fibrosis cística degrada la colágena tipo IV para exponer receptores al ataque bacteriano en las mucosas pulmonares interfiriendo con su función (28,51).

2.1.13. Rhamnolípidos.

La estructura molecular de los rhamnolípidos (bio-surfactantes) no fue identificada hasta 1965 y no es que hasta el año de 1990 que son identificados por primera vez en *P. aeruginosa*, estos compuestos químicos están conformados por grupos de mono y di-rhamnosa unidos a ácidos grasos de diferente longitud, principalmente polihidroxicanoatos (PHA), siendo los más conocidos 1-rhamnosil-3-hidroxicanoil-3-hidroxicanoato (mono-rhamnolípido) y 1-rhamnosil-1-rhamnosil-3-Hidroxicanoil-3-hidroxicanoato (dirhamnolípido) **Figura 5**. Estas moléculas con propiedades tensioactivas son capaces de reducir la tensión superficial, favoreciendo la formación de emulsiones, facilitan la solubilidad de sustancias insolubles (alcanos de cadena ramificada), que le permite a *P. aeruginosa* la utilización de carbohidratos complejos (62).

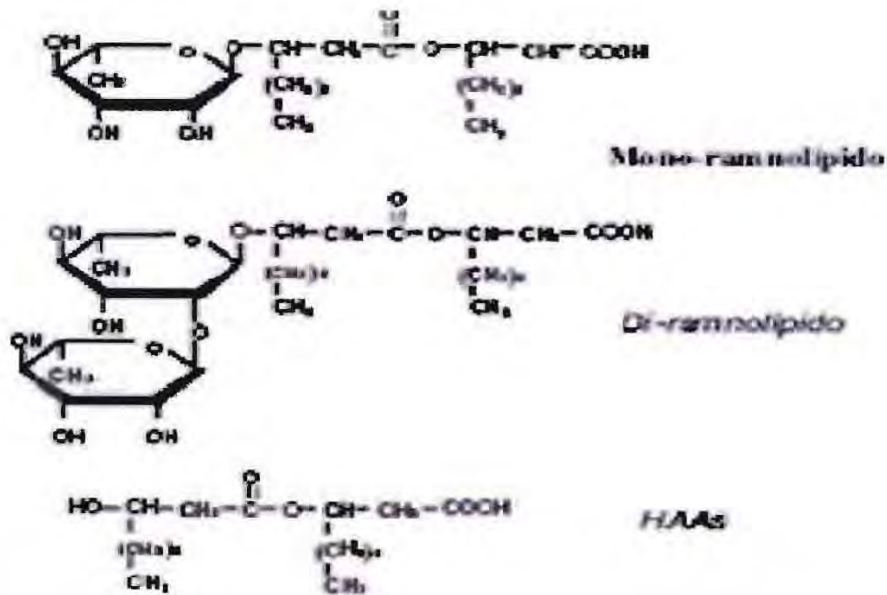


Figura 5. Rhamnolípidos (bio-sulfactantes), estos compuestos químicos conformados por grupos de mono y di-rhamnosa unidos a ácidos grasos de diferente longitud principalmente polihidroxicanoatos (PHA), siendo los más conocidos 1-ranosil-3-hidroxicanoil-3-hidroxicanoato (mono-ramnolípido) y 1- ramosil-1-ramosil-3-Hidroxicanoil-3-hidroxicanoato (diramnolípido)

Los rhamnolípidos se encuentran presentes principalmente en el esputo de pacientes con fibrosis cística (FC). Estas moléculas inactivan a los cilios traqueales, estimulan la secreción de mucina, matan a los macrófagos e inhiben su acción, así como alteran el transporte de iones en las células epiteliales incrementando el riesgo de muerte por infecciones pulmonares. La producción de rhamnolípidos coincide con la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria, que está bajo el control del sistema Quorum Sensor (Sensing Quorum), permitiendo que los genes *rhl A* y *rhl B* sean activados por la N butil-homoserin lactona generando y/o facilitando la activación de enzimas encargadas de la producción de mono-rhamnolípidos y del *rhl C* para los di-rhamnolípidos y del promotor *RhlR*, lo que permite la formación de microcolonias de 20 μm de profundidad *in vitro*. La motilidad tipo swarming presente en los medios semisólidos se debe a la conjugación de los rhamnolípidos que reducen la fricción en la superficie y así como al movimiento flagelar **Figura 6** (62).



Figura 6. Motilidad tipo Swarming, fotografía tomada del artículo Evidence for Two Flagellar and Their Role in the Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. Caiazza Nicky C. Shank Robert M. Q. and O toole G:A (2000)

2.1.14. Sistema de secreción tipo tres.

El sistema de secreción tipo III (SSTT del inglés Type III Secretion System TTSS) es principalmente un complejo sistema de inyección de proteínas (citotoxinas) transmembranales, utilizado por las bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*), juega un papel muy importante en la infección aguda. El SSTT está codificado por más de 40 genes que coordinan la expresión del aparato de secreción, las toxinas y los reguladores. El aparato de secreción en *P. aeruginosa* está conformado por 30 proteínas de las cuales las más estudiadas son C, D, F, J, N, L, Q, R, T, S y V, y que se subdividen en tres secciones el cuerpo basal (D, J, L, N, Q, S, T, U, V) que se encuentra unido a la membrana interna: el sistema de secreción conformado por Ysc C (por *Yersinia* secretor sistema) y el sistema de inyección (aguja) YopB, D **Figura 7**. Las toxinas secretadas por este sistema son Exo S, Exo T, Exo Y y Exo U, por último el activador transcripcional ExsA. El cuál es codificado dentro del operón *exsCEBA*. El gen *ExsD* es codificado por el operón *exsD-pscBL* y cuya actividad es la de represor de *ExsA*. La fijación de *ExsD* a *ExsA* es prevenida por *ExsC* que es codificada por el primer gen del operón *exsCEBA*. Los mecanismos que favorecen la expresión de este sistema de secreción son la asociación de la adenilatociela B (CyaB) de la membrana, Sensing quórum (RhlI / RhlR) y tRNA pseudourin sintetasa, así como las baja concentraciones de Ca⁺ (48, 58-60).

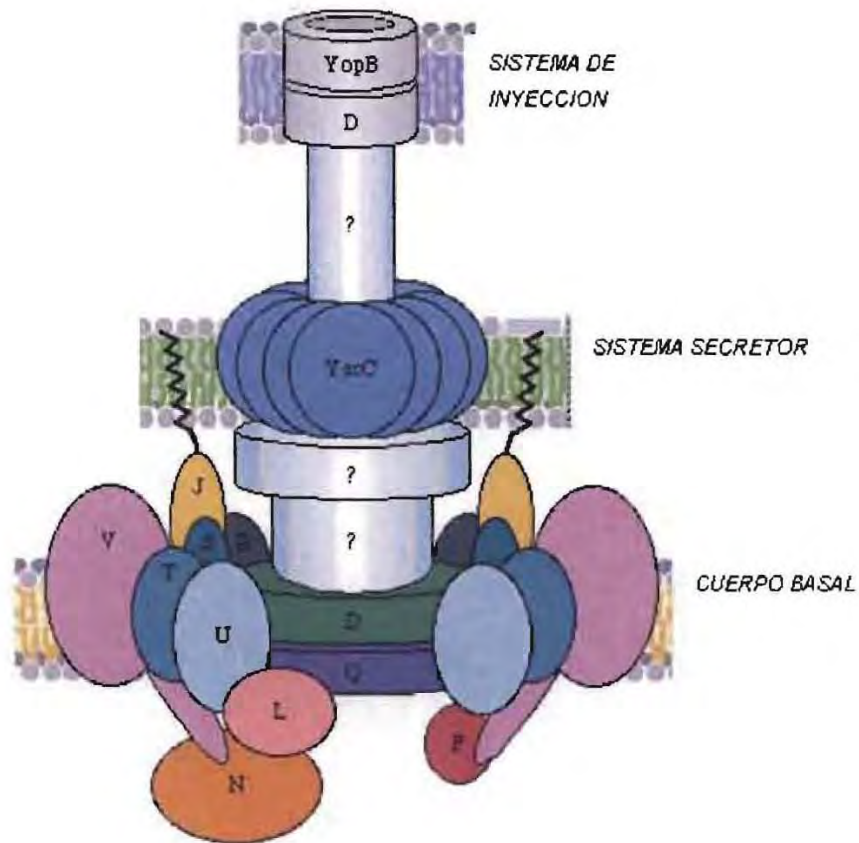


Figura 7. Sistema de Secreción tipo III (SST) en *P. aeruginosa* está constituido por 30 proteínas, de las cuales las más estudiadas son C, D, F, J, N, L, Q, R, T, S, V y U, que se subdividen en tres secciones: el cuerpo basal (D, J, L, N, Q, S, T, U, V) que se encuentra unido a la membrana interna, el sistema de secreción conformado por YscC (por *Yersinia* secretor sistema) y el sistema de inyección (aguja) (YopB, D)

2.1.15. Alginato.

El alginato o biofilm es la estructura de soporte para las microcolonias, está formado por dos tipos de ácidos alginicos, constituidos por unidades monoméricas (ácido acetil-D-manurónico [M], y el ácido-L-gulurónico (G) que se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4)* **Figura 8**. Las señales claves para la síntesis de alginato son las altas concentraciones de iones Na, Cl, Ca y K y un complejo jerárquico que incluye al factor sigma σ^{22} el cuál es un miembro de la superfamilia sigma σ^E extracitoplasmáticos. La activación del factor sigma σ^{22} es modulada por gen *mucABCD*, el cuál es codificado por el operón *algT*. El autorregulador *algT* promueve e induce la activación de cuatro genes *algA*, *algB*, *armZ*, y *alD* que codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis del alginato (33).

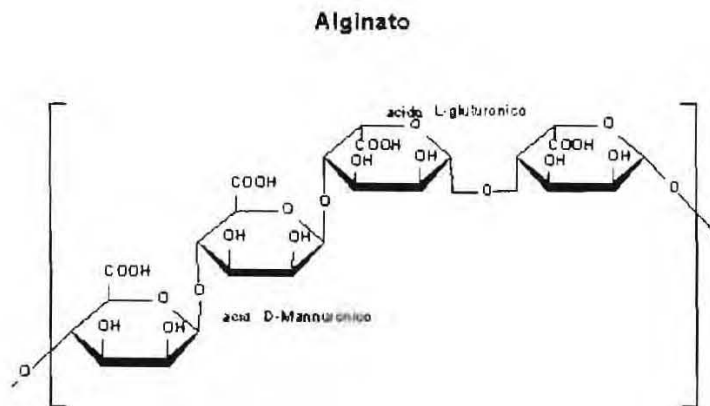


Figura 8. Los alginatos son las sales del ácido alginico, polisacárido lineal constituido por dos unidades monoméricas, el ácido -D-manurónico (M) y el ácido -L-gulurónico (G). Estos se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4)*..

El alginato (limo) forma la matriz de la biopelícula **Figura 9**, la cuál es una estructura de soporte, defensa y de comunicación entre células, presenta canales que le

permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, sirve como un mecanismo de resistencia inmunológico al inhibir la acción de anticuerpos y la quimiotaxis de leucocitos, inactiva el complemento, interfieren con la fagocitosis, reprime el ataque de radicales libres, incrementa la resistencia a los múltiples mecanismos de limpieza del aparato respiratorio (interfiere con los movimientos ciliares) y es una barrera muy importante que amplifica la resistencia a antibióticos como la ampicilina, estreptomina, tetraciclinas, gentamicina y biocidas oxidantes como cloro, yodo y ozono (33,35).

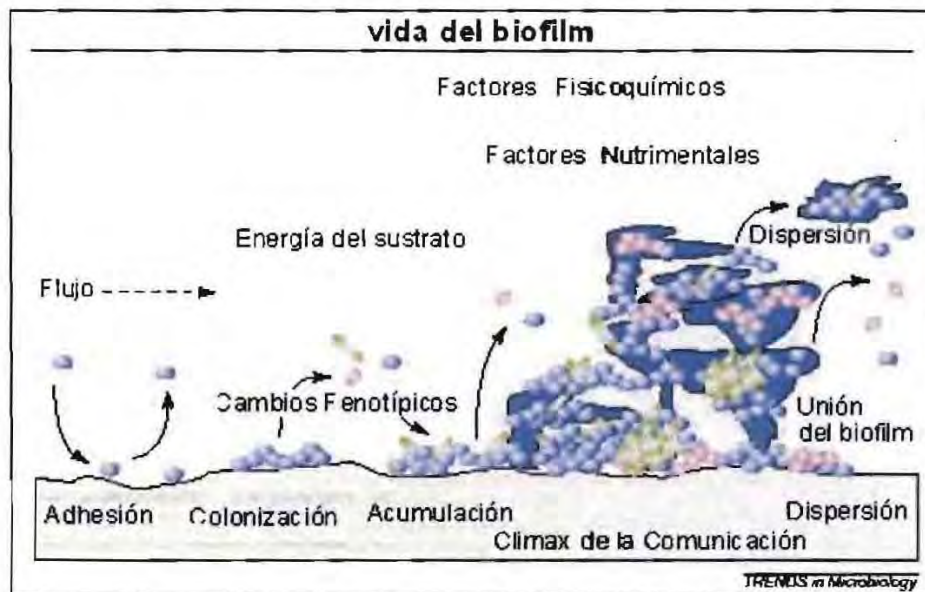


Figura 9. Proceso de formación de Biofilm. Fase 1. La adhesión a la célula epitelial promovida por el pili. Fase 2. La colonización, iniciación de los cambios fenotípicos por la activación del sistema Quórum. Fase 3. Formación completa del biofilm.

2.1.16.Sensing quórum.

El sistema quórum sensor o sensing quórum, es un mecanismo de control de la expresión de genes, basado en la utilización de sustancias difundibles, sintetizadas a bajos niveles por un auto inductor que se distribuye a lo largo del medio y es conocida como (homo-serin- lactona), esta sustancia es identificada por las células cercanas como marcador de la densidad poblacional, dicho auto inductor le permite a *P. aeruginosa* el establecimiento, la proliferación, la diseminación, el cambio fenotípico y/o la liberación de factores de virulencia, dicho aparato de comunicación poblacional utiliza dos sistemas o subsistemas estrechamente vinculados. El primer sistema *las*, el cual consiste de un regulador transcripcional LasR y de una proteína sintetasa LasI. Esta última proteína (LasI) es esencial para la producción de la señal molecular N-(3-Oxo-dodecanil- homoserin lactona) o (3-O-C₁₂-HSL) conocido previamente como PAI-1 que se une a la proteína LasR formando el complejo (LasR/ 3-oxo-C₁₂-HSL), permitiendo la expresión de los genes *lasB*, *lasA*, *toxA*, y da origen a la producción de las proteínas elastasa B, elastasa A, exo A (50)Figura 10.

El segundo sistema formado por el receptor RhIR que requiere la presencia de la sustancia difundible conocida como [N- butiril homoserin lactona ó C₄HSL)] conocida con el nombre de PAI-2, la cuál es sintetizada por RhII permitiendo la formación del complejo (RhIR/ RhII) que da inicio a la activación de *rhlAB* que promueve la síntesis de las enzimas rhamnosiltransferasa requerida para la producción de rhamnolípidos y así como de los pigmento piocianina (50).

2.1.17. β -Lactamasas.

Los principales mecanismos de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* son la producción de β -lactamasas, las cuales se vinculan con la presencia de plásmidos, dichas enzimas hidrolizan el anillo β -lactámico formando derivados acíclicos incapaces de unirse a los sitios diana en la membrana de la célula bacteriana. De acuerdo con la clasificación propuesta por Bush Jacoby Mereires en 1995 *P. aeruginosa* presenta diferentes tipos de β -lactamasas: las SHV-1 y TEM 1-2 son β -lactamasas de clase A y grupo 2b, éstas son capaces de hidrolizar cefalosporinas de primera generación y se encuentran ampliamente distribuidas en cepas aisladas de Francia; las SHV 2-12 y TEM 3 que pertenecen a la clase A y grupo 2be, que hidrolizan a las cefalosporinas de primera a tercera generación y tienen actividad predominantemente en Alemania y Francia; PSE 1-4 perteneciente a la clase A y grupo 2c, con actividad sobre penicilinas; IMP-1 y L-1 CcrA son de clase B y grupo 3, con actividad sobre penicilinas, cefalosporinas de primera a tercera generación y carbapenemes: AmpC, MIR-1, MOX-1 y FOX-1 pertenecen a la clase C y grupo 1, presentan actividad muy marcada sobre cefalosporinas; OXA 1-10 son de la clase D y grupo 2d, que actúan sobre penicilinas y se encuentran ampliamente diseminadas en Francia; OXA 11-21 son de clase D, grupo 2de, inhiben penicilinas, isoxazolpenic, y cefalosporinas, un resumen de estas enzimas de en la **Tabla 2**. Estas β -lactamasas a su vez se subdividen en dos tipo: Amp-C (codificado por la misma bacteria) y las β -lastamasa de espectro extendido (BLEE) que son codificadas por plasmidos, las BLEE más frecuentes son PSE-1, PSE-4 y PER-1 que ofrecen protección contra ceftidima pero son sensible a clavulanato y son identificadas principalmente en Turquía. Las β -lactamasas TEM, SHV y OXA son resistentes a monolactamicos, penicilinas y cefalosporinas, pero son inhibidas por carbapenémicos. Existen mévalo β -lactamasas, como: IMP, SPM, GIM y VIM (en Europa) que hidrolizan las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, Sin embargo, se a observado que cepas aisladas en Japón presentan enzimas que no hidrolizan al aztreonam (29,40).

Tabla 2. β -Lactamasas presentes en *P.aeruginosa*

| TIPO | ENZIMA | HIDROLIZA | PAIS |
|--------------------|---------------------------------|---|--------------------|
| Clase A Grupo 2 | SHV-1 TEM1-2 | Cefalosporinas 1ª generación 2ª generación | Francia |
| Clase A Grupo 2 be | SHV2-12 TEM-3 | Cefalosporinas 1º generación 2º generación 3º generación | Alemania y Francia |
| Clase a Grupo 2c | PSE 1-4 | Penicilinas | Francia |
| Clase B Grupo 3 | IMP-1 L-1Cera | Penicilinas Cefalosporinas. Carbapenemes | Francia |
| Clase C Grupo 1 | AmpC MIR-1 MOX-1 FOX-1 | Cefalosporinas | Francia |
| Clase D Grupo 2d | OXA1-10 | Penicilinas | Francia |
| Clase D Grupo 2 de | OXA11-21 | Penicilinas Cefalosporinas Isoxazolpenic | |

2.1.18. Bombas de expulsión.

Uno de los más complejos sistemas de control que le permite a la célula eliminar a sustancias extrañas son los complejos proteínicos denominados bombas de expulsión que son codificados por múltiple expulsión genes (*mex*), entre los que destacan los sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM. EL complejo proteínico más conocido en *Pseudomonas* es MexAB-OprM que es activado por la presencia ciprofloxacino el cuál es expulsado fuera de la células contra un gradiente de concentración. Este complejo proteínico de expulsión también es activo para otros fármacos como los β -lactámico, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, noboviocina, sulfonaminas, tetraciclinas y trimetropim. La expresión de la proteína MexEF-OprN confiere resistencia a quinolonas, carbapenicos (meropenem e iminopenem). El sistema de expulsión MexAB-OprM contribuye a la resistencia intrínseca a beta-lactámicos (excepto imipenem) (29, 53).

2.1.19. Porinas.

La presencia de una gran variedad de proteínas de membrana le permiten *P. aeruginosa* que controlar el flujo y la permeabilidad de una amplia variedad de sustancias, estas proteínas forman canales (poros) con diámetros que oscila entre los 0.5 a los 2.4 nanómetros (nm). Las sustancias transportadas por estos canales hidrófilicos, gracias a un intercambio pasivo entre el interior y el exterior por el gradiente de concentración dinámico permiten a la célula transportar sustancias pequeñas como los azúcares, pépticos, iones orgánicos y fármacos (β -lactamicos, aminoglucoSIDOS). Las principales proteínas de membrana es la OprF que funcionan como una eficiente ruta de absorción. Sin embargo, una pequeña fracción de estas proteínas (porinas), tiene preferencia por los carbohidratos de Di, Tri y Tetra sacáridos OprB. También *P. aeruginosa* presenta porinas OrpF, específicas para fosfato. La familia de las porinas OrpD presentan una predilección para el ortofosfato, aminoácidos básicos, dipéptidos, piroglutamato lo que le permite ampliar su rango de actividad ante diferentes fármacos (68).

2.1.20. Pigmento.

P. aeruginosa produce piocianina (1-hidroxí-5-metil-fenacina), un pigmento fluorescente de color azul-(azul-verde en agar cetrimida, azul en agar King A), con actividad redox peróxido dismutasa, cuya reacción química produce radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) derivados de la reducción de O_2 en presencia de Fe^{2+} , que es capaz de matar a las células tisulares así como bacterianas.

Este pigmento se encuentra en el esputo de pacientes con fibrosis quística a una concentración $10^{-4}M$, contribuye como factor de virulencia y de colonización al interferir con el sistema mucociliar al frenar la frecuencia de movimiento ciliar y promover la alteración del epitelio respiratorio. También se ha asociado en 90% con la caída o detrimento de AMP cíclico y en un 60% ATP, la producción de este pigmento por parte de la bacteria favorece la producción de proteínas de fase aguda y choque (shock) séptico y en la disminución de IL-1, IL-2, receptor de IL-2 por los linfocitos T, FNT y secreción de anticuerpos (64-67).

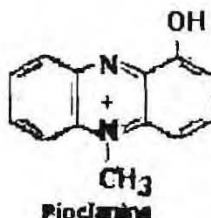


Figura 11. Piocianina (1-hidroxí-5-metil-fenacina), un color azul-(azul-verde en agar cetrimida, azul en agar King A), con actividad redox (peróxido dismutasa) que mata a las células bacterianas por la producción de radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) derivados de la reducción de O_2 en presencia de Fe^{2+} .

2.1.21. Epidemiología.

Las infecciones adquiridas a nivel nosocomio ocurren en su gran mayoría en pacientes que han sido sometidos a procedimientos invasivos previo como: la aplicación de sonda uretral (sonda de Foley), la traqueotomía, la punción lumbar, la aplicación de catéteres intravenosos, la venoclisis, la instalación de ventiladores mecánicos para la respiración asistida y operaciones quirúrgicas, entre otras. Por otro lado los pacientes hospitalizados por periodos prolongados llegan a ser susceptibles a la infección por *Pseudomonas* después de recibir tratamientos con agentes inmunosupresores, corticoides, antimetabolitos, antibióticos, así como radiaciones. Los pacientes hospitalizados pueden adquirir la bacteria por medio de contacto directo con el personal del hospital o por medio de vectores inanimados utilizados en el ambiente hospitalario (3-5).

Existen una gran variedad de fuentes de infección dentro del hospital, las cuales actúan como vectores transitorios en las infecciones por *Pseudomonas* como son: las soluciones que se aplican por venoclisis, las soluciones oftálmicas, las soluciones desinfectantes (cloruro de benzalconio, soluciones fenólicas) y detergentes (hexaclorofeno, dextran) empleadas irónicamente para propiciar zonas asépticas en la piel o en las diferentes superficies del hospital, otros son las crema de manos, las lociones para el cuerpo, los artículos personales del paciente, e instrumentos como las pinzas, termómetros, aspiradores, nebulizadores, incubadoras, ropa de cama, tinas de hidroterapia y fisioterapia (3-15, 18-23).

Por otro lado, los pacientes desarrollan infecciones de origen endógeno, por bacterias presentes en la piel, tracto respiratorio, tracto digestivo o en el tracto genitourinario. En la población general se ha encontrado la presencia de *P. aeruginosa* en el tracto gastrointestinal en una baja proporción que no altera la vida ni la salud de los portadores. Pero a nivel hospitalario, los pacientes portadores se convierten en la mayor fuente de contaminación y de diseminación del agente patógeno produciendo infecciones endógenas. Y del mismo modo son a fuente de contaminación de su ropa de cama, la ropa del personal y del equipo médico (6, 7).

P. aeruginosa es causa de severas diarrea en infantes, de infecciones oculares (endooftalmitis) postquirúrgica de globo ocular e instalación de lentes artificiales contaminados, de infecciones en heridas por quemaduras involucrando tejidos blandos, suele ser un problema recurrente en pacientes con fibrosis quística, es la causa de osteomielitis debido a diseminación hematógena posteriores a traumas y cirugía ortopédica con implante de prótesis; puede producir foliculitis y flebitis asociadas a venoclisis. Considerada con uno de los precursores de la bacteriemia primaria en pacientes neutropénicos y pacientes inmunosuprimidos por el virus VIH con una cuenta de CD4 < 50 cels/mm³, del mismo modo se asociada a endocarditis valvular derecha en usuarios de drogas intravenosas y a endocarditis valvular izquierda asociada a la instalación de prótesis valvulares, favorece las neumonías agudas asociadas a la presencia de ventiladores mecánicos automáticos y en pacientes neutropénicos es causa de meningitis nosocomial, absceso cerebral después de neurocirugía y de fractura de base de cráneo. Y es causa de otitis maligna externa en el paciente diabético (3, 8-11).

Las cepas consideradas como nosocomiales (intra-hospitalarias) en contraste a las cepas adquiridas en la comunidad (silvestres) presentan una alta tasa de resistencia a los antibióticos y frecuentemente son cepas con una gama muy limitada de serotipos. Pero la alta recombinación y el aumento en los tratamientos con nuevos fármacos permiten el incremento en la proliferación de cepas menos sensibles a fármacos de amplio espectro. Para finales de la década de los 80s las fluoroquinolonas tuvieron una actividad excelente contra *P. aeruginosa*, pero el uso extensivo de estos antimicrobianos en particular la ciprofloxacina han originado el aumento en la incidencia de cepas resistentes a este grupo de antibióticos. Nuevos antibióticos de generación más avanzada a las fluoroquinolonas como la sitafloxacina, se han estado utilizando en hospitales de países desarrollados, sin embargo existen reportes de aislados con resistencia alta a este nuevo fármaco. La alta resistencia de *P. aeruginosa* a múltiples antimicrobianos hace que la infección por el microorganismo sea un problema de salud grave que pone en riesgo la vida del paciente y limita seriamente las opciones terapéuticas (12-15).

Las infecciones a nivel intrahospitalario se producen por una serie de factores endógenos como exógenos y representan un importante problema médico, social económico. En los países en vías de desarrollo, así como en países de primer mundo *P. aeruginosa* es responsable del 16% de neumonía nosocomial, del 12% de infecciones de vías urinarias adquiridas en el hospital, del 8% de Infecciones en heridas quirúrgicas y del 10% de bacteriemias. La mortalidad reportada en pacientes con diferentes infecciones asociadas al microorganismo es alta, se ha reportando una mortalidad del 38% en pacientes con neumonía asociada a ventiladores mecánicos, un 60% en pacientes con quemaduras en las unidades de quemados y a un 50% de las muertes en la población con SIDA, en muchos hospitales es la causa de muerte más común en pacientes con fibrosis quística (1-15, 19, 20).

La infección y el desarrollo de enfermedad se inician con la colonización de la bacteria a las células epiteliales. La amplia gama de factores de virulencia hacen que algunas cepas pasen de ser responsables de infecciones localizadas a infecciones sistémicas (1-15).

Las bacterias del genero *Pseudomonas* son responsables de causar: bacteriemias (fiebre, taquicardia, insuficiencia respiratoria) neumonía, meningitis absceso cerebral, infecciones de vías urinarias, infecciones cutáneas, abscesos subcutáneos por traumatismo y administración de medicamentos, infecciones oftálmicas (conjuntivitis, queratitis), infecciones otorrinolaringológicas (otitis externa, otitis media y mastoiditis). infecciones del aparato digestivo así como infecciones en quemaduras de tercer grado, en heridas traumáticas y quirúrgicas (1-20).

Los pacientes con mayor riesgo son los que presentan el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (13), neutropénicos, quemados (graves) principalmente de tercero grado (1-18), con tratamientos prolongados por corticoesteróides, antibióticos, antimetabolitos, anticancerosos (pacientes con leucemia) (2-9) y enfermedades metabólicas como (diabetes mellitus y fibrosis cística) (11-15, 19, 20).

2.1.22. Tratamientos.

La resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a antimicrobianos se ha incrementado en los últimos años por la presencia de metalo- β -lactamasas, alteraciones de la permeabilidad celular (porinas), presencia de plásmidos y la producción de alginato que hacen difícil proporcionar un tratamiento de forma universal. Los datos de National Infection Surveillance (NNIS) sistema de vigilancia de los Estados Unidos CDC determinó en el año 1999, un incremento del 30% en la resistencia al fármaco imipenem, por lo que se recomienda practicar el antibiograma previo a la administración de antibióticos de amplio espectro. Si por el contrario es necesaria la utilización de medicamentos de manera profiláctica, los fármacos que se consideran con buena actividad son las penicilinas antipseudomonales (piperacilinas, ticarcilinas, carbenicilinas y azlocilinas) eficaces en la fase activa de crecimiento (multiplicación). Si el paciente no presenta mejoría es necesario la utilización con inhibidores de Beta-lactamasa como (tazobactam), si el procedimiento anterior no ofrece resultados de mejoría es recomendable la utilización de cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, ceftiazoxima, ceftriaxima) y de cuarta generación (cefepime y cefpiroma) a dosis elevadas para pacientes con un fenotipo mucóide, monobactámicos (aztreonam), carbapenémicos (imipenem y meropenem), quinolonas (ciprofloxacino), aminoglucósidos (amikacina y gentamicina), macrólidos (claritromicina, azitromicina, fluritromicina, roxitromicina, espiramicina, josamicina, nitocamicina, roquitamicina y diritromicina) reducen la producción de exotoxinas y exoenzimas, (Séculi Palacios 2000) exotoxina A, elastasa, proteasa y leucocidina en *P. aeruginosa* y de coagulasa, b-hemolisina, lecitinasa. **Tabla 3** (1-15, 29, 40).

Tabla 3. Tratamiento recomendado para infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*

| | |
|---|---|
| Penicilinas antipseudomonales | Piperacilinas Ticarcilinas Carbenicilinas Azlócilinas |
| Inhibidores de β- lactamasa | Tazobactan |
| Cefalosporinas de Tercera Generación | Ceftazidima Ceftiazoxima Ceftriaxima |
| Cefalosporinas de cuarta generación | Cefepime Cefpirona |
| monobactámicos | Aztreonam |
| Carbapenémicos | Imipenem Meropenem |
| Quinolonas | Ia. Ac.piperimico,ac. Malidixico,cinoxamina IIa.Lomefloxacina,levofloxacinaeno, Ciprofloxacino IIIa. sparp |
| Aminoglucocidos | Amicamicina Gentamicina |
| Macrolidos | Clorotromicina Azitromicina Fluritromicina |

2.1.23. Tipificación Genética.

La caracterización genética de los diferentes microorganismos (moo), ha enfrentados grande y muy complejos retos en la lucha por el desarrollo de técnicas más sencillas y práctica que permitan estudiar con más detalle el funcionamiento, la composición de material genético (DNA), facilitando el análisis de resultados y la comprensión de datos. En las últimas décadas la epidemiología se ha enfrentado al reto de aislar, identificar y caracterizar a *P. aeruginosa*, la cuál es causante de un gran número de enfermedades a nivel local, sistémico. Algunos de los factores que incrementan su virulencia y su peligrosidad en pacientes inmunocomprometidos son los siguientes:

- La resistencia a fármacos por uso indiscriminado, dosis inadecuada, tratamiento incompleto.
- La constante migración de los portadores.
- Factores propios de la constante comunicación entre bacterias Conjugación, Transducción Transformación y las mutaciones

Por lo que, a nivel epidemiológico surgen preguntas:

¿Cómo podemos decir que las muestras de *P. aeruginosa* aislada al mismo tiempo, en la misma zona geográfica, en diferente paciente, aparato, instrumento y/o alimento y que presentan las mismas características fenotípicas y bioquímicas pertenecen a la misma cepa?

¿Son de diferente cepa?

¿Cuál es la relación epidemiológica "clonal" existe entre ellas?

Para responde a éstas y a otras preguntas, la epidemiología ha hecho uso de la técnicas de tipificación molecular Ribotyping, reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

Amplificación de fragmento polimórfico de DNA del inglés (Random amplification of Polymorphic DNA RAPD), tipificación de secuencia multilocus (Multilocus sequence Typing MLST), electroforesis de campos pulsados PFGE (del inglés Pulsed- Field Gel Electrophoresis)(31-40).

La identificación por Ribotipo (Robotyping) de *P. aeruginosa*, se basa en la digestión del ARN ribosomal con la enzima específica de restricción *pvuII* para el operón *rrn*. El cual codifica para las tres clases de ARNr (23-S, 16-S, 5-S) y permite analizar el polimorfismo en los fragmentos de restricción específicos para cada especie y cuya aplicación es ampliamente utilizada en la clasificación taxonómica (75).

Por otro lado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en todas sus variantes, sólo permiten el análisis de una mínima parte de todo el cromosoma bacteriano, siendo muy utilizada en la detección (amplificación) de genes que codifican proteínas específicas, como las Metallo- beta Lactamasas *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* y permite identificar su relación molecular en base a los genes que se buscan. Es un método que utiliza cebadores (iniciadores) de 21-25 pares de bases, es rápida y detecta pequeñas variaciones en el cromosoma (presencia y ausencia), la técnica tiene la desventaja no analizar el cromosoma completo y no es específica para el género (especificidad limitada por el iniciador), por lo que no es utilizada como medio de análisis de dispersión clonal y tiene que ser estandarizada en cada laboratorio tanto en equipo, iniciadores, ciclos y reactivos (74).

Del mismo modo la técnica RAPD ó amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA permite la identificación de cepas, en base a la amplificación de segmentos generados por los iniciadores (44).

De mayor complejidad de planteamiento, desarrollo y análisis es la técnica MLST ó Tipificación por secuenciación de genes, dicho procedimiento se basa en el análisis de siete genes que se encuentran lo más repartidos posible en el cromosoma y que no están flanqueados por genes que codifican proteínas sometidas a presión

selectiva(antígenos). Los mayores inconvenientes de están en la selección, diseño de iniciados para la amplificación y la secuenciación de los genes (44).

2.1.24. Electroforesis de campos pulsados (PFGE).

La tipificación molecular por electroforesis de campos pulsados (PFGE) fue descrita en 1984 por los investigadores Schwartz y Cantor, este procedimiento se basa en la ya conocida y muy estudiada electroforesis, pero con la variante de utilizar pulsos con diferente intensidad, variada duración y con un ángulo 120° (60^- o 60^+) entre pulsos. La conjunción de estos factores permite el proceso de separación de las moléculas de DNA de diferente tamaño entre los poros de la matriz de agarosa. El proceso se inicia al aplicar un pulso con un voltaje determinado, permitiendo la migración de las moléculas dentro de la matriz, esta migración se ve favorecida por el tamaño de las moléculas y la duración del pulso, generando la separación de los fragmentos, en otras palabras la separación de los fragmentos de menor tamaño es más rápida. Esta técnica permite la separación de moléculas de 20kb a 10Mb (30-32).

Por otro lado la tipificación molecular (caracterización) por campos pulsados ó pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), permite la identificación de clonas, sub-clonas y por tanto es considerada como el estándar de oro de la tipificación al ser un método universal de comparación en la macro-restricción del cromosoma bacteriano. Es útil para el seguimiento epidemiológico en la dispersión y proliferación clonal en los diferentes nichos y permite identificar los perfiles (pulso-tipos) fácilmente, dependiendo de la especificidad de la enzima que permite visualizar la presencia o ausencia de bandas y que en muchos casos es preferible la ayuda de analizadores de imagen (32).

3.JUSTIFICACIÓN.

3. Justificación.

En México como en otros países las infecciones intrahospitalarias son un problema grave, generando altos índices de morbilidad y mortalidad, por lo que es necesario identificar y caracterizar a las cepas involucradas en infecciones en el paciente hospitalizado, para poder implementar medidas de control, prevención y tratamiento.

En México son pocos los estudios de tipificación molecular para *P. aeruginosa* y los estudios de caracterización por campos pulsados a nivel hospitalario que permitan dar seguimiento confiable al gran número de agentes infecciosos, con una amplia resistencia a fármacos que generan cuadros clínicos complejos y difíciles de tratar. La bacteria *P. aeruginosa* es uno de los agente patógenos que más se han aislado de pacientes inmunocomprometidos e inmunosuprimidos así como en muy diversas áreas dentro de las instituciones médicas. Por lo que, es necesario el desarrollo y la implementación de técnicas de caracterización bacteriana más completas, que permitan ir más allá de la caracterización fenotípica, para confirmar:

¿Si hay una relación molecular y epidemiológica entre los diversos aislados responsables de brotes infecciosos intrahospitalarios?

¿Son clonas?

¿No hay relación molecular entre las cepas?

En esta tesis se plantea la estandarización de un protocolo para de tipificación molecular, utilizando la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE) y poder caracterizar 19 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de diferentes fuentes clínicas, responsables de infecciones en pacientes ingresados en el hospital de tercer nivel (Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional IMSS. Siglo XXI).

2. OBJETIVOS.

4. Objetivo general.

Estandarizar el método de electroforesis de campos pulsados (PFGE) para la caracterización de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalaria.

Objetivos particulares:

- Cultivo, crecimiento e identificación bioquímica de las cepas de *P. aeruginosa*.
- Establecer un protocolo para la estandarización de la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE) en cepas de *P. aeruginosa*.
- Caracterizar a las cepas de *P. aeruginosa* con base a sus patrones de restricción cromosómica, utilizando la enzima de restricción *Spe I*.

5. MATERIAL Y METODOS.

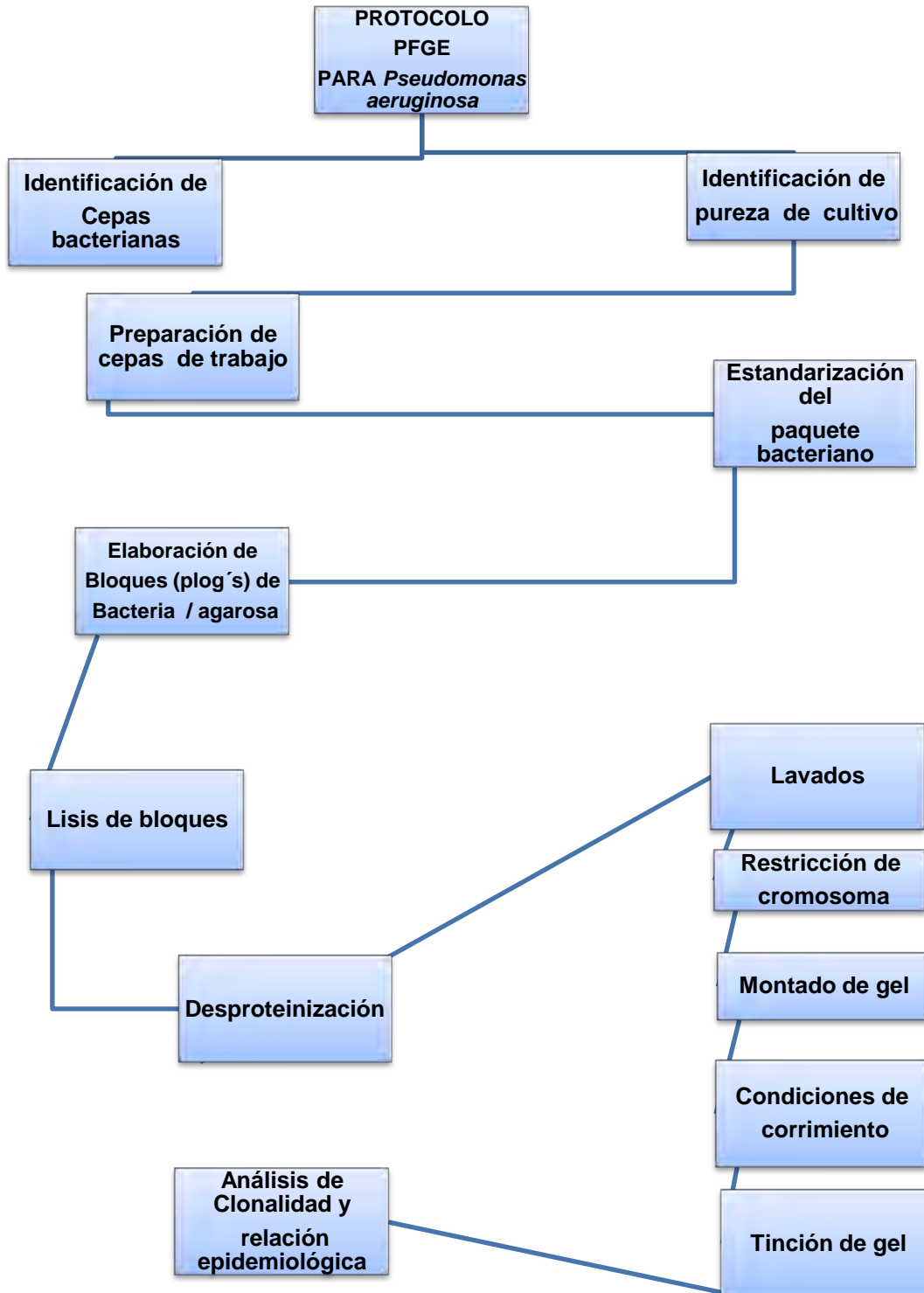
5. Material y métodos.

Se caracterizaron 19 cepas de *P. aeruginosa* procedentes del mismo número de pacientes hospitalizados, admitidos en diferentes servicios (Unidad de Cuidados Intensivos, Nefrología, Hematología y Cirugía) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional IMSS. Siglo XXI. Las cepas fueron aisladas de diferentes muestras clínicas (14 de lavado bronquial, 5 de expectoración) durante un periodo aproximado de un año (2005 a 2006), **Tabla 4**. Cada uno de los aislamientos fue identificado en el laboratorio de microbiología del mismo hospital, con base a estándares y al sistema automatizado (Vitek). Las cepas de *P. aeruginosa* fueron donadas generosamente por el Dr. Luis Casanova y el Dr. Gerardo González Valencia del hospital de especialidades del centro Médico Nacional Siglo XXI. Todas las cepas fueron almacenadas por duplicado en caldo brucella con glicerol al 10% en un ultra- congelador a -70°C , hasta su procesamiento.

Tabla 4. Listado de cepas de *P. aeruginosa* donadas por el Dr. del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional IMSS. Siglo XXI.

| CEPA | ORIGEN DE LA MUESTRA PROCEDENCIA | FECHA |
|-----------------|---|-----------------|
| 1. 2859 | EXPECTORACIÓN | 07-11-05 |
| 2. 2793 | BRONQUIAL | 25-10-05 |
| 3. 2685 | EXPECTORACIÓN | 07-10-05 |
| 4. 2801 | EXPECTORACIÓN | 26-07-05 |
| 5. 2968 | BRONQUIAL | 24-11-05 |
| 6. 2821 | EXPECTORACIÓN | 01-11-05 |
| 7. 2376 | BRONQUIAL | 10-08-05 |
| 8. 2382 | BRONQUIAL | 10-08-05 |
| 9. 2421 | BRONQUIAL | 17-08-05 |
| 10. 2481 | BRONQUIAL | 31-08-05 |
| 11. 2508 | BRONQUIAL | 05-09-05 |
| 12. 2643 | BRONQUIAL | 30-09-05 |
| 13. 2993 | BRONQUIAL | 28-11-05 |
| 14. 1968 | BRONQUIAL | |
| 15. 2045 | BRONQUIAL | 07-12-05 |
| 16. 2844 | BRONQUIAL | 04-11-05 |
| 17. 2662 | EXPECTORACIÓN | 05-10-05 |
| 18. 2744 | BROMQUIAL | 17-10-05 |
| 19. 2869 | EXPECTORACIÓN | 09-11-05 |

Figura 12. Diagrama de flujo
Protocolo de tipificación molecular
para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*



Electroforesis de campos pulsados (PFGE)

Todo protocolo de tipificación molecular para campos pulsados se conforma básicamente por los cuatro pasos siguientes:

1. Preparación del paquete bacteriano.
2. Estandarización de Paquete bacteriano.
3. Elaboración de los bloques (plug's) de agarosa con el paquete bacteriano y restricción del DNA cromosómico.
4. Electroforesis.

1.1 cultivo de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cepas ya perfectamente identificadas, se descongelaron en grupos de diez en diez, introduciendo los viales en hieleras para evitar su brusco descongelamiento, una vez lograda la descongelación se homogenizó el paquete bacteriano con una asa bacteriológica estéril, se tomó una pequeña alícuota que después se depositó en placas de agar Agar Sangre y Agar Mac Conkey previamente marcadas, para ser sembradas por estría de aislamiento. Las placas fueron colocadas en incubación a 37° C por 24 horas, en condiciones de aerobiosis. Al termino de la incubación se observó el crecimiento bacteriano comprobando la presencia del cultivo puro “un solo tipo de colonia” (colonias grandes de bordes regulares, translucidas color grisáceas con centro oscuro, la mayoría de las cepas producen un resplandor metálico, colonias mucoides o lisas por la producción de alginato). Se tomó una sola colonia para hacer frotis y tinción de Gram. Confirmándose la presencia de bacilos Gram negativos, se realizó la prueba de oxidasa (Oxidase For *In vitro* Diagnostic DrySlide™ Disco Laboratorios Detroit Michigan 3530-31) confirmando que se trataba *Pseudomonas aeruginosa* (oxidasa positiva). De la placa de agar sangre se tomó una colonia que se resembró en un vial de gelosa especial, el cual se incubó a 37° C por 15

horas. El crecimiento bacteriano logrado en éste vial, se ocupó como cepa de trabajo y poder realizar con ella los ensayos posteriores.

1.2. Preparación del paquete bacteriano.

Cada una de las cepas de *P. aeruginosa* se trabajó por separado bajo el siguiente protocolo: Se tomó una muestra (utilizando una asa bacteriológica estéril) de la cepa de *P. aeruginosa* conservada en el vial de trabajo (gelosa especial) y se inoculó en 5 ml de medio de caldo Luria contenido en un tubo de tapón de rosca, el cual se incubó en agitación a 250 rpm (8.g) a una temperatura de 37° C por 15-16 horas. Para el estudio de tipificación molecular por campos pulsado se utiliza material genético que pertenezca a la fase de crecimiento logarítmico, por lo que el sembrado y la recolección de bacterias se han de hacer aproximadamente antes de 18 a 20 horas de crecimiento (30-41).

2. Estandarización del Paquete Bacteriano.

Terminado el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 1.5 ml del tubo anterior (tubo que contiene los 5 ml de caldo Luria y la bacteria en crecimiento) y se depositó en un tubo Eppendorf, el cual se centrifugó a 13000 rpm (16,438 g) durante 3 minutos para recuperar el paquete bacteriano (botón/peller), se desechó el sobrenadante y se repitió la operación dos veces más en el mismo vial. Una vez obtenido el paquete de bacterias, éste fue lavado por trabajo mecánico con la micropipeta con 500µl de solución PIV* frío (resuspendiéndolo cuidadosamente en la solución PIV) para nuevamente centrifugarlo por 2 min. Los lavados se repitieron cinco veces, con la finalidad de retirar al máximo las metaloproteínas, DNAsas y residuos del biofilm (alginato) formado durante el crecimiento bacteriano (31,32).

Por último el paquete bacteriano fue ajustado con solución PIV a una densidad óptica de 5 DO ó OD en un espectrofotómetro UV-visible (Tecan GENios con el programa Megella2) a una longitud de onda de 620 nanómetros (nm).

3. Elaboración de bloques de agarosa con el paquete bacteriano y restricción del DNA cromosómico

Se hicieron bloques de agarosa al 1.5%, mezclando en un frasco 0.075g agarosa de bajo punto de fusión tipo Sea plaque BIORAD con 5.0 ml de solución PIV. La mezcla de agarosa y PIV se calentó hasta su ebullición en la flama de un mechero, el frasco con la mezcla hervida fue depositado en un baño metabólico (baño María) a 50°C de temperatura para conservar la agarosa sin fusionar y poderla utilizar en la construcción de los bloques. Por otro lado, se tomó una alícuota de 200 µl del paquete bacteriano estandarizado (5 D O a 620 nm de longitud de onda) y se depositó en un tubo Eppendorf nuevo (debidamente marcado con el número de cepa que se estaba trabajando) este tubo se colocó en el baño metabólico a 50°C durante 10 minutos, (este paso es muy importante ya que si las dos muestras [agarosa y paquete bacteriano], no se encuentran a la misma temperatura, no habrá una correcta homogenización entre ambas). Por último se mezclan en un tubo eppendorf 200 µl de agarosa y 200 µl del paquete bacteriano (teniendo cuidado de homogenizar perfectamente) y la mezcla se deposita inmediatamente en moldes para bloques (BIO-RAD), permitiendo su solidificación. Los bloques agarosa-bacteria son colocados en refrigeración por 10 minutos para lograr una perfecta solidez. Este paso permite encapsular el material genético, sin provocar fracturas y alteraciones que pudieran generar errores por la manipulación (30-40).

La lisis de los bloques

Los bloques de agarosa (aproximadamente 4) fueron colocados en un tubo Falcon con 5 ml de solución de lisis EC-Lisis, e incubados en baño María a 37° C por 3 hrs. Nuevamente se cambia la solución de lisis EC-Lisis prolongando el tiempo de incubación a 12 hrs para limitar el efecto malla que el alginato produce, ya que éste altera la actividad tanto de las enzimas, como de los detergentes (32).

Desproteinización.

Concluido el periodo de incubación de la lisis (con ayuda de guantes y gasas estériles) se desechó la solución de lisis por decantación, y se agregó al tubo con los bloques 5 ml de la solución desproteinizante ES-PK, donde la concentración final de proteinasa K es de 0.001mg/ml. Los bloques con la solución se incubaron a 50°C durante la noche (12 hrs) en baño María (36).

Al día siguiente se desechó la solución desproteinizante y se sustituyó por una nueva (para asegurar la total desproteinización de los bloques).

Lavados.

Con ayuda de guantes y de gasas estériles se decantó la solución anterior (desproteinización) y se agregó 25mL de solución buffer TE (Tris 0.01M, EDTA 0.001M). Los tubos fueron colocados en posición horizontal, en un agitador angular, dentro del cuarto frío (a 6° C) durante 1 hora. El cambio de buffer TE se realizó por lo menos ocho veces, lo que permitió la eliminación de restos celulares y de proteinasa K, minimizando y eliminando la aparición de sombras en el perfil (30-42).

Restricción del cromosoma bacteriano.

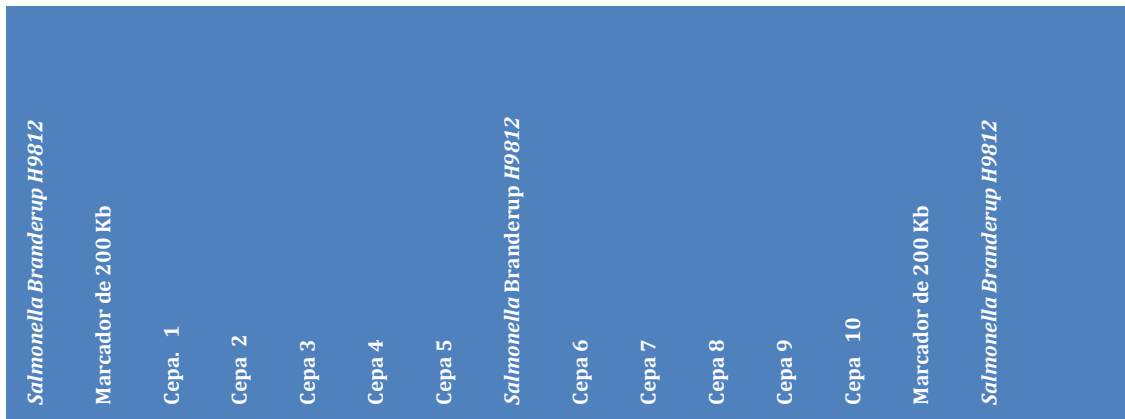
Cada bloque fue cortado horizontalmente por la mitad y se colocó en un tubo Eppendorf donde se agregó la mezcla de restricción: 10 unidades de enzima *Spe I*, 10µl de buffer de la enzima 10X, y 89µl de agua para PCR (agua destilada libre de RNAsas, DNAsas, GIBCO invitrogen), los tubos con el mezcla de restricción fueron incubados en baño María a 37° C por 18 horas. Se utilizó una segunda cepa bacteriana *Salmonella* Branderup *H9812* (estándar global Pulse Net) como marcador interno, ésta cepa fue cortada con la enzima *Xba I* (5'-T/CTAGA-3') que genera 18 bandas con un tamaño de (20.5 Kb

a 1135 Kb) y sirvió de parámetro para establecer el tiempo y los pulsos a utilizar en el protocolo. La enzima *Spe I* (una enzima de corte poco frecuente ya que reconoce secuencias específicas [5' A/CTAGT -3'] corta el cromosoma de *P. aeruginosa* en 37 sitios, generando 38 fragmento cromosomales de aproximadamente 4.909Kb a 539.862Kb) (<http://insilico.ehu.es/digest/index3>.) (72).

Montado del Gel.

Se preparó un gel de agarosa al 1.0% (agarosa especial para corrimiento en Electroforesis de Campos Pulsados), los bloques (agarosa-cromosoma bacteriano) se colocaron siguiendo el orden, primer: pozo uno Marcador de 200 Kb M₁ (Pulse Marker™ 0.1-200 Kb P No. D2291 SIGMA); segundo pozo: ***Salmonella Branderup H9812*** marcador M₂; tercer a séptimo pozo cepas de ***Pseudomonas aeruginosa***; octavo pozo: Marcador M₂ ***Salmonella Branderup H9812***; noveno a treceavo pozo: cinco cepas de ***Pseudomonas aeruginosa***; catorceavo pozo: maracador M₂ ***Salmonella B. H9812*** y último pozo: marcador M₁ (0.1-200 Kb) **Figura 13**. Una vez colocadas las cepas, así como los marcadores, se procedió a retirar el exceso de buffer que pudieran tener con un papel filtro (ya que el exceso de humedad genera burbujas entre los perfiles y facilita la aparición de fantasmas) y se procede a sellar los pozos cubriéndolos con agarosa.

Figura 13 .Orden de colocación de cepas de *P. aeruginosa* para corrimiento de campos pulsados (PFGE)



4. Electroforesis.

Condiciones de corrimiento

Tiempo de corrida: 17 Hrs.

Temperatura: 10 ° C

Gradiente de Voltaje: 6.0 Volts

Sw. Inicial: 2.16 seg.

Sw. Final: 54.17 seg.

Ángulo: 120°

El Tiempo de electroforesis está determinado por el índice de migración de las moléculas de DNA. Dentro de la investigación, este parámetro se ve afectado por el tiempo de switch, duración del pulso y el ángulo de pulso (cada uno de los parámetros se explica en el apéndice I (71).

Tinción de los geles.

La tinción del gel se llevó a cabo con 30 μ L bromuro de etidio (concentración de 1.0 mg /ml) en 300mL de agua desionizada. El gel se colocó en un agitador angular (platform. Vari Mix) por 10 minutos, terminado el tiempo de tinción las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz “UV-visible” y revisar la saturación de bandas. El gel es envuelto para su almacenamiento en papel aluminio con 20 ml de buffer TBE (para eliminar el exceso de bromuro y prevenir la deshidratación). Al día siguiente el gel es fotografiado en un fotodyne (Incorporated) y la fotografía se escanea. El análisis del tamaño y número de las bandas es hecho con el programa *Bio Imagen whole Band Analyzer B.I Systems Corporation*(Tenover& Albeit) (71).

6. RESULTADOS

6.Resultados:

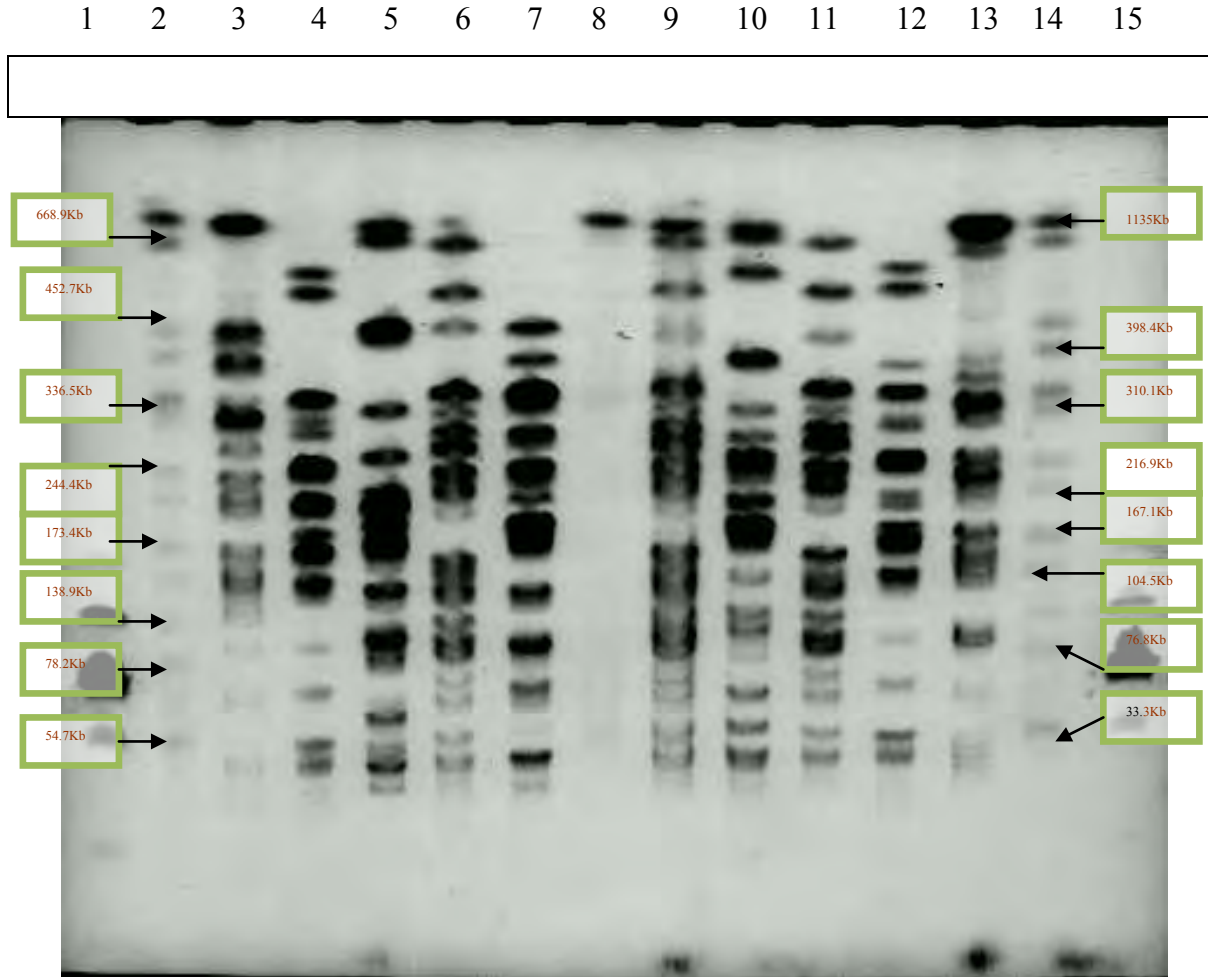


Figura 14. Gel representativo de los perfiles electroforéticos obtenidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, donde el pozo 1 y 15 corresponden al Marcador de tamaño molecular 200 Kb, los pozo 2, 8 y 14 son los perfiles obtenidos por *Salmonella Branderup H9812*, los pozo 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 son cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Condiciones de corrimiento de: *Tiempo de corrida:* 17 Hrs. *Temperatura:* 10 ° C *Gradiente de Voltaje:* 6.0 Volts.(voltaje de corrida) *Sw. Inicial:* 2.16 seg.) *Sw. Final:* 54.17 seg., *Ángulo:* 120°

La fotografía del gel **Figura 14**, muestra las primeras diez cepas de *P aeruginosa*, dicha fotografía fue tomada en un fotodyne que utiliza película polaroid y con un tiempo de exposición seis segundos. Como puede observarse en la imagen, el gel está sobre teñido para hacer más visibles las bandas pequeñas y poder observar con mayor detenimiento las bandas y del mismo modo poder descartar con mayor facilidad las sombras dentro del

perfil. Como puede observarse hay una buena separación entre bandas, lo que confirma que en nuestra estandarización los parámetros de corrimiento son buenos y pueden ser utilizados en los siguientes procesos de tipificación.

De manera regular en cada uno de los geles se realizan inspecciones visuales de los perfiles, para vislumbrar la separación entre bandas y poder diferenciar entre las bandas pequeñas de las sombras generadas por el exceso de bromuro de etidio.

Representación de física del gel de PFGE de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

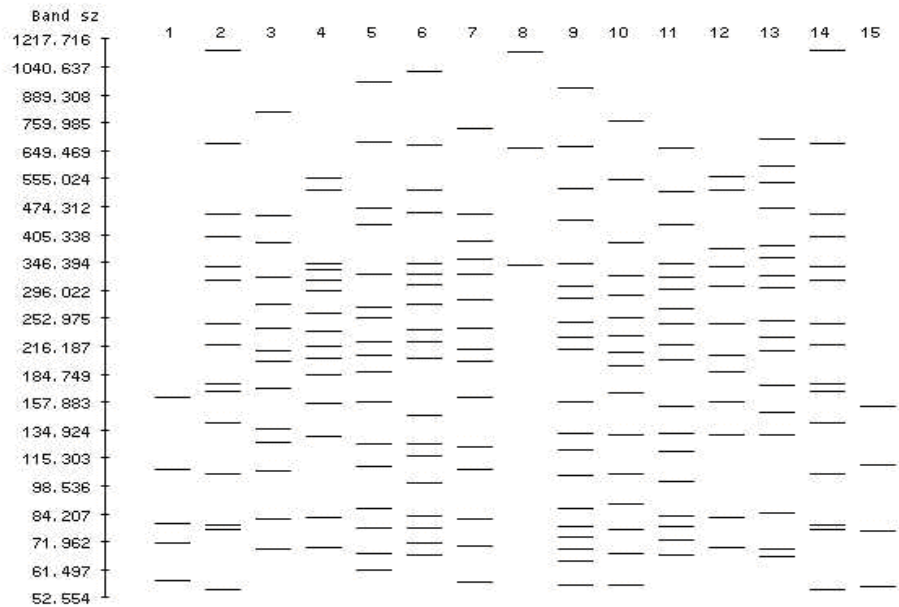


Figura 15. Representación esquemática de los perfiles electroforéticos (PFGE) de las cepas de *P. aeruginosa* presentes en la **Figura #14**. (Programa BIO IMAGEN). Los carriles 2, 8 y 14 representan la escalera del marcador genético obtenido por la restricción de *Salmonella Branderup H9812*, con la enzima XbaI. Del carril 3 al 7 y del 9 al 13 *P. aeruginosa*

Apoyado en el análisis visual de los geles y con la utilización de programa de análisis de imagen (bio image), se generó un mapa de perfiles de corrimiento, que facilita la observación completa de las bandas que forman el perfil de electroforesis de campos pulsados de las cepas de *P aeruginosa*. La imagen generada por el programa permite visualizar de forma rápida, sencilla las bandas que conforma al perfil y favorece la eliminación de forma precisa de las sombras producidas por el exceso bromuro y la sobre exposición del gel al FotoDyne.

Un análisis visual de los diez perfiles generados por el programa bio imagen muestra que algunos de los pulso-tipos presentan similitudes en un reducido número de bandas, lo que permite asegurar que hay una relación entre las cepas. Pero al comparar todas las bandas de un perfil (perfil patrón) con todas y cada una de las bandas de los demás pulsotipos (perfiles) y utilizando los criterios descritos por Tenover y Albeit (**apéndice 2**). Se comprobó, que hay un gran número de diferencias entre los pulsotipos, lo que permite asegurar que no hay la posibilidad de que estas cepas posean una relación y por tanto deben ser consideradas como diferentes.

DIAGRAMA DE 19 PERFILES
pulsotipos *Pseudomonas aeruginosa*

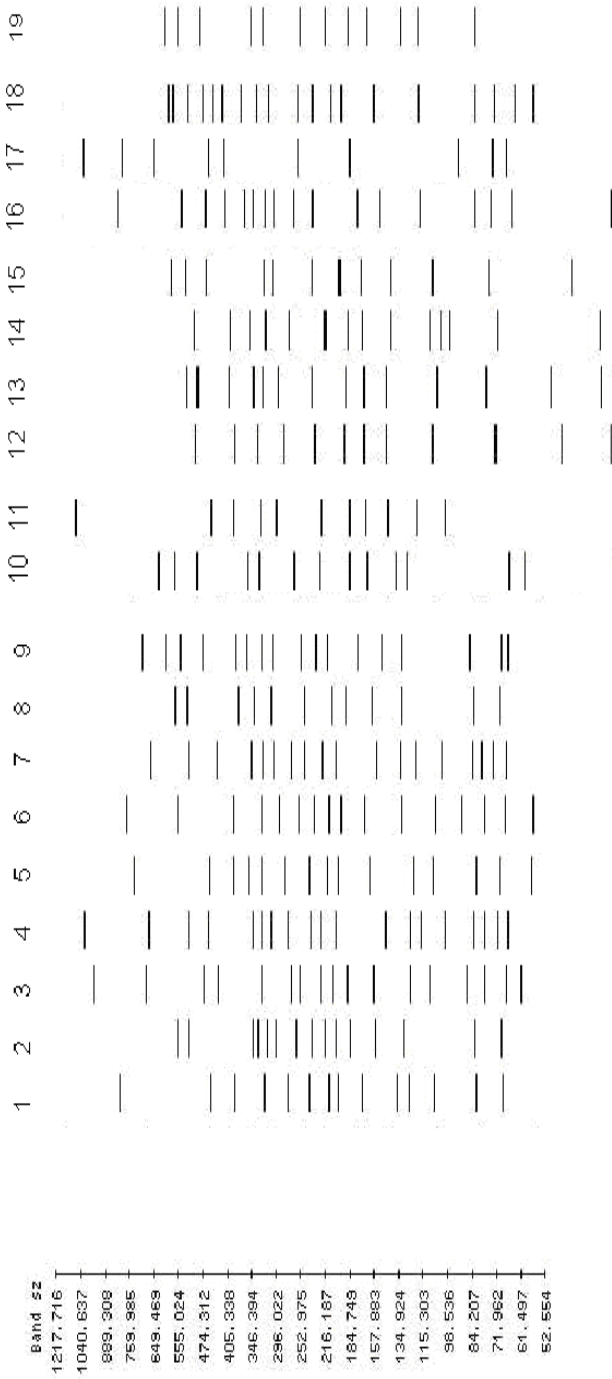


Figura 16. Representa los perfiles electroforéticos obtenidos por las 19 cepas de *P. aeruginosa*. De acuerdo con los criterios de Tenover y Albeit. No hay una relación clonal entre las diferentes cepas, por lo que se consideran como no relacionadas epidemiológicamente, y solo guarda muy pequeñas similitudes en cuanto a la especie

El mapa representativo de las 19 cepas de *P. aeruginosa* generado por el programa bio imagen (**figura 16**) facilita el análisis visual de todos los perfiles, así como de todas las bandas existentes en los mismos. Al realizar un análisis preliminar, se observó que todos los pulsotipos presentan más de siete diferencias entre ellos y de acuerdo con los criterios de los investigadores Tanover y Albeit estos perfiles son diferentes y no son parte de un brote. Del mismo modo confirma que no hay una relación entre pacientes y entre las unidades médicas de la institución.

7.DISCUCIÓN

7. Discusión.

En México los estudios de identificación y caracterización solo permiten identificar de forma muy limitada a las diferentes bacterias, lo que en principio puede ser una limitante, para nosotros abre la posibilidad de que este trabajo pueda aportar un poco al conocimiento y facilite el procesamiento de cepas de *P. aeruginosa* para los estudios de caracterización molecular. El procedimiento de tipificación molecular por campos pulsados por lo general consta de varias etapas como son: El crecimiento, estandarización de inóculo, inmovilización del material genético, proteólisis, restricción, condiciones de corrimiento y por último análisis. Estas etapas pueden ir aumentando en duración y costo, dependiendo de las características fisiológicas, de los requerimientos nutrimentales, crecimiento, la producción y la secreción de sustancias extracelulares propias de cada microorganismo (32).

La estandarización de este protocolo fue realizada con el fin de general una guía que permita aplicar el método de caracterización molecular con la enzima *Spe I* en las 19 cepas de *P. aeruginosa* recolectadas en diferentes servicios (Unidad de Cuidados Intensivos, Nefrología, Hematología y Cirugía) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional IMSS. Siglo XXI. En esta técnica de tipificación molecular se propuso tener especial cuidado con las diferentes variables que alteran los resultados, una de las más importantes, la producción de alginato. La cuál es una sustancia producida en abundancia por el microorganismo al grado de permitirle ampliar su crecimiento y funcionalidad en las más diversas condiciones ambientales, ya que funciona tanto como mecanismo de soporte, de comunicación y defensa. La represión y eliminación de este complejo polisacárido son el punto de partida y la piedra angular que cimienta el procedimiento experimental y la estandarización del protocolo. Dado que la producción de alginato altera tanto el crecimiento, la manipulación, la cuantificación, la actividad de los reactivos, y debe tenerse siempre en consideración en cada uno de los pasos de esta técnica.

En los primeros ensayos experimentales se complicó la manipulación de la bacteria por la alta producción de alginato y la gran cantidad de microcolonias formadas. Por lo que cada uno de los pasos de la estandarización se enfocaron en disminuir su proliferación, evitar la actividad y procurar la eliminación de éste polisacárido.

Crecimiento.

P. aeruginosa presenta un periodo de crecimiento de 18 a 24 horas a 200 rpm (7 gravedades) y que algunos investigadores Römling and Janel (30-32, 46) lo han utilizado. Nosotros hemos sugerido un periodo por 15-18 hrs, a 250 rpm (8 gravedades) en una temperatura de 37° C (30-42), con el objetivo de limitar la formación de microcolonias, las cuales, como ya se mencionó, limitan la manipulación, la acción de los reactivos y alargan los tiempos de procesamiento. Como no es posible controlar o suprimir en su totalidad la producción de alginato sin aumentar los gastos en los medios, reactivos y en el equipo. Nosotros sugerimos no trabajar a menos de 200 y mucho menos a 150 rpm ya que las microcolonias que se forman entre 120-140 son intensas, difíciles de eliminar y no proporcionan suficientes células bacterianas libres (30-32).

Fragmentación de microcolonias

Aun bajo estas condiciones de trabajo se observó, una mínima presencia de microcolonias envueltas en alginato, las cuales era indispensable fragmentar. Para romper y remover la mayor cantidad de alginato se utilizó un lavado mecánico con pipeta y la solución PIV fría muy similar a la utilizada por Delgado Sapién para *E. coli* (2000) pero con la variante de tener 0.25 M EDTA pH = 8.0. Esta pequeña variación permite eliminar, disminuir y contrarrestar la actividad de las enzimas liberadas durante el proceso (de lavado, eliminación de alginato, rompimiento de microcolonias) de manipulación mecánica. Al final de este paso, sugerimos centrifugar por un intervalo de 2 a 3 segundos, con la

finalidad de separar y eliminar en un pequeño paquete (botón o pellet) las microcolonias pequeñas que no pudieron ser fragmentadas y evitar de este modo la generación de errores al momento del moldear de los bloques de agarosa (plug's) y poder trabajar "solo las células planctónicas."

Estandarización.

En la estandarización del paquete se revisaron y analizaron una gran variedad de concentraciones bacterianas de las cuales las más utilizadas en protocolo comerciales (BIO-RAD) son concentraciones de 5×10^8 , 7×10^8 cel/ml, mientras que las concentraciones utilizadas por Spencker y Haupt (2000) es de 1×10^9 cel/ml (34) y la utilizada por Sirmis & Tümmler es de 5×10^9 cel/ml (48,82). Nosotros al percatarnos que, la presencia de alginato genera errores en la cuantificación, su sugerimos utilizar densidades ópticas (5 DO a 620 nm) las cuales nos proporciona un intervalo de células bacterianas ($1 \times 10^9 \pm 10\%$) dependiendo de la cantidad de alginato presente alrededor de la bacteria, así como de la longitud de onda y del aparato utilizado (30-32).

Lisado.

Para facilitar la lisis de las células bacterianas y de las posibles microcolonias que se pudieran encontrar, se propuso el uso de la mezcla de detergentes en concentraciones superiores a las recomendadas por Römling (30,32) como: Dexicolato de sodio al 0.1%, Laurin Sarcosinato al 0.54% (41,42), además del uso de soluciones amortiguadoras (buffers) de Tris base de 0.01M, EDTA a 0.1 M pH de 8, Brij ® 35 al 1.0% y el uso de las enzimas 5µL RNasa y 10 µL de lizosima por mililitro [solución madre de 10 mg/ml] de solución de lisis. Dicha mezcla de incubo por un periodos de tres horas, esto permite lisar la gran mayoría de células bacterianas libres. Pero considerando la presencia de alginato se implemento realizar un cambio de la mezcla antes mencionada con la finalidad de permitir

que la nueva mezcla interactuó solo con las bacterias que presentan una gran concentración de alginato, con un periodo de incubación de 12 hrs. Este paso generalmente es omitido y en algunos casos se realiza junto con la proteólisis o la desproteización dando origen a un excesivo gasto de las enzimas lizosima y proteinasa K (30-42,45).

Desproteización.

Este paso tiene una duración de aproximadamente 12 horas (toda la noche), lo que permite generalmente a la mezcla de EDTA-Salcosil y a la proteinasa K eliminar todas las proteínas que pudieran degradar al DNA cromosómico. Pero aun pueden quedar proteasas protegidas en el alginato que no fueron alcanzadas por el detergente y la proteinasa K, en éste paso se implemento aumentar la concentración de EDTA a 0.5M y agregar un periodo de incubación (24 hrs) con una nueva la solución desproteizante, a fin de lograr la completa inactivación enzimática (46,76).

Lavados.

En el presente estudio se implementaron 10 lavados con una hora de duración con la mezcla TE (tris HCL de 0.01M y aun pH de 8.0 y EDTA de 0.001M a un pH de 8.0). Se propuso hacer los primeros 2 lavados a una temperatura de 37 ° C para facilitar la eliminación de los restos celulares, disminuir los cambios bruscos de temperatura y para los últimos 8 lavados se sugirió realizarlos en un cuarto frío a 6° C previos al almacenamiento en refrigeración. El lavado de los bloques agarosa/bacteria es un paso poco documentado en los diversos protocolos. Nosotros nos percatamos que al realizar los lavados en el cuarto frío se eliminan e inactivan las trazas de enzimas, detergentes y restos celulares que alteran los resultados (30-32).

Electroforesis.

La implementación de un programa específico de corrimiento de electroforesis de campos pulsados para *P. aeruginosa* fue el reto más grande para el éxito de la técnica, ya que, hay que considerar: el tamaño de los diferentes fragmentos de DNA que hay que separar, la intensidad del pulso, la velocidad de migración del DNA durante la reorientación, la temperatura y el tiempo de corrida. Y dado que, hay programas con cálculos específicos que analizan estos factores (manuales de operación), nosotros en este protocolo no quisimos ignorar estos puntos, pero, para darle mayor practicidad recurrimos a los programas que cumplieran con estos parámetros y nos permitieran amplios márgenes de modificación para separar fragmentos de restricción como los descritos en el apéndice V (fragmentos de restricción para *P. aeruginosa* utilizando la enzima *SpeI*).

En éste protocolo se utilizó la cepa de ***Salmonella Branderup H9812*** cuyos fragmentos generados por la enzima de restricción *XbaI* son perfectamente conocidos y documentados (72), y además apoyados en los protocolos Brridget (48)Speijer & Savelkoul 1999 (81) y Breitenstein & Tümmler 1995 (82) se busco minimizar los tiempos, el número de bandas sin alterar la nitidez, y así reducir la presencia de fondo de banda de corrimiento.

Los cambios que implementamos, permiten ver la mutua interacción que guardan los diferentes factores durante el corrimiento electroforético, como por ejemplo:

- Al disminuir los pulsos, se obtiene una saturación de bandas y un aumento el fondo.
- Al aumentarlos los pulsos, se pierden bandas y nitidez.

No obstante, se procedió a disminuir la duración de los pulsos iniciales y aumentar los pulsos finales y reducir el tiempo de la corrida, lo que permitió aumentar el número de pulsos y disminuir el tiempo de la corrida.

Para compensar el incremento en el calor generado durante el corrimiento y la duración del pulso, implementamos un descenso de temperatura del buffer de 14° C a 10° C, esta disminución en la temperatura permitió la disipación del calor generado por el pulso, del mismo modo se evito la saturación de las bandas y favoreció la pérdida de bandas de bajo peso que no están consideradas dentro del intervalo de los marcadores escalera de pares de bases tamaño molecular y que se confunden con el fondo. Estos cambios se hicieron de forma paulatina, evitando el sobrecalentamiento de la solución amortiguadoras (buffer) y minimizando la aparición de fondo en el gel hasta encontrar rangos más óptimos para el análisis (81, 82).

| <i>Parámetros para la tipificación molecular P .aeruginosa para el estudio de 20-25 bandas</i> | <i>Parámetros desarrollados en el protocolo para el estudio de 15 a 20 bandas de P. aeruginosa</i> |
|--|--|
| <p><i>Tiempo de corrida: 20</i></p> <p><i>Temperatura: 14°C</i></p> <p><i>Gradiente de Voltaje: 6.0 Volts.</i></p> <p><i>Sw. Inicial: 5.0 seg.</i></p> <p><i>Sw. Final: 10.0seg.</i></p> <p><i>Tiempo de corrida: 10 horas</i></p> <p><i>Sw. Inicial: 15 seg..</i></p> <p><i>Sw. Final: 45seg.</i></p> <p><i>Tiempo de corrida:10 horas</i></p> <p><i>Ángulo: 120°</i></p> | <p><i>Tiempo de corrida: 17 Hrs.</i></p> <p><i>Temperatura: 10 ° C</i></p> <p><i>Gradiente de Voltaje: 6.0 Volts</i></p> <p><i>Sw. Inicial: 2.16 seg.</i></p> <p><i>Sw. Final: 54.17 seg.</i></p> <p><i>Ángulo: 120°</i></p> |

En la columna 1 se observan algunos de los parámetros más utilizados por los protocolos comerciales que utilizan la enzima *Spe I*, la cual genera 38 fragmentos. Los parámetros de corrimiento en la gran mayoría de los casos son muy prolongados y se subdividen en varios bloques lo que prolonga el tiempo de corrida.

En la columna 2, se observa los parámetros que se desarrollaron en este protocolo. Se modificaron y analizaron algunas variantes para lograr la estandarización de la electroforesis de campos pulsados y permitir la reproducibilidad de la técnica así como la separación de los fragmentos de DNA cromosómico de *P. aeruginosa*.

En las últimas décadas se ha incrementado la participación de *P. aeruginosa* y de otras bacterias con alto potencia patógeno en la proliferación de enfermedades, debido a la aparición de variedades, surgimiento de cepas multiresistentes, así como a la rápida selección y proliferación cepas con una alta versatilidad genética. Habilidad que se pone de manifiesto en su capacidad de asimilar y reprimir genes, que dificultan y ocasionan errores en la clasificación y agrupación de las de las cepas bacterianas perteneciente a un mismo género.

Todo lo anterior permite observar que el procedimiento de estandarización logrado en este protocolo para la técnica de campos pulsados, es idóneo para los estudios de tipificación molecular de gran número muestras y permite dar un seguimiento a los estudios de control y caracterización de cepas bacterianas de este género. Al promover el análisis de la huella dactilar (escalera de corrimiento electroforético) de los patrones de restricción del ADN cromosómico de las diferentes cepas de *P. aeruginosa*,

Cabe destacar que los estudios de tipificación molecular deben realizarse en periodos cortos de tiempo, aproximadamente en intervalos de tres a seis meses, ya que de otro modo los patrón de corrimiento de las cepas recolectadas presentaran características cada vez más a distanciantes entre ellas, ampliando aun más la separación molecular entre cepas.

Todo estudio debe considerar que cada patrón de corrimiento es estable, siempre y cuando las cepas no hayan sido alteradas por factores ambientales, químicos (fármacos) y biológicos que pudieran generar mutaciones o pérdidas de material genético y alteraciones de los sitios de restricción y errores en la clasificación.

La implementación de protocolos claros y precisos para la tipificación molecular las diversas bacterias, permite ampliar la capacidad de detectar y caracterizar los casos clínicos asociados a un agente infeccioso, así como agrupara y diferenciar las cepas relacionadas o no a un posible brote. (32)

Y por ultimo como puede verse la implementación de este protocolo de campos pulsados a nivel clínico para la caracterización molecular, no sólo es la aplicación de una técnica de diagnostico, es en principio una guía para el seguimiento y caracterización de cepas bacterianas, facilitando el trabajo en el laboratorio y planteando soluciones a los problemas más comunes que se pueden presentar a lo largo del desarrollo experimental sin el uso de costosos reactivos, prolongados los tiempos de trabajo y así ampliar el número de muestra procesadas....

8. CONCLUSIONES.

8. Conclusiones.

Se logró la caracterización molecular de las 19 cepas *P. aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados, por el método tipificación de campos pulsados (PFGE), y se logró identificar la relación molecular entre ellas.

- Se realizó la identificación y crecimiento de las cepas *P. aeruginosa*.
- Se estandarizó un protocolo sencillo de caracterización molecular para *P. aeruginosa*.
- Se logró la reproducibilidad de la técnica tipificación con la enzima *SpeI*. Para *P.aeruginosa*.
- Se identificó la gran versatilidad y diversidad entre los perfiles de las 19 cepas *P. aeruginosa* recolectadas en el centro hospitalario.

9.APENDICES.

9.1. Apéndice (Parámetros que afectan a la electroforesis de campos pulsados).

Voltaje.

(Gradiente de Voltaje) es la diferencia de voltaje generado por la fuente de poder entre electrodos (potencial eléctrico entre pares de electrodos opuestos 33.5cm. CHEF Mapper® XA Catalogo 170 - 3670 a 170 -3673. Lo que indica que se requiere la utilización de 180 Volts de salida con una distancia entre electrodos opuestos de 30 cm para que se genere un voltaje de corrida de 6 volts/cm **Figura 15.**

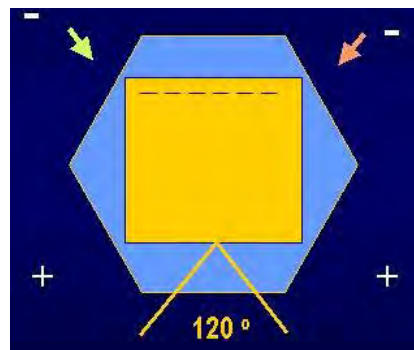


Figura 17. Cámara de Electroforesis de campos Pulsados, representación de entrada y salidas de pulso eléctrico, así como del ángulo de incidencia delos pulso en el gel

Tiempo de Switch.

La migración de las moléculas de DNA a través de la matriz de agarosa depende de la duración de pulso (voltaje). El DNA está sujeto a los cambios producidos por el impulso del campo eléctrico, generando un reacomodo dentro de las moléculas de agarosa y la duración de los pulsos alternados “llamados de tiempos de SWITCH,” durante este

periodo las moléculas de DNA cambian de dirección (por la carga que presenta y la duración de pulso) y se reorientan dentro del gel. Las moléculas grandes necesitan periodos más largos de reorientación durante el pulso comparado con las moléculas más pequeñas, lo que propicia su separación. Por lo que se requieren tiempos más largos para separar moléculas de gran tamaño y tiempos pequeños que para separar moléculas de menor tamaño dentro del tiempo de corrida.

Temperatura.

Con la aplicación de pulso eléctrico se genera un aumento de temperatura en el gel por lo que la solución amortiguadora (buffer) en el cuál está sumergido debe permitir el intercambio iónico, así como servir de medio para la disipación térmica del calor generado durante el tiempo de switch a lo largo de la corrida, entre mayor sea la duración del pulso mayor será el calor generado(La movilidad del DNA es sensible a cambios de temperatura, a mayor temperatura mayor corrimiento y disminuyen la resolución en las bandas de corrimientos). La temperatura más utilizada en PFGE es de 14° C por lo que un margen de trabajo entre 10 –14 °C hacer más lento el corrimiento y genera mayor resolución.

Ángulo de pulso.

La variación en el ángulo de pulso permite la reorientación de las moléculas dentro de la matriz (gel) propiciando una mayor separación entre bandas lo que permite un incremento en la resolución y una mejor separación de las moléculas con tamaños muy similares. El rango en este parámetro es de 94° a 120 ° logrando la separación 20 Kb y para una mayor separación de las moléculas de mayores de 1 Mb el pulso va de un ángulo de -60° a +60° generando un ángulo de 120° entre electrodos por lo que al disminuir el ángulo disminuye la resolución de fragmentos grandes de las moléculas de DNA.

Concentración de Agarosa.

La concentración de agarosa afecta la migración, así como la separación. La migración de DNA a bajas concentraciones al 0.6% facilita la migración pero disminuye la resolución la separación y la fineza de las bandas y una alta concentración 1.5 retiene el procedo de migración proporcionando bandas más gruesas y con poca definición.

| Tabla 5. Parámetros que afectan la separación de molecular de ADN en la (PFGE) | | | | |
|---|------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | DNA 1-100kb | DNA 0.1 –2.0Mb | DNA 2-4 Mb | DNA >4M |
| % AGAROSA | 1.0-1.2% | 0.8-1.2% | 0.6-1.0% | 0.5-10.8% |
| BUFFER | 0.5X | 0.5X | 1.0% TAE | 1.0% TAE |
| TEMPERATURA | 14° C | 14° C | 14° C | 14°C |
| VOLTAJE | 6-9 V/cm | 4.5-6 V/cm | 2-3 V/cm | 1.5-2.5 V/cm |
| PULSO | .05-10 s | 10-200 s | 200-1800 s | 10-60 min. |
| TIEMPO | 2-15hrs | 15-30 hrs | 24-72 hrs | 72-144 hrs |
| ÁNGULO | 0-+180 ,120° | 120° | 120-106° | 106° |

9.2. Apéndice (Criterios de interpretación para la tipificación molecular de PFGE).

Utilizando un perfil base ó arbitrario (perfil patrón) y compararlo con los demás perfiles (Criterios Tenover and Albeit.) (71). Se obtiene el número de perfiles y de la diferencias entre ellos.

Idénticos

Los criterios para la identificación de dos perfiles presuntamente idénticos, cuando al analizar los perfiles (genotípos) de las diversas cepas y se observa que algunos presentan una marcada similitud, se procede a contar el número de bandas así como los tamaños, si existe el mismo número de bandas con el mismo tamaño, se considera que ambas cepas pertenecen a la misma clona **Figura 18.** (71).

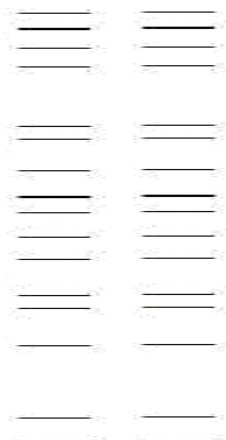


Figura 18. El perfil 1 es el perfil patrón o de comparación, el cuál nos servirá para comparar todos y cada uno de los restantes perfiles con él. El perfil 2 es un perfil al asar es comparado con el perfil 1 y se observa que no hay diferencias entra ellos por lo que se dice que ambos perfiles son clonas.

Probablemente relacionados.

En éste caso las diferencias existentes entre los perfiles analizados (número de bandas) es menor o igual a tres ($0 \leq 3$) lo cuál se debe a un cambio genético acumulado y transmitido a las sucesivas generaciones, por lo que una mutación en un sitio específico de restricción puede generar un nuevo fragmento o banda, y por lo tanto también se puede eliminar éste sitio de reconocimiento, lo que da origen a una banda de mayor tamaño. Considerando que ambas cepas están genéticamente relacionadas (Posiblemente relacionadas) y/o ambas proceden de un ancestro común (**Figura 19**) (71).

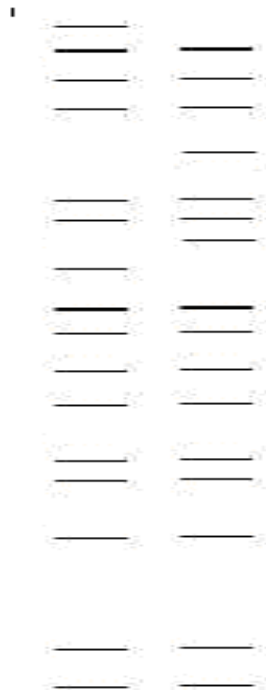


Figura 19. El perfil 2 con parado con el perfil 1 patrón presenta diferencias en número de bandas, así como en el tamaño de las bandas que forman el perfil, por lo que se infiere que el perfil 2 las cepas está genéticamente relacionadas con el brote epidemiológico,

Posiblemente relacionados.

Cuando los cambios entre los perfiles analizados son mayores a 3 e iguales a 6 ($3 \leq 6$). Estos cambios se atribuyen a inserciones (ganancia) o deleciones (pérdidas) de sitios de restricción en el ADN. También podría deberse a una clona que tuvo una evolución común, su relación genética no es cercana y por lo tanto su relación epidemiológica es poco probable **Figura 20**(71).

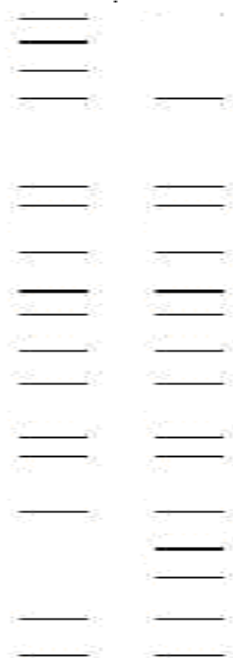


Figura 20. El perfil 2 con parado con el perfil 1 patrón presenta diferencias en número de bandas, así como en el tamaño de las bandas que forman el perfil, por lo que se infiere que el perfil 2 las cepas está genéticamente relacionadas con el brote epidemiológico,

No relacionados.

Al comparar los diversos perfiles y si se observa que alguno de ellos presenta marcadas diferencias (pérdidas o ganancias) de bandas ≥ 7 lo que en algunos casos se considera como que los perfiles presenta tres o más cambios genéticos, lo que genera diferencias entre perfiles mayores a 6. Los perfiles se consideran como cepas distintas y epidemiológicamente no relacionados **figura 21** (71).

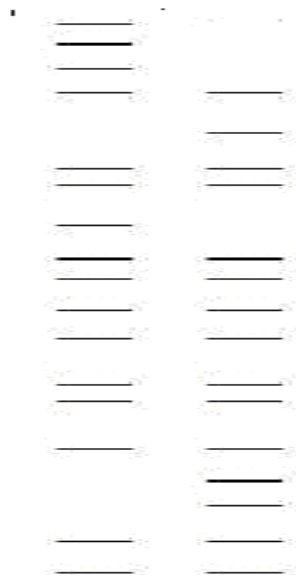


Figura 21. Las diferencias entre los perfiles 1 y 2 son tan marcadas en el número de bandas existentes entre ellos, como en el peso de las mismas por lo que se considera la que la cepa no tiene relación con el brote analizado y por lo tanto a una cepa de otro brote.

Tabla 6. Criterios de Tipificación Molecular de Tenover & Albeit para la interpretación de los perfiles generador por Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE).

| CATEGORIA | Nº TIPOCO DE FRAGMENTOS COMPARADOS CON EL PERFIL PATRÓN | INTERPRETACIÓN EPIDEMIOLOGICA |
|----------------------------------|--|--|
| INDISTINGUIBLE | 0 | El aislado es parte del brote |
| ESTRECHAMENTE RELACIONADO | 1 - 3 | El aislado es probablemente parte del brote |
| POSIBLEMENTE RELACIONADO | 4 - 6 | El aislado es posiblemente parte del brote |
| DIFERENTE | ≥ 7 | El aislado No es parte del brote |

9.3. Apéndice (Preparación de soluciones y reactivos).

:

Caldo Luria: LB Luria – Bertani, Luria Broth Base., Invitrogen, No.Lot.80265079.

Se pesarán 25.0 gm del medio, que fueron colocados poco a poco en un matraz Erlenmeyer que contiene 1000 ml. de agua des ionizada, hasta su total disolución. Para su esterilización se vertieron 5 ml del medio en tubos con rosca 13 mm x 150 mm de la marca kimax ® con el tapón ligeramente cerrado, bajo las siguientes condiciones: 15 minutos, 15 libras, a 121° C. Si se prefiere el medio consta de 10.0 g Bacto triptona, 5.0 g Extracto de levadura, 5.0 g NaCl H₂O destilada cbp 1000.0 ml pH final ajustado a 7.0 pH con NaOH 1N. o en placas de agar LB (Agar) a 1 litro de Caldo LB añadir Agar Bacteriológico 16 g (1,6%).

Agar Sangre: Base agar Sangre, BD Bioxon ® No. Lot. 211728

Se pesan 40 g se disuelven en 1000ml de agua desmineralizada, se calienta constantemente con agitación hasta que hierva por un minuto. Se esteriliza en autoclave a 121° C, 15 minutos, a 15 libras de presión. Se atempera a 45° C a 50° C por 30 minutos, se agregan 50 ml. de sangre desfibrinada de carnero (5.%), y se distribuye de 20 a 25 ml en pacas Petri sin formación de burbujas.

Agar MacConkey. MERCK. No.Lot. VM841165

Se disuelven 50 g del medio Agar MacConkey en 1000 ml de agua desmineralizada y se calientan hasta la ebullición por un minutos y se esterilizan en autoclave por 15 minutos, 121 °C , a 15 Libras de presión. Su composición típica es (17gm. Peptona caseína, 3gm. de Peptona de carne, 10.0 g Lactosa, 1.5 g Sales biliares , 5.0 g NaCl 0.030 g Rojo Neutro, 0.001 g Violeta Cristal, 13.50 g, Agar-agar)y se guarda en refrigeración.

Gelosa Especial:

El medio de gelosa especial (es un medio de sustento para cepas de trabajo), consta de 20.0 g. base agar sangre, 15.0 g. agar bacteriológico y 1.5 g. de extracto de carne, la mezcla se disuelve en matraces Erlenmeyer, para su correcta manipulación al calentar hasta la ebullición por un minuto, después se distribuyen volúmenes de 5.0 mL el medio en los viales (vials de 10 mL) para ser esterilizados, a 15 minutos, 15 Libras, 121 °C.

Solución PIV*: Solución amortiguadora (Buffer) de resuspensión.

Esta solución permite la resuspensión del paquete bacteriano, sin producción lisis celular. Está formada TRIS base GIBCO BRL. Ultra puro Techologis. (2-Amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanediol) con un peso molecular de 121.14 gm / mol, a un pH 8.0 y con una concentración de 0.01 M., Cloruro de sodio NaCl a una concentración de 1M y por último EDTA a 0.25 M. Esta solución es esterilizada a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión.

P.I.V.*

| | | |
|------------------------|---------------|-------------|
| NaCl pM= 29.22 g /mol | 1,0 M | 29.22 g |
| Tris. pM= 121.1 g /mol | 0.01M pH= 8.0 | 5ml (1.0 M) |
| EDTA pM = 372 | 0.25M pH=8.0 | 93.1g |

Volumen total 1000 mL.

Solución de EC-Lisis

Esta solución consta de dos fases una compuesta por detergentes (surfactantes)/solución amortiguadora (buffer) y otra por enzimas que permiten la lisis completa del paquete bacteriano embebido en el plug. La primera fase está conformada por Tris base a una concentración de 0.01 M, EDTA a 0.1 M pH de 8, Dexicolato de sodio al 0.1%, Laurin Sarcosinato al 0.54% y Brij ® 35 al 1.0%. Esta solución es esterilizada 121 °C por 15 minutos a 15 Libras de presión, y almacenada a temperatura ambiente hasta su utilización. La segunda fase, la enzimática, que para optimizar la lisis se requiere de la utilización de las enzimas RNasa y lizosima para degradar tanto el RNA y lisar la membrana celular respectivamente, dichas enzimas se encuentran almacenadas en congelación a menos 20°C a una concentración de [10 mg/ ml] y para su utilización en los tubos falcón se requieren 5µL de RNasa y 10 µL de lizosima por mililitro de solución de lisis.

E.C-Lisis

| | | | |
|-----------------------|------------------|---------------|------------------|
| Tris. | pM= 121.14g /mol | 1.0 M pH.=8.0 | (5.0 ml) |
| NaCl | pM = 58.44g /mol | 1.0 M | (29.2 g) |
| E.D.T.A. | pM= 372.24g /mol | 0.1 M pH=8.0 | (100mL.de 0.5 M) |
| Desoxicolato de Sodio | pM= 288.4 g /mol | 0.1% P/V | (0.5 g) |
| Laurilsarcosilato | pM= 293.4 g /mol | 0.54% P/V | (2.7 g) |
| Brij 35 ® | 30% P/V | 1.0 % | (16.66 ml) |

Volumen total 500 ml

Solución desproteinizante: E.S-P K

Solución amortiguadora (Buffer) de desproteinización, La cuál esta compuesta por dos componentes. El primer componente consta de una mezcla de Solución amortiguadoras (buffer) y detergentes (surfactantes), y el segundo componente una enzima (proteínasa K). El componente A, la mezcla del buffer de EDTA a una concentración de 0.5 M con un pH=9. Que debe ajustarse cuidadosamente con la ayuda de un pHmetro ya que esta sal es muy poco soluble a pH menores a 8.0, Y el surfactante Sarcosil, cuya concentración final es 0.1% que debe agregarse con cuidado y poco a poco antes de aforar. Esta solución debe esterilizarse a 121°C por 15 minutos por 15 libras de presión. El componente B, la enzima proteínaasa K se prepara con concentración de [20mg/ml.] y se agregan 25µl por cepa.

Para 500mL

95.1 gm de EDTA ajustar pH antes de aforar a pH =9.0

0.2 gm de de Sarcosil.

Solución TE (buffer Tris –EDTA)

Solución de lavado, está conformada por Tris a una concentración final de 0.01 M y aun pH de 8.0 y EDTA con una concentración final de 0.001M a un pH de 8.0 . La solución es esterilizada a 121°C por 15 minutos y 15 libras de presión.

| | | |
|-------|--------------|-------|
| 10 ml | Tris pH= 8.0 | 1.0 M |
| 2 ml | EDTA pH=8.0 | 0.5 M |

Volumen total de 1000 ml (cbp 1 lt.)

Solución TBE (Buffer Tris- Borato-EDTA pH 8.3)

La solución de tris-botato-EDTA es un buffer que permite la correcta dispersión de las cargas eléctricas, durante el corrimiento de la electroforesis en la cámara de campos pulsados. Las concentraciones de los reactivos son de 0.045 M, para Tris y ácido bórico y para EDTA es de 0.001M. Esta solución se prepara el mismo día de su utilización.

Preparación del Gel de Agarosa.

Se preparo una solución de agarosa al 1.0 % (1gr.de agarosa Para Pulsed Field Gel Electrophoresis SeaKem® Gold agarose Bio Whittaker Molecular Applications CN.50150) con 100mL. de buffer TBE Tris-Borato EDTA (TBE pH=8.0) .089M Tris base., 089M Borato. 0.02M EDTA MERCURY Reagents for Molecular Biology Cat#5113) es calentada cuidadosamente en el microondas por 1.6 minutos a intervalos de 40 segundos hasta su disolución completa, una vez logrado lo anterior se coloca en un baño María a 52 ° C para su posterior utilización. Se lava y se ensambla el molde (14 x13 cm) así como el soporte del peine de 15 dientes para campos pulsados (BIORAD)

Bromuro de etidio:

El bromuro de etidio (Homidium bromide; 3,8-Diamino-5-etil-6-fenil-fenantidinio bromide), El cuál por su alta toxicidad debe manipularse con guantes todo el tiempo, ya que tiende a unirse a la doble cadena de DNA formando alteraciones a largo tiempo. Para su uso cotidiano en el laboratorio se trabaja a una concentración de 1.0 mg / ml. Ya que sólo se requiere para teñir los geles el tiempo suficiente para observar las bandas y tomar la foto representativa. Se mezclan 30 µL de esta concentración en 300 ml de agua desmineralizada para obtener una concentración final de [.0001mg /ml].

9.4. Apéndice (Equipo de laboratorio).

:

Agitador horizontal, Platform, Vari Mix. Thermolyne .

Agitador angular, Compact Rocker, (BIORAD)

Autoclave. AMSCO G-120 Eagle/ Century Series

Críocentrífuga. Multifuge3 L-R ,Heraerus, Accesolab.

Espectrofotómetro GENios. (TECAN).

Cámara de Electroforesis de campos pulsados CHEF MAPPER™ (BIO RAD).

PHmetro (potenciómetro) Ph/ conductiviti meter 442, Corning, accesolab

FotoDyne (Incorporated)Polaroid, scimericas.

Scanner SHARP (full color scanner. SHARP Extra High Resolution JX-610)

Transiluminador (Hoefer) Luz Blanca/UV (rango de 302-365nm),
(Mighty Bright Hoefer Scientific Instruments San Fancisco) accesolab.

Ultracongelador -70° C (REVCO), Legaci System.

Refrigerador 4° C (Jordon Cientific)

9.5. Apéndice tamaño de los fragmentos de cepas *Pseudomonas aeruginosa* cortadas con la enzima *SpeI*.

| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (37) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 (42) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7 (50) |
|--|--|---|
| 539862 | 721064 | 590138 |
| 460387 | 441423 | 525746 |
| 423874 | 415225 | 515250 |
| 390753 | 318040 | 487747 |
| 386850 | 317242 | 366181 |
| 337296 | 313054 | 339544 |
| 315097 | 289651 | 316027 |
| 306155 | 274146 | 315742 |
| 273503 | 262106 | 310803 |
| 249951 | 259408 | 256000 |
| 244487 | 245882 | 254410 |
| 226491 | 228727 | 216068 |
| 215239 | 227263 | 204804 |
| 182861 | 226181 | 170414 |
| 181845 | 198460 | 149418 |
| 170290 | 177143 | 135739 |
| 158771 | 175696 | 123068 |
| 158066 | 170667 | 115268 |
| 148819 | 159167 | 110890 |
| 139625 | 153541 | 103589 |
| 124997 | 146421 | 97704 |
| 96882 | 141255 | 91447 |
| 93821 | 101750 | 88089 |
| 67070 | 92703 | 77799 |
| 61505 | 73619 | 73118 |
| 59453 | 66294 | 71499 |
| 43421 | 65722 | 67973 |
| 36886 | 58137 | 63694 |
| 34692 | 36162 | 57406 |
| 33840 | 34518 | 53661 |
| 29225 | 33841 | 33583 |
| 23611 | 29513 | 31544 |
| 20461 | 29230 | 29183 |
| 10478 | 23611 | 22809 |
| 6652 | 20255 | 21869 |
| 6279 | 19147 | 16898 |
| 4909 | 18941 | 15241 |
| | 15854 | 14879 |
| | 6644 | 10125 |
| | 6530 | 8980 |
| | 4909 | 6872 |
| | 2615 | 6748 |
| | | 6663 |
| | | 4025 |
| | | 3884 |
| | | 3285 |
| | | 1398 |
| | | 832 |
| | | 255 |
| | | 30 |

10. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

1. Finegold. Sydney M. (1991) **“Diagnóstico Microbiológico, séptima edición, Editorial panamericana”**, Argentina. p. 395.
2. Sánchez V. Tay Z. (2003) **“Fundamentos de microbiología y Parasitología Médica”**, Méndez Editores. México. D.F. p. 316-318.
3. Parts. Guillem. (2005) **“Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana.** Madrid España. p. 214.
4. Suites. Daniel P., Terr. Abba. (1996) **“Inmunología Básica y Clínica”** Editorial El Manual Moderno. México. p. 806, 845, 912, 947.
5. Pace. John L. Rupp. M. (2006) **“Biofilms Infection and Antimicrobial Therapy. Taylor & Francis Group”**. United State of America. p.155-165.
6. Smith. David. Conant N., (1960) **“Bacteriología de Zinsser”**. Segunda Edición. Unión Tipografica Editorial Hispano Americana. p. 496-498.
7. Ingraham Jonh L. Ingraham. C. (1998) **“Introducción a la Microbiología”**. Editorial Reverte Barcelona España. p. 640.
8. Ryan. Kenneth J. Ray G. (2005) **“Microbiología Médica de Sherris (Una Introducción a las Enfermedades Infecciosas)”**. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. p. 419-424.
9. Sherris. John. C. (1993) **“Microbiología Médica Introducción a las Enfermedades Infecciosas”**. Ediciones Doyma .Barcelona España. p. 443-449.
10. Grenvik. Ake. (2002) **“Tratado de Medicina Clínica y Terapia Intensiva”**. Cuarta Edición .Editorial Médica Panamericana. Argentina. p. 1555
11. Tierney. Lawrence M. Saint. S. (2005) **“Manual de Diagnóstico y Tratamiento”**. Tercera Edición. Manual Moderno. p. 158,541.
12. Rodés. Teixidor J, Guardía J. (2004) **“Medicina Interna”**. Segunda Edición. Editorial Masson. Barcelona España. p. 1647-1648.
13. Watson. James., (2006) **“Biología Molecular del Gen”**. Quinta Edición .Editorial Médica Panamericana. Madrid España. p. 691.

14. Warren. Levinson. (1992) **“Microbiología y Inmunología Médicas”** (Evaluación y Repaso). Manual Moderno. Mexico. D.F. p. 143,157,519.
15. Nolte. William A. (1971) **“Microbiología Odontológica”** Editorial Interamericana”. México. p. (23).
16. Koneman. Elmer W. (2003) **“Diagnóstico Microbiológico. (Texto y Atlas Color)”**.Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. p. 251-287.
17. Mac Faddin. Jean F. (2005) **“Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica”**. Tercera Edición .Editorial Médica Panamericana. Argentina. p. 632.
18. Bauer. John. (1986) **“Análisis clínicos (Métodos e Interpretación)”**. Editorial Reverte. España. p. 869,948.
19. Stone. Keith C. (2000) **“Diagnóstico y Tratamiento de Urgencias”**. Cuarta edición. Manual Moderno. p. 303, 900,1171.
20. Wilson. Michael. (2004)” **Microbial Inhabitants of Humans. (Their Ecology and Role in Health and Disease)”**. Editorrial Cambridge Universiti. United States of America. p. 121,123, 125, 173.
21. Staley. James T, Bryant M. (1989) **“Bergey’s Manual® of Sisstema”**. Vol 3. Williams & Wikins. United State of America. p. 1621,1866, 1867,1962.
22. Greenwood. David. (2002) **“Medical Microbiology (A guide o Microbial Infection Patogénesis, Inmunity Laboratoty Diagnosis y control)”** Sixteenth Edition . hurchill Livingstone. p. 282,285.
23. Pumarola. A. (1991) **“Microbiología y Parasitología Medica. Segunda edición Ediciones científicas y Técnicas”**. S.A. Masson SalvatMedicina. pp. 478-483
24. Schwartz. D. C. and Cantor C. R. (1984) “Separation of yeast chomosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis”. Cell, 37. p. 67-75.
25. Moya Aniel, Berrios Densse, Almenares.J. F. (2003) **“Serotipificación y Susceptibilidad antibacteriana de Cepas de *Pseudomona aeruginosa* aisladas de pacientes Quemados Infectados”**. VacciMonitor.12:2 p. 13-18.
26. Moya Aniel, Joo Lázaro, Rodríguez. (2002) **“Preparado de Inmunoglobulinas contra LPS de *Pseudomona aeruginosa*”**. VacciMonitor. 11; 1. p. 11-17.

27. Fernández Cuenca Felipe. (2004) **“Aplicaciones de las Técnicas de PCR a la Epidemiología Molecular en las Enfermedades Infecciosas”**. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 22;6 p. 355-360.
28. Moya.Aniel, Callito Adriana, Cedré Bárbara. (2007) **“Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos hacia Antígenos de *Pseudomona aeruginosa*”** .*VacciMonitor*.16;1 p. 5-11
29. Gómez Álvarez. C. A, Leal Castro. A. L, Pérez de Gonzalez. Ma. J. (2005) **“Mecanismos de Resistencia en *Pseudomona aeruginosa*: Entendiendo a un Peligroso Enemigo”**.*REV FacMed Univ Nac Colombia* 25:1 pp. 27-36
30. Römling.Ute, Grothues.Dietmar. (1989) **“A physical genome map of *Pseudomona aeruginosa* PAO”**. *J. EMBO* 8:13 p. 4081-4089.
31. Janel S. R. and Jonson R. Alice. (1990) **Dertermination of genome size of *Pseudomona aeruginosa* by PFGE: análisis of restriction fragments**.*Nucleic Acids Research* 18:11 p. 3171-3174.
32. Römling. Ute and Tümmler.Burkhard. (1991) **“The impact of two –dimensional pulsed-field gel electrophoresis technique for the consistent and complete mapping of bacterial genomes: refined physical map of *Pseudomona aeruginosa* PAO”**. *Nucleic Acids Research*. 19:12. p. 3199-3206.
33. O’Carroll M. R. , Syrmis. M.W. (2004) **“Clonal strains of *Pseudomona aeruginosa* in paediatric and adult cystic fibrosis units”**. *Eur Respir Journal* 24: p.101-106.
34. Spencker. F. B, Haupt. S., (2000) **Epidemiologic Characterization of *Pseudomona aeruginosa* in Patients with Cystis Fibrosis**. *Europ. Soc. of Clin. Microbiol Inferct*.6: p. 600-607.
35. Anthony Mario, Rose Barbara., (2002) **Genetic Analisys of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the Sputa of Australian Adult Cystic Fibrosis Patients**. *J. Clin. Microbiol.* p. 2772-2778.
36. Rello. Jordi, Mariscal Dolors, March. Francesca. (1998) **Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Ventilated Patients**. *Am J Respir Crit Care Med* 157: p. 912-916.

37. Wilsor. Geoffrey, Lo. Raymond, Ho. J. Shannan., (2005) ***Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community –based continually updated, genome annotation.** Nucleic Acids Research. 33: p. 338-343
38. Khan .Nurul H., Ishii.Yoshikazu., (2006) **“Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from Open Ocean and Comparison With Freshwater”**, Clinical, and Animal Isolates. Microbial Ecology.
39. Lee. D. L, Urbahr J. M. (2006) **“Genomic Analysis Reveals that *Pseudomonas aeruginosa* in combinatorial. Genome Biology 7: p. R 90.1-90.14**
40. Pagani.Laura, Colinon Céline. (2005) **“Nosocomial Outbreak Caused By Multidrug – Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing IMP-13 Metallo β -Lactamase”.** J. Clin.Microbiol.. 43:8. p. 3824-3828.
41. Ahlén C., Mandal.L.H. (1998) **Identification of Infectious *Pseudomonas aeruginosa* Strains in an Occupational Saturation diving environment.** Occup Environ Med . 55: p. 480-484.
42. Chio. J. Y.,Sifri. C.D. (2002) **Identification of Virulence Genes in Pathogenic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* By Representational Difference Analysis.** Journal of Microbiology 184:4. p. 952-961.
43. Sabat. A., Malachowa.N. (2006) **“Comparison of PCR- Based Methods for Typing *Staphylococcus aureus* Isolates”.** J.Clin Microbiol 44:10. p. 3804-3807.
44. Ortiz. H. M., Gallegos. G. A. (2004) **“Caracterización por RAPD-PCR de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística”.** Salud Pública de México. 42:2.
45. Duck. William, Steward. Ch.D. (2003) **“Optimization of computer Software Settings Improves Accuracy of Pulsed-Field Gel Electrophoresis acrorestriction.”** J. Clin. Microbiol. 41:7. p.3035-3042.
46. Renders.Nicole, Römling U. **“Comparative Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments”.** J. Clin. Microbiol. 34:12. p.3190-3195.
47. Sirmis. M. W., O’Carroll. M Rapad () **“Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Harboured by Adult and Paediatric Patients with Cystic Fibrosis using Repetitive-Element-Based PCR-assays”.** J. Med. Microbiol. 53: p.1089-1096.G

48. Kulasekara. Bridged R. Kulasekara. H. D. (2006) **“Acquisition and Evolution of the *exoU* Locus in *Pseudomonas aeruginosa*.”** J. Bacteriol. 188:11. p.4037-4050.
49. Gomez. G. J. L.,(2006). **Inhibidores de Betalactamasa Guía Práctica Terapéutica Criterios de Uso de Racional de Antibióticos** p.39
50. Rampioni.Giordano, Bertani.Iriis. (2006) **“The Quórum Sensing Negative Regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* Birds to the *lasI* Promotor”.** J Bacteriol.188:2.p.815-819.
51. Walker.T.Stuart. (2000) **“Microbiología”** McGraw-Hill. Interamericana. México. pp. 181-187.
52. Esnard.B.Sara. (1997) **“Empleo de sueros Diagnósticos Producidos en la Republica Popular de China para la Serotipificación de *Pseudomonas aeruginosa*”.** Rev. Cubana. Farm. 31:2 p.107-112.
53. Esnard. B. Sara. (1997) **“Empleo de sueros Diagnósticos Producidos en la Republica Popular de China para la Serotipificación de *Pseudomonas aeruginosa*”.** Rev. Cubana. Farm. 31:2 p.107-112.
54. Pascual A, Joyanes P. (2001) **Actividad de Cuatro Fluoroquinonas Frente a Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con Diferente Patrón de Sensibilidad a Ciftazidima e Imipenem.** Enferm. Infecc.Microbial Clin.19: p.432-434.
55. Carro. Máiz L. (2005) **Tratamiento con azitromicina a largo plazo en un paciente con bronquiectasias idiopáticas.** Arch Bronconeumol; 41:pp. 295 – 295.
56. Alvarez Herrera. A. .H. (2004) **Mono ADP-Ribosilación.Implicación en la Fisiología de los Organismos.** REB 23: 4 p.149-156.
57. Van Delden Christian and H. Iglewski Barbara.(1998) **Cell to cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infection.** Emerg. Infect. Dis.4:4. p. 551-560.
58. Soscia Chantal. Hachani Abderrahman. (2007) **Cross Talk Between Type III Secretion and Flagellar Assembly Systems in *Pseudomona aeruginosa*** J Bacteriol. 189:8 p. 3124-3132.
59. Cuzick A, Stirling F R. (2006) **The type III pseudomonal exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production.** Infect. Immun 74:4. p. 4104-4113.

60. Dasgupta Nandini, Ashare Alix, Hunninghake Gary W. (2006) **Transcriptional Induction of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System by Low Ca²⁺ and Host Cell Contact Proceeds through Two Distinct Signaling Pathways** *Infect Immun.* June; 74 : 6 p 3334–3341.
61. Tart Anne H., Wolfgang Matthew C., and Wozniak Daniel J. (2005) **The Alternative Sigma Factor AlgT Represses *Pseudomonas aeruginosa* Flagellum Biosynthesis by Inhibiting Expression of *fleQ*** . *J Bacteriol.* December; 187:23: p.7955–7962.
62. Caiazza Nicky C., ShankRobert M. Q. s, and O'Toole G. A. (2005) **Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa***. *J Bacteriol.*; 187:21 pp 7351–7361.
63. TenoverFredC, Arbeit. Robert D.(1995) **Enterpreting Chomosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis : Criteria for Bacterila Strain Typin.** *J Clin. Microbiol.*33:9. p. 2233-2239.
64. Hassett. D. J. Charnega. L. (2002) **Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: Mechanisms of resistance, antioxidant defensas, and demostration of a manganeso-cofactored superoxide dismutase.** *Infec. Immun.* 60:2 p.328-336.
65. Ramafi Grece, Anderson Ronald (1999) **Exposure of N-Formyl-1-Mehtionyl-1-Leucyl-1-Phenylalanine_Activated Human Neutrophils to the *Pseudomonas aeruginosa*-Derived Pigment 1-Hidroxyphenazine Is Associated with Impaired Calcium Efflux and Potentiation of Primary Granule Enzyme Release.** *Infec Immun.* 67:10. p. 5157-5162
66. KanthaKumar K. Taylor G. Tsang KW. (1993) **Mechanisms of action *Pseudomonas aeruginosa* Pyocianin on human ciliary Beat in vitro.** *Infec Immun.* 61:7. p. 2848-2853.
67. [Look DC](#), [Stoll LL](#), [Romig SA](#), [Humlicek A](#), [Britigan B.E](#). (2005) **Pyocuanin and its precursor phenazine 1 Carboxylic acid increase IL8 and Intraellular adhesion Molrcule -1- expression in Humain airway epithelial cells by oxidant –dependent mechanisms.** *J Immunol.*15:175. p. 4017-4020.
68. Tamber Sandeep, Maier Elke, Benz Roland, and Hancock Robert E. W. (2007) **Characterization of OpdH, a *Pseudomonas aeruginosa* Porin Involved in the Uptake of Tricarboxylates** *J Bacteriol.* 189:3. p. 929–939.

69. Köuig B, Vasil M. L, König W. (1997) **Role of Haemolitic and non- Haemolytic Phospholipase C From *Pseudomonas aeruginosa* in Interleukin-8 From Human Monocytes.** J Med. Microbiol. 46:6. p. 471-478.
70. Wieland. Catharina W., Siegmund Britta, Senaldi Giorgio. (2002) **Pulmonary Inflammation Induced by *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide, Phospholipase C, and Exotoxin A: Role of Interferon Regulatory Factor 1.** Infect Immun. 2002; 70:3. p. 1352–1358.
71. Tonover. Fred, Albeit. Robert. (1995) **Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed- Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing.** J. Clin. Microbiol. 33:9 p. 2233-2239.
72. Hunter. Susan, Vauterin Paul. Lambert Mary A. (2005) **Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use With the Pulse Net Standardized Pulsed Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard.** J. Clin. Microbiol. 43:3 p. 1045-1050.
73. Galán. J. Carlos. Baquero. M.Rosario. (2006) **High Mutation Rate Bacteria: Risks of a High-speed Life.** Infectio 10:1 p. 22-29.
74. Crespo. M.P., Woodford. N., Sinclair.A. (2004). **Outbreak of Carbapenem- Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo- β -Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali Colombia.** J. Clin. Microbiol. 42: 11 p. 5094-5101
75. Brisse. Sylvain, Milatovic. D., Fluit. A.C. (2000). **Molecular Surveillance of European Quinolone- Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Using Automated Ribotyping.** J. Clin. Microbiol. 38:10. p.3636-3645.
76. Renders. Nicole, Römling. Ute,. (1996). **Comparative Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed Field Gel Electrophoresis or Macrorestriction Fragments.** J. Clin. Microbiol. 34:12. p. 3190-3195.
77. Grundmann. Hajo, Schneider. Christian. (1995) **Discriminatory Power of Three DNA- Based Typing Techniques for *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Clin. Microbiol. 33:3. p. 528-534.

78. Speijer Han., H.M. Paul. (1999) **Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit.** J. Clin. Microbiol. 37:11. p. 3654-3661.
79. Vazquez. Julio. A., Berrón Sonsoles. (2004) **Multilocus sequence Typing: El Marcador Molecular de La Era del Internet.** Enfer. Infecc. Microbiol. Clin. 22:2 p. 65-71.
80. Giske ChristianG & Libisch.Balázs. (2006) **Establishing Clonal Relationships Between VIM-1 Like Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from Four European Countries by MST.** J.Clin. Microbiol. 44:12 p 4309-4315.
81. Speijer Han, Savelkoul Paul H.M. (1999) **Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit.** J. Clin. Microbiol. 37:11 p. 3654-3661.
82. Breitenstein Stefanie, Tümmler Burkhard and Römling Ute. (1995) **Pulsed Field Gel Electrophoresis of Bacterial DNA Isolate Directly from patients' sputa.** Nucleic Acids Research, 23:4 p.722-723.
83. Silbert, Suzane. Barth AlfonsoL. (2001) **Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian Cystic Fibrosis Patients.** J. Clin. Microbiol. 29:11 p.3976-3981.
84. Soberón Chávez Gloria and Aguirre Ramírez Miranda. (2005) **Is *Pseudomonas aeruginosa* Only Sensing Quorum.** Critical Reviews in Microbiology, 31. p. 171-182.
85. Römling Ute, Grothues Dietmar. Heuer Thomas. (1992) **Physical genome analysis of bacteria.** Electrophoresis. p. 626-631.