

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema

La sepsis y el shock séptico, causados por bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos, virus y parásitos, se han convertido en un serio problema de salud en los últimos años. La práctica clínica más común es el tratamiento antibiótico empírico muchas veces a pesar de no comprobarse la presencia de una verdadera infección. Muchos pacientes, sin embargo, no reciben diagnóstico y tratamiento tempranos y sufren de complicaciones mayores al no recibir el tratamiento adecuado.

El diagnóstico precoz de sepsis y septicemias brinda posibilidades de tratamiento oportuno y específico, reduciendo a su vez las tasas de morbi-mortalidad, la posibilidad de inducción de resistencia antibiótica, las complicaciones y los costos de manejo clínico de pacientes.

Cuando los métodos tradicionales como el cultivo, se enfrentan a microorganismos de lento o nulo crecimiento o que han generado resistencia antibiótica es difícil la obtención de resultados, por lo tanto se debe recurrir a la utilización de técnicas más avanzadas como son aquellas que se basan en el empleo de biología molecular.

Las técnicas basadas en el diagnóstico molecular han probado ser superiores al cultivo con miras al tratamiento antimicrobiano del paciente y en la detección de bacterias con requerimientos de crecimiento inusuales.

Los métodos moleculares como PCR han tenido mucho éxito en cuanto a la identificación de un amplio grupo de microorganismos. Debido a que este tipo de ensayos no requieren del crecimiento del patógeno, poseen una gran ventaja sobre los procedimientos tradicionales. Sin embargo, para el éxito de estas técnicas es necesario un sistema de extracción que soporte un alto volumen de muestra y que proporcione un DNA libre del *background* genómico humano.

## **1.2 Justificación del problema**

La trascendencia de este estudio radica en la utilización de nuevas tecnologías diagnósticas para la detección de bacteriemias, complicaciones de tipo infeccioso que conllevan a elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en nuestro país.

En la actualidad, las técnicas fundamentadas en el análisis molecular son de vital importancia para el diagnóstico y tratamiento adecuados y tempranos de muchas enfermedades. Este tipo de técnicas son rápidas, sensibles y específicas, aportando a las técnicas microbiológicas tradicionales.

A pesar de la amplia utilización de ensayos moleculares para estudios clínicos, no existen investigaciones a gran escala de validación de sistemas moleculares en este escenario específico. Un taxativo importante ha sido la falta de estandarización y reproducibilidad en el uso de la técnica de extracción de DNA de patógenos en muestras clínicas, así como la carencia de sistemas de extracción de alta capacidad que soporten grandes volúmenes de muestra.

El principal limitante para la detección de bacteriemias de bajo nivel es el volumen de muestra empleado para el diagnóstico. Muchos de los sistemas de extracción modernos se basan en la adherencia del DNA a partículas magnéticas o membranas y debido a que la mayor parte de DNA presente en una muestra es DNA genómico humano, éste aumentará proporcionalmente al volumen empleado para la extracción, convirtiéndose en una barrera física para la adsorción del DNA del patógeno a dichas superficies.

Este trabajo propone la modificación de un sistema de extracción y purificación de DNA de patógenos en muestras clínicas mediante la eliminación de DNA genómico humano de leucocitos, haciéndolo capaz de tolerar altos volúmenes de muestra sin que la capacidad de extracción se vea alterada. Este estudio aportará a la implementación de este sistema para la validación del diagnóstico molecular de bacteriemia en pacientes de diversos hospitales del país en una fase posterior de estudio.

## **1.3 Objetivos de la investigación**

### **1.3.1 Objetivo General**

Diseñar y evaluar un sistema de alta capacidad para extracción y purificación de DNA de patógenos a partir de muestras clínicas (sangre periférica) para la validación del diagnóstico molecular de bacteriemia/sepsis.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Modificar un sistema de extracción de DNA basado en el manejo de membranas, empleando altos volúmenes de muestra de sangre y haciendo uso de técnicas de separación de componentes de sangre y *buffy coat*.
- Determinar la sensibilidad analítica de extracción de DNA del sistema.
- Probar el sistema como prueba piloto para la detección de patógenos en sangre mediante un ensayo universal bacteriano con PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa).
- Probar el sistema en muestras clínicas.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Bacteriemia**

Médicos y microbiólogos han coincidido en que la presencia de microorganismos vivos en la sangre conlleva altas tasas de morbilidad y mortalidad. Según Riedemann, Guo & Ward (2003), en Estados Unidos la sepsis afecta a aproximadamente 700.000 personas y causa alrededor de 210.000 muertes por año. Muchos de estos casos se dan por infecciones nosocomiales. Dichos episodios en su mayoría son causados por microorganismos resistentes a tratamiento antimicrobiano.

La invasión de patógenos hacia el sistema circulatorio se da como secuela de una infección significativa. Usualmente la invasión de la sangre por microorganismos se da de

dos formas: por drenaje del foco de infección de vía linfática a la vía vascular o por inyección directa (dispositivos intravasculares contaminados, entre otros). Estos fenómenos son causados debido a una falla en los mecanismos de defensa en el huésped o a un error en la localización y eliminación del foco primario de infección.

Como sostienen Brunn & Platt (2006), los síntomas clínicos de sepsis (fiebre, taquicardia, taquipnea, entre otros) comienzan a manifestarse junto con la presencia de un hemocultivo positivo. En muchos casos se presenta un serio síndrome clínico, denominado septicemia, asociado con infección aguda y disfunción de órganos. Sin embargo, los síntomas clínicos de sepsis son frecuentemente presentados por pacientes con niveles de bacterias en sangre no detectables mediante cultivo (Riedemann *et al.*, 2003).

La práctica clínica más común está caracterizada por tratamiento antibiótico de tipo empírico y de amplio espectro a pesar de la baja incidencia de una verdadera infección. Sin embargo, un número variable de pacientes no poseen un diagnóstico temprano y la infección puede evolucionar hacia shock séptico y muerte. Muchos marcadores, incluyendo citoquinas, pueden ayudar en la toma de decisiones en cuanto al tratamiento, pero su eficacia se mantiene incierta. (Horisberger, 2004; Sastre, 2006)

Los sobrevivientes de sepsis usualmente presentan disfunción residual de órganos que puede resultar en síntomas persistentes como fatiga, depresión y reducida calidad de vida (Granja *et al.*, 2004).

Reimer, Wilson & Weinstein (1997) describen que los agentes etiológicos más comunes de bacteriemia en adultos son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En niños los microorganismos causantes de esta patología son similares, sin embargo, existen muchas diferencias importantes. Las bacteriemias anaeróbicas son poco comunes en pacientes pediátricos, quienes con toda probabilidad son más susceptibles a infecciones por estafilococo y estreptococo, incluyendo *Streptococcus pneumoniae* y meningococo.

### **1.4.1.1 Métodos Diagnósticos**

La mayor parte de las bacterias de interés clínico pueden identificarse mediante técnicas microbiológicas convencionales, las cuales precisan el aislamiento previo del patógeno y se fundamentan en propiedades fenotípicas (Rocidio y Mendoza, 2004).

El hemocultivo se ha convertido en el estándar de oro para el diagnóstico de sepsis. Sin embargo, esta técnica no es lo suficientemente rápida debido a que puede tardar de 2-8 días para proporcionar resultados (Crowley, 2002).

Otros posibles marcadores clínicos de infección son los mediadores de inflamación, marcadores hematológicos e inmunológicos, los cuales hasta el momento no han mostrado ser suficientemente sensibles y específicos.

La infección y sepsis son problemas clínicos especialmente importantes, en donde la aplicación de nuevas técnicas diagnósticas, como el análisis molecular, podrían contribuir en términos de disminución de tasas de morbi-mortalidad, reducción de estancia hospitalaria, decremento de incidencia de infección nosocomial y disminución global de los costos hospitalarios.

Los métodos moleculares han emergido en los últimos años para convertirse en una herramienta adicional en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es la técnica de amplificación de ácidos nucleicos más ampliamente utilizada con este fin (Mackay, 2004). Esta tecnología disminuye la dependencia del cultivo microbiológico y puede ser utilizada en estudios epidemiológicos (Murray *et al.*, 2003).

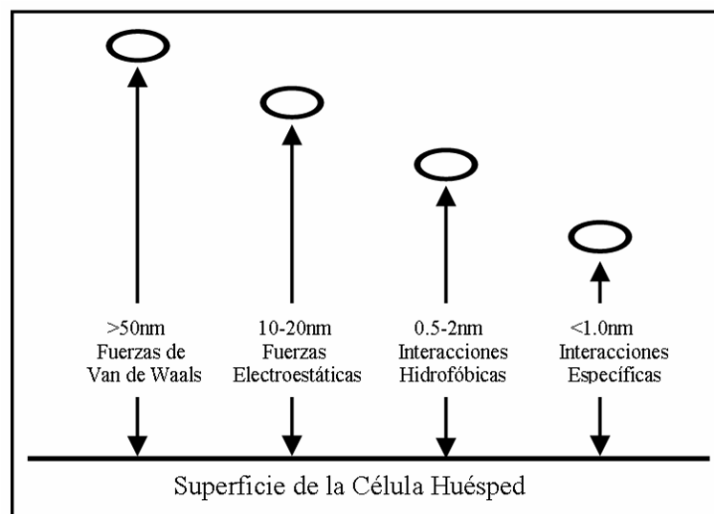
### **1.4.2 Mecanismos de Adhesión Bacteriana**

Como presentan Henderson, Wilson & McNab (2000), las bacterias suelen adherirse a diversas superficies, como células epiteliales y epidérmicas, mediante el uso de

sus componentes estructurales o la secreción de algunos productos (por ejemplo, mucinas). También, pueden unirse a células fagocíticas, dando como resultado la fagocitosis, uno de los mecanismos de defensa más importantes del sistema inmunológico, llevando a la destrucción del microorganismo. Sin embargo, esta unión no siempre es una ventaja para el huésped, ya que en ocasiones, muchas bacterias pueden sobrevivir y diseminarse en dichas células.

Existen dos facetas de la adhesión bacteriana que deben ser consideradas: las fuerzas físico-químicas envueltas en el proceso y la especificidad del microorganismo a determinada superficie.

Las fuerzas físico químicas involucradas en el proceso de adhesión bacteriana varían en función de la distancia a la que se encuentre la célula patógena de la célula huésped. A una longitud mayor de 50 nm, intervienen las fuerzas de Van der Waals, dando como resultado la mutua atracción de estos dipolos. Conforme la distancia disminuye (10-20 nm), las fuerzas electrostáticas se vuelven más significativas. Las interacciones hidrofóbicas entre la bacteria y la célula huésped pueden dar como resultado adhesión o puede existir suficiente proximidad para permitir la acción de interacciones específicas (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Fuerzas involucradas en la adhesión bacteriana a la célula huésped en función de la distancia que las separa (Basado en Henderson *et al.*, 2000).

En la mayor parte de los casos, un microorganismo en particular es capaz de adherirse a solo un tipo o una limitada variedad de superficies, esto explica el tropismo de la bacteria por determinado tejido y su habilidad de colonizarlo. Una serie de componentes de la superficie celular bacteriana (lipopolisacáridos, peptidoglicanos, proteínas de membrana, entre otros) afectan el comportamiento de las células eucarióticas. Sin embargo, la conformación de estas partículas y su sinergia con otras moléculas vecinas puede alterar dramáticamente su función.

La bacteria posee una variedad de estructuras que pueden estar involucradas en los mecanismos de adhesión, como el *pili*, cápsulas, flagelos, entre otras. Una variedad de moléculas en la superficie celular bacteriana puede funcionar como adhesinas y mediar la unión del microorganismo a la célula huésped. Entre esta infinidad de moléculas podemos encontrar al ácido lipotenoico, lectinas, proteínas de superficie, hidrofobinas, carbohidratos, lipopolisacáridos, enzimas, etc.

### **1.4.3 Métodos de Separación de Componentes de Sangre**

La obtención de muestras celulares apropiadas para la etapa analítica de un estudio demanda diversos procedimientos de separación, fraccionamiento y caracterización, basados usualmente en las propiedades de cada patrón celular existente en la muestra. La adecuada elección de uno de estos sistemas dependerá de muchos factores como: muestra de partida, grado de separación deseado, conservación de la viabilidad, operaciones y técnicas a aplicar posteriormente, entre otros.

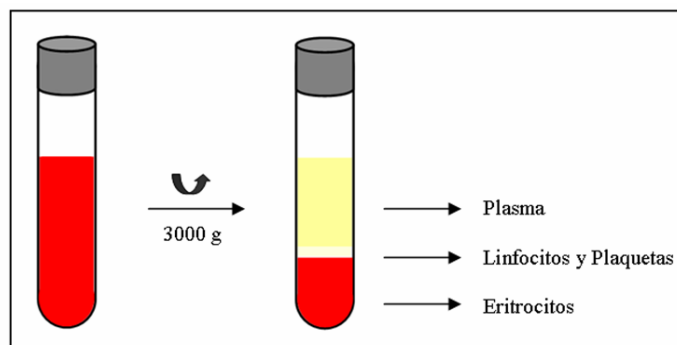
#### **1.4.3.1 Centrifugación Diferencial**

La separación celular puede hacerse por sedimentación, bajo la influencia de la gravedad terrestre, pero lo usual es acelerar el proceso incrementando numerosas veces esta fuerza mediante la centrifugación. Cuando esta técnica es aplicada en un medio líquido, la separación no solo depende de la fuerza centrífuga, sino de otros factores que varían la

sedimentación y que obedecen a las características de la célula (o partícula en general) y al medio (Cabrera y Herráez, 2001).

La disgregación de los diferentes componentes sanguíneos depende del peso específico de cada componente, la fuerza centrífuga relativa (velocidad), la duración de la centrifugación, la temperatura, la aceleración y desaceleración.

El diseño más simple es la separación por centrifugación con valores bajos de gravedad. No obstante, solo se pueden separar así células que muestren grandes diferencias de tamaño. Por ejemplo, en el caso de sangre con anticoagulante, a 200g los eritrocitos sedimentan en la zona inferior, los leucocitos aparecen en la interfase y queda como sobrenadante un plasma rico en plaquetas. También se puede preparar plasma pobre en plaquetas empleando mayor velocidad, alrededor de 3.000g (Figura 1.2) (Anaya *et al.*, 2005).



**Figura 1.2** Separación en función del tamaño y coeficiente de sedimentación de sangre periférica a 3000g (Autor).

El *buffy coat* o capa leuco-plaquetaria es la fracción de sangre centrifugada que contiene la mayoría de linfocitos. Esta capa es usualmente utilizada para la extracción de DNA a partir de sangre de mamíferos, debido a que los eritrocitos no contienen dicho ácido nucleico. Normalmente, es de color blanco y cuando la muestra contiene una gran cantidad de neutrófilos (componentes ricos en mieloperoxidasa) es verde.



## 1.4.4 Sistemas de Extracción de DNA

### 1.4.4.1 Generalidades

En los últimos años se ha promovido el uso de técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación para el diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias. Un método eficiente de extracción que produzca un DNA de alta calidad es crucial para estas reacciones (Rantakokko-Jalava *et al.*, 2002).

El aislamiento de DNA es una técnica básica en biología molecular. La calidad, cantidad e integridad del DNA afectan directamente a los resultados de las pruebas efectuadas a partir de éste. El propósito de esta técnica es separar el DNA de todos los componentes de la célula, dando como resultado una preparación homogénea que represente la información genética entera del organismo en estudio.

Los principales componentes celulares a ser removidos durante la purificación son RNA y proteínas. Las consideraciones a tomarse para un aislamiento efectivo de DNA son:

- El método debe garantizar la mínima cantidad de contaminantes, proteínas y RNA.
- La técnica debe ser eficiente; la mayoría del DNA celular debe ser aislado y purificado. No debe ser selectiva; todas las especies de DNA en la célula deben ser aisladas con la misma eficiencia.
- Las moléculas de DNA no deben ser alteradas física o químicamente.
- El DNA obtenido debe ser de alto peso molecular y debe presentar pocas rupturas de cadena simple.
- El método debe ser rápido y simple, debido a que este procedimiento es solo el principio de un experimento (Surzycki, 2000).

Debido a las bajas concentraciones de DNA de patógenos en muestras clínicas se requiere de procedimientos eficientes y reproducibles para aislar DNA de alta calidad antes

de la amplificación por PCR. Estos sistemas deben facilitar la producción de DNA susceptible de ser almacenado a largo plazo y con mínima contaminación cruzada (Coyne *et al.*, 2004).

Los obstáculos más comunes para obtener DNA de alto peso molecular son: la ruptura hidrodinámica y la degradación por DNAsas no específicas. Para evitar estos inconvenientes todas las soluciones deben contener inhibidores de DNAsas y todo el material a ser usado debe estar correctamente esterilizado (Surzycki, 2000).

Como afirma Smith, Diggle & Clarke (2003), los métodos de extracción manual son simples, fiables y adecuados para el procesamiento de un pequeño número de muestras. No obstante, conforme la demanda de pruebas moleculares aumenta, el uso de técnicas automatizadas se acrecienta.

Existen diversos métodos para aislamiento de DNA. Sin embargo, todos envuelven los siguientes pasos:

- Rompimiento celular.
- Remoción de proteínas y RNA.
- Concentración de DNA.
- Determinación de la pureza y cantidad de DNA.

Antes de proceder al aislamiento de DNA se debe suspender la muestra en un *buffer* de lisis. Esta solución tiene como objetivos mantener la estructura del DNA durante los pasos de ruptura y purificación, facilitar el aislamiento, inhibir a las enzimas degradadoras de DNA presentes en las células y prevenir la modificación química de las moléculas de DNA.

#### *1.4.4.1.1 Rompimiento celular*

La ruptura celular es uno de los pasos más importantes del aislamiento de DNA. Los métodos químicos, mecánicos y enzimáticos son los más empleados para este

cometido. Los medios mecánicos como sonicación, alta presión, entre otros, son poco usados para extracción de DNA, debido a que la aplicación de fuerza para romper las células hace que el DNA se segmente en pequeños fragmentos.

Las paredes celulares de plantas y bacterias no pueden ser rotas simplemente con la utilización de agentes químicos. Para tratar este tipo de células se debe hacer un tratamiento enzimático previo, para de esta manera hacer a la membrana más accesible a los detergentes. La enzima más utilizada para este propósito es lisozima.

#### *1.4.4.1.2 Remoción de proteínas y RNA*

Los ácidos nucleicos y las proteínas poseen distintas propiedades físicas, lo que facilita su disociación. Los ácidos nucleicos son moléculas predominantemente hidrofílicas, fácilmente solubles en agua. Por otro lado, las proteínas contienen varios residuos hidrofóbicos que las hacen parcialmente solubles en solventes orgánicos. Esta particularidad es la más usada en los métodos de deproteinización. Por otro lado, otras técnicas se basan en las propiedades de algunos compuestos o detergentes para formar complejos insolubles con proteínas o DNA, así como con otros componentes celulares.

Debido a que, el DNA, RNA y proteínas son moléculas biológicas diferentes, son reconocidas por diferentes enzimas digestivas. De aquí radica la utilización de proteasas para la remoción de proteínas y de ribonucleasas para la eliminación de RNA de preparaciones de DNA.

#### *1.4.4.1.3 Concentración de DNA*

Este paso de la purificación tiene dos propósitos. El primero, concentrar el DNA de alto peso molecular de las soluciones deproteinizadas y el segundo, remover nucleótidos, aminoácidos e impurezas de bajo peso molecular remanentes en la solución luego de la ruptura celular. Los métodos más usados para conseguir este objetivo incluyen la precipitación de DNA con alcoholes y diálisis.

#### 1.4.4.1.4 Determinación de la Concentración y Pureza del DNA

Una vez terminado el proceso de aislamiento de DNA se deben evaluar los resultados del proceso mediante:

- La determinación de la concentración de DNA.
- La evaluación de la pureza del DNA.
- La determinación del rendimiento.

Uno de los métodos más usados para la determinación de la concentración de DNA es la espectrofotometría ultravioleta. El DNA tiene su máxima y mínima absorbancia a 260 y 234 nm, respectivamente. Una absorbancia de 1.0 a 260 nm representa una concentración de 50 mg/mL de DNA. Las lecturas de absorbancia medidas a longitudes de onda diferentes de 260 nm son usadas para la determinación de pureza. Un espectro relevante para este propósito se encuentra entre 220 y 320 nm (Surzycki, 2000).

#### 1.4.4.2 Aislamiento de DNA Genómico Bacteriano

Según Surzycki (2000), un procedimiento de extracción a gran escala puede proporcionar de 200-300 µg de DNA cromosomal a partir de  $2-4 \times 10^{10}$  bacterias frescas o de 20-30 mg de biomasa congelada. No obstante, cuando el DNA bacteriano proviene de muestras clínicas, su probabilidad de recuperación se reduce conforme disminuye el volumen de muestra. Al mismo tiempo, el *background* genómico humano se convierte en una barrera física para la adhesión del DNA patógeno a diversas membranas o partículas empleadas para la purificación, haciendo el ensayo poco reproducible (Jordan & Durso, 2000).

Una de las técnicas más usadas es la clásica extracción con fenol. Esta ha sido exitosamente aplicada para preparar DNA para amplificación. Una de las ventajas de este método es la inactivación bacteriana, incluso de esporas de *Bacillus anthracis*. Desafortunadamente, el fenol es corrosivo, explosivo y tóxico. Si bien la extracción con

solventes orgánicos es muy económica, es relativamente laboriosa e impráctica para el procesamiento de un gran número de muestras. Además, el fenol residual del DNA extraído puede inhibir la amplificación.

Una variedad de sistemas comerciales de aislamiento de DNA se encuentran en el mercado para sobrellevar estos inconvenientes. Idealmente, los kits de extracción ofrecen reactivos estandarizados sometidos a control de calidad, con composiciones optimizadas para todos los pasos del proceso. Sin embargo, los kits están frecuentemente diseñados para el aislamiento de DNA humano a partir de tejidos o DNA microbiano a partir de suspensiones celulares, mas no para muestras clínicas, donde la cantidad de DNA humano supera enormemente a la del patógeno (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002).

Hendolin, Paulin & Ylikoski (2000) demostraron el problema de encontrar un procedimiento de extracción de DNA para muestras clínicas que pueda producir DNA de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con igual eficiencia. Las paredes celulares Gram-positivas pueden romperse eficientemente mediante el uso de enzimas degradadoras de peptidoglicanos. No obstante, si el objetivo es minimizar el uso de reactivos, se pueden emplear métodos de desintegración física.

La variabilidad de tipos de muestras clínicas incrementa la complejidad del diagnóstico bacteriano por PCR. Esto se ve reflejado en la dificultad de extrapolar los límites de detección determinados experimentalmente a la verdadera sensibilidad en muestras clínicas (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002).

## **1.4.5 PCR de Amplio Espectro**

### **1.4.5.1 Generalidades**

En microbiología clínica, la identificación oportuna del agente causante de determinada patología es fundamental al momento de proporcionar un acertado diagnóstico y tratamiento. Actualmente, la técnica más empleada para este cometido es la microbiología

convencional, la cual en muchas ocasiones necesita de mucho tiempo o no ofrece resultados satisfactorios (Rocidio y Mendoza, 2004).

El uso de técnicas moleculares ha hecho posible la identificación de DNA bacteriano en muestras con cultivo negativo de pacientes con sospecha de infección, lo que permite la confirmación de meningitis y septicemia, proveyendo una guía apropiada para la administración de antibióticos en el paciente (Corless *et al.*, 2000).

En microbiología molecular, la mayoría de ensayos están diseñados para la identificación de un solo microorganismo, aportando con alta especificidad y sensibilidad a la prueba, pero solo se detecta el patógeno que se está buscando. Por lo tanto, se necesitará de ensayos múltiples para encontrar el agente causal de la enfermedad. Los ensayos de amplio espectro basados en genes ribosomales han sido diseñados para sobrepasar esta limitación (Harris & Hartley, 2003).

La amplificación directa del DNA bacteriano a partir de muestras clínicas con PCR de amplio espectro es una ventaja para la determinación de patógenos en tejidos comúnmente estériles (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002). La PCR universal puede ayudar a diferenciar una infección bacteriana de una viral, confirmando la necesidad de tratamiento e influenciando en el manejo del paciente (Corless *et al.*, 2000).

Las técnicas moleculares han probado ser superiores al cultivo durante el tratamiento antimicrobiano y en la detección de bacterias con requerimientos de crecimiento inusuales. Sin embargo, una gran desventaja de estas técnicas en comparación al cultivo bacteriano es la dificultad de detectar especies Gram-positivas y *Mycobacterium*. Esto se asocia con problemas en el rompimiento de la pared celular bacteriana y la liberación del DNA.

Muchos investigadores sugieren la posibilidad de que el *background* genómico humano sea un factor inhibitorio durante la reacción de PCR. Un método óptimo de procesamiento de muestras, por lo tanto, deberá concentrar el DNA, fundamentalmente el

perteneciente al organismo blanco y eliminar los agentes inhibitorios usualmente presentes en los fluidos biológicos.

Al contrario que en los ensayos de PCR especie específicos, el posible organismo blanco de una prueba de PCR de amplio espectro puede ser altamente variable en su capacidad de resistir tratamientos físicos y químicos (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002). Un óptimo método de aislamiento de DNA genómico bacteriano debe lisar las paredes más resistentes (bacterias Gram-positivas) sin dañar indirectamente el DNA blanco purificado de especies más frágiles (bacterias Gram-negativas) (Coyne *et al.*, 2004).

Otro aspecto de riesgo dentro de la PCR de amplio espectro es la introducción de DNA bacteriano proveniente de reactivos empleados durante el procesamiento y amplificación de la muestra, los cuales pueden dar falsos positivos (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002). La dificultad de preparar DNA genómico absolutamente libre de DNA contaminante, acompañado de la alta sensibilidad de la PCR para amplificar estas trazas de DNA blanco, hacen de la contaminación un serio problema (Tanner *et al.*, 1998).

#### **1.4.5.2 Fundamentos de la PCR de Amplio Espectro**

La clasificación filogenética de microorganismos basada en las secuencias del rDNA ofrece un marco muy bien definido para el desarrollo de herramientas moleculares que aporten a la identificación microbiana.

Las moléculas de rDNA consisten en secuencias altamente conservadas, con variaciones que se concentran en zonas específicas (Rocidio y Mendoza, 2004). Este conocimiento junto con el desarrollo de la técnica de PCR ha brindado una gran ventaja para la identificación de patógenos. Cuando los *primers* de PCR se unen a estas regiones conservadas es posible la amplificación de genes de virtualmente cualquier bacteria. Durante los últimos años esta herramienta ha sido muy útil en la clasificación de bacterias difíciles de caracterizar por sus propiedades fenotípicas.

La identificación de *Bartonella henselae* como causa de la angiomatosis bacilar y la de *Tropheryma whippelii*, un bacilo no cultivable, como la de la enfermedad de Whipple son algunas de las primeras demostraciones del poder de este método.

La PCR de amplio espectro ha sido utilizada para amplificar genes bacterianos directamente de muestras clínicas, con el propósito de establecer la etiología de varias enfermedades bacterianas (Rantakokko-Jalava *et al.*, 2002).

### 1.4.5.3 16S rDNA PCR

El RNA ribosómico es la macromolécula más empleada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Este es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nt codificado por el gen *rrs*, conocido como 16S rDNA. Las secuencias altamente conservadas pertenecientes a este gen, contribuyen al diseño de *primers* para un ensayo de PCR amplio espectro. Además, un gran número de bacterias poseen múltiples copias de este gen, el cual contiene mutaciones en secciones específicas, las cuales permiten determinar el grupo filogenético al que pertenece el organismo en estudio (Kaufman & Fairchild, 2004).

Esta molécula es altamente utilizada debido a que:

- Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales.
- Su estructura y función se han mantenido a través del tiempo.
- Las mutaciones en este gen se dan en forma lenta, sin embargo contiene suficiente información para la diferenciación bacteriana.
- Su largo tamaño minimiza fluctuaciones estadísticas.
- La conservación de su estructura secundaria aporta información para el alineamiento preciso.
- Su fácil secuenciación acrecienta la información en bases de datos.



El método de amplificación bacteriana mediante 16S rDNA incluye tres etapas: la amplificación del gen a partir de la muestra apropiada, la determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón (secuenciación) y el análisis de secuencia.

La amplificación del 16S rDNA se logra mediante el uso de un termociclador y la técnica de PCR. El sustrato utilizado es normalmente DNA purificado a partir de cultivo puro. Alternativamente, el DNA puede ser obtenido a partir de muestras clínicas. Para la extracción del DNA bacteriano existen protocolos generales, pero pueden necesitarse modificaciones dependiendo de la bacteria en análisis.

Rocidio & Mendoza (2004) señalan que cuando se pretende amplificar el 16S rDNA prácticamente completo se utilizan *primers* diseñados en base a las secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen. Sin embargo, una identificación precisa no requiere de la amplificación del gen completo. Usualmente se utilizan oligonucleótidos que permitan la amplificación de fragmentos de menor tamaño correspondientes al extremo 5' del gen. En cualquier caso se debe comprobar el producto mediante electroforesis en gel de agarosa, para asegurar la presencia de un único fragmento del tamaño adecuado.

A medida que los recursos técnicos aumenten, el costo del sistema ADNr 16S será más competitivo, encontrando una más amplia aplicación dentro del laboratorio clínico (Makhoul, 2005).

Como describe Corless *et al.* (2000), la implementación de una PCR universal 16S rDNA puede ser obstaculizada por problemas derivados de la contaminación de reactivos que provengan de una fuente bacteriana, como en el caso de la *Taq* polimerasa y la uracil-*N*-glicosilasa. Durante la producción enzimática, los ácidos nucleicos, incluyendo las secuencias de DNA ribosomal, son copurificados. La *Taq* polimerasa puede contener DNA contaminante como resultado de su manufactura y su incompleta purificación. Muchos investigadores han tratado de minimizar este problema mediante el uso de tratamientos

físicos, químicos y enzimáticos. Sin embargo, estas estrategias bajan la sensibilidad de detección.

### **1.5 Sistema de Hipótesis o Pregunta de Investigación**

La eliminación del DNA genómico humano, presente en leucocitos, facilita el diagnóstico bacteriano por PCR, anulando la interferencia que éste produce en la reacción y permitiendo determinar experimentalmente los verdaderos límites de detección del ensayo a partir de muestras clínicas.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

La Escuela Superior Politécnica del Ejército, a través de su Vicerrectorado de Investigaciones, brindó el financiamiento para esta investigación, bajo el proyecto “*Diseño y Evaluación de un Sistema de Alta Capacidad para Aislamiento de DNA para Análisis de Ácidos Nucleicos de Patógenos en Muestras Clínicas*”, luego de haber sido seleccionado en concurso interno en el año 2007.

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Humana del Departamento de Ciencias de la Vida de la ESPE bajo la dirección del Dr. Marcelo Grijalva y la Dra. Patricia Jiménez.

Además, se contó con la ayuda del Laboratorio de Microbiología del Hospital Carlos Andrade Marín, el cual proveyó los cultivos bacterianos puros para este estudio y del Hospital de Niños Baca Ortiz, el cual proporcionó las muestras clínicas necesarias para la evaluación del sistema desarrollado.

### **2.2 Zona de Estudio**

El presente proyecto se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología Humana del Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Superior Politécnica del Ejército, ubicado en la ciudad de Sangolquí, provincia de Pichincha.

Las muestras clínicas empleadas para la evaluación de este estudio pertenecieron a pacientes atendidos en el Hospital de Niños Baca Ortiz de la ciudad de Quito.

## **2.3 Periodo de Tiempo de Investigación**

El 2 de abril del 2007 se dio inicio a esta investigación, la cual finalizó el 7 de febrero del 2008.

## **2.4 Diseño**

Este es un estudio de tipo cuasi-experimental con intervención a nivel de muestras biológicas y análisis post-intervención.

## **2.5 Procedimientos**

### **2.5.1 Preparación de Cultivos Puros**

#### **2.5.1.1 Cultivo Bacteriano en Agar**

Se realizaron siembras microbiológicas en agar a partir de cultivos bacterianos puros de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, con el fin de obtener el volumen de bacterias necesario para la transferencia a medio de cultivo líquido.

Los medios de cultivo empleados fueron escogidos en base a los requerimientos de crecimiento de cada bacteria. Luego de la revisión bibliográfica pertinente, se decidió emplear LEVINE EMB Agar (*Escherichia coli*), Manitol Salt Phenol-Red Agar (*Staphylococcus aureus*) y Agar Sangre (*Enterococcus faecalis*) (Merck, 2000).

Cada uno de los medios se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se autoclavó por 15 minutos a 121°C, se dispensó en cajas petri y se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización.

La inoculación se realizó usando un asa bacteriológica desechable estéril, empleando el método de siembra por extensión. El ensayo se hizo por duplicado. Posteriormente, las cajas inoculadas fueron llevadas a incubación a 37°C durante 24h.

### **2.5.1.2 Cultivo Bacteriano en Medio Líquido**

Para esta fase se decidió emplear un medio de cultivo universal. Luego del análisis bibliográfico se seleccionó al LB Broth (Surzycki, 2000).

El medio se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se dispensó 10 mL del mismo en tubos de vidrio con tapa que se autoclavaron por 15 minutos a 121°C, y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

La siembra se realizó usando un asa bacteriológica desechable estéril, inoculando tres asas colmadas de bacterias (aproximadamente 150 µL), tomadas de los cultivos bacterianos en agar, en cada tubo de ensayo. El experimento se hizo por duplicado. Posteriormente, los tubos inoculados fueron llevados a incubación con agitación a 37°C durante 18h.

## **2.5.2 Diluciones Seriadadas**

### **2.5.2.1 Preparación de Diluciones Seriadadas**

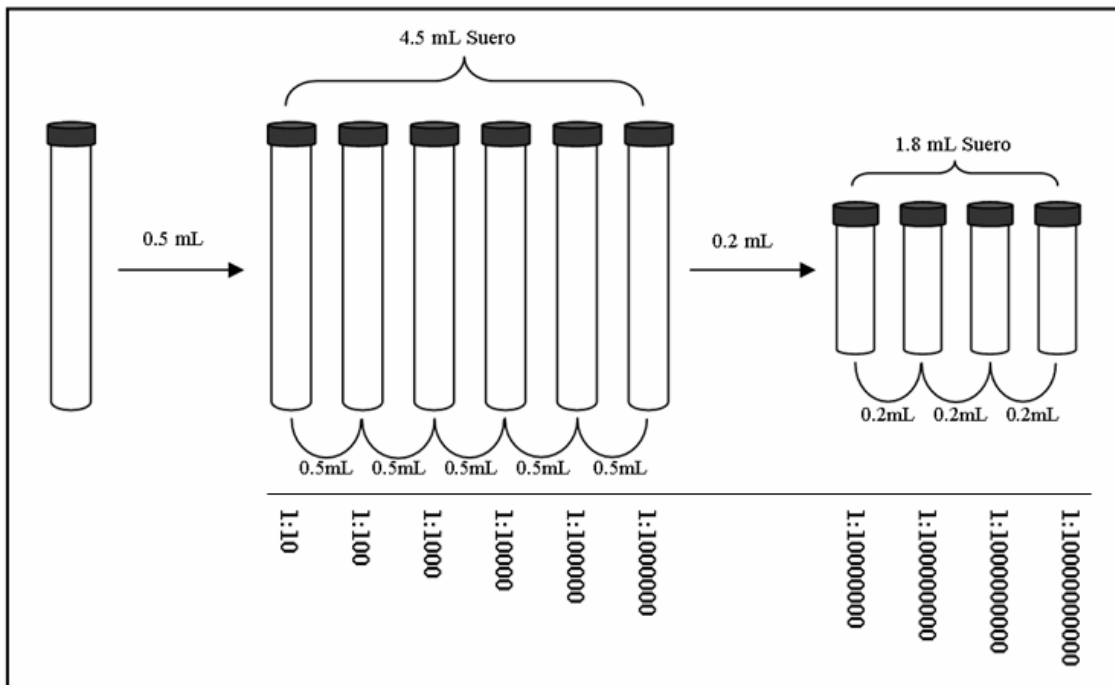
Las diluciones seriadas se efectuaron a partir de los cultivos puros obtenidos en el paso descrito previamente. Durante la experimentación se emplearon dos sistemas de dilución de muestras, los cuales fueron valorados mediante un ensayo de conteo de unidades formadoras de colonias (CFU).

Los dos sistemas consistieron en una serie de diez diluciones en suero fisiológico estéril. Se dispensó el suero fisiológico en una decena de tubos y posteriormente se procedió a su esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos.

### 2.5.2.1.1 Procedimiento del Sistema 1

Para esta técnica se requirió de seis y cuatro tubos con 4.5 y 1.8 mL de suero fisiológico respectivamente. El procedimiento se detalla a continuación (Figura 2.1).

1. Se toma un tubo de cultivo puro y se agita en un vórtex durante 30 segundos.
2. Se toman 0.5 mL del cultivo puro y se colocan en un tubo con 4.5 mL de suero fisiológico (dilución 1:10).
3. Se agita la dilución preparada en un vórtex durante 30 segundos.
4. Se toman 0.5 mL de la dilución y se colocan en un tubo con 4.5 mL de suero fisiológico (dilución 1:100).
5. Se repite el procedimiento hasta el sexto tubo (dilución 1: 1000000).
6. Se toman 0.2 mL de la dilución y se colocan en un tubo con 1.8 mL de suero fisiológico (dilución 1:100000000).
7. Se repite el procedimiento hasta el cuarto tubo (dilución 1:100000000000).



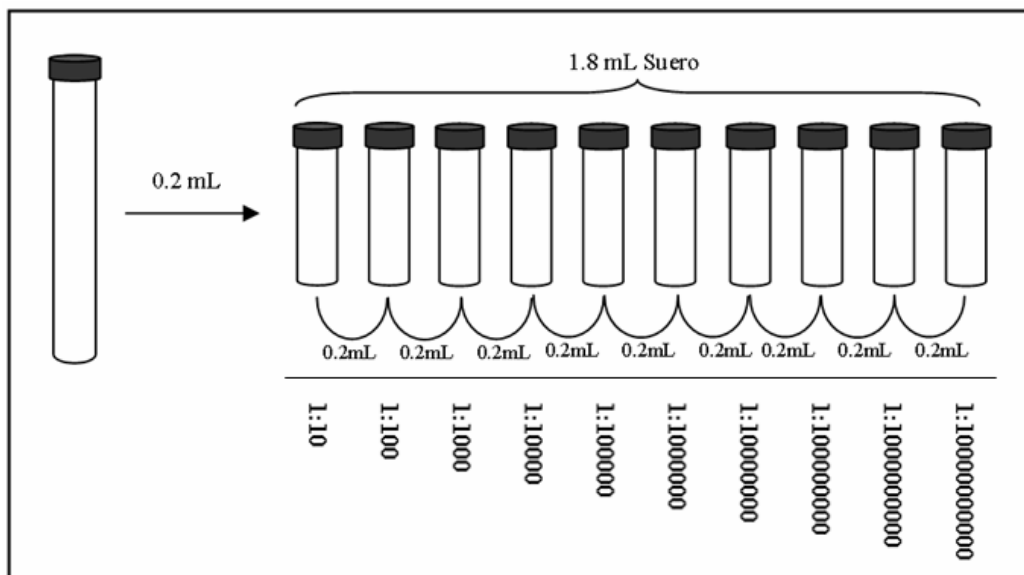
**Figura 2.1** Preparación de diluciones seriadas mediante el sistema 1 (Autor).

### 2.5.2.1.2 Procedimiento del Sistema 2

Para esta técnica se requirió de diez tubos con 1.8 mL de suero fisiológico para la etapa de prueba y diez tubos de 4.5 mL para la etapa final. El procedimiento se detalla a continuación (Figura 2.2).

1. Se toma un tubo de cultivo puro y se agita en un vórtex durante 30 segundos.
2. Se toman 0.2 mL del cultivo puro y se colocan en un tubo con 1.8 mL de suero fisiológico (dilución 1:10).
3. Se agita la dilución preparada en un vórtex durante 30 segundos.
4. Se toman 0.2 mL de la dilución y se colocan en un tubo con 1.8 mL de suero fisiológico (dilución 1:100).
5. Se repite el procedimiento hasta el décimo tubo (dilución 1:10000000000).

Para la etapa final se emplea el mismo procedimiento variando los volúmenes de 0.2 y 1.8 mL a 0.5 y 4.5 mL respectivamente.



**Figura 2.2** Preparación de diluciones seriadas mediante el sistema 2 (Autor).

### 2.5.2.2 Siembra de Diluciones Seriadas

Los medios de cultivo utilizados fueron elegidos en base a los requerimientos de crecimiento de cada bacteria. Luego de una investigación bibliográfica, se resolvió emplear LEVINE EMB Agar (*Escherichia coli*), Manitol Salt Phenol-Red Agar (*Staphylococcus aureus*) y Agar Sangre (*Enterococcus faecalis*) (Merck, 2000).

Cada uno de los medios se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se autoclavó por 15 minutos a 121°C, se dispensó en cajas tripetri y se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización.

Para la inoculación se usaron dos sistemas, para los cuales se escogieron de 3 a 5 tubos de las diluciones seriadas preparadas anteriormente y se procedió como se detalla a continuación.

#### 2.5.2.2.1 Procedimiento del Sistema A

Para esta técnica se requirió de tres a cinco triángulos de Drigalski previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. El procedimiento se detalla a continuación.

1. Se toma un tubo de dilución y se agita en un vórtex durante 30 segundos.
2. Se toma con una micropipeta un volumen conocido de la dilución (100 o 33.3  $\mu$ L) y se coloca sobre el agar.
3. Se extiende homogéneamente la alícuota con un triángulo de Drigalski.
4. Se repite el procedimiento por triplicado y se sella la caja petri con parafilm.
5. Se lleva las cajas a incubación a 37°C por 24 horas.

#### 2.5.2.2.2 Procedimiento del Sistema B

Para este método se requirió de un asa calibrada a 0.01 mL previamente esterilizada mediante su exposición directa al fuego. El sistema se detalla a continuación.



1. Se toma un tubo de dilución y se agita en un vórtex durante 30 segundos.
2. Se toma con el asa calibrada una alícuota (0.01 mL).
3. Se extiende la alícuota por estrías.
4. Se repite el procedimiento por triplicado y se sella la caja petri con parafilm.
5. Se lleva las cajas a incubación a 37°C por 24 horas.

### **2.5.2.3 Conteo de la Siembra de Diluciones Seriadas**

Luego del período de incubación, se procede a la contabilización de CFU por caja. El conteo se lleva a cabo en un Contador de Colonias. Los datos se reportan en una hoja de resultados.

## **2.5.3 Muestras Artificiales**

### **2.5.3.1 Preparación de Muestras Artificiales**

El propósito de este proyecto, como se había expuesto antes, es desarrollar un sistema de extracción de DNA de patógenos a partir de sangre periférica, por lo cual fue necesario construir muestras infectadas con una cantidad de bacterias conocida para el posterior análisis de la técnica. Este cometido se logró mediante la incorporación de un volumen determinado de dilución seriada de cultivo bacteriano en un volumen establecido de sangre completa. El procedimiento de la preparación de muestras artificiales se detalla seguidamente.

#### *2.5.3.1.1 Obtención de Sangre Venosa con Vacutainer*

Para la obtención de sangre periférica se trabajó con voluntarios. La toma de muestras fue hecha en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Escuela Superior Politécnica del Ejército. El procedimiento empleado para cada uno de los candidatos se detalla a continuación.

1. Se rotula previamente los tubos donde se colectaron las muestras.
2. Se elige una vena de buen calibre, de preferencia la mediana cefálica, mirándola y verificándola al tacto.
3. Se desinfecta la zona con torunda algodón-álcohol antiséptico para lo cual se emplea el método circular.
4. Se aplica un torniquete con nudo corredizo a una distancia de 8 a 10 cm del sitio de extracción. Concomitantemente, se pide al paciente que realice puño.
5. Se prepara una cápsula con una aguja de punción con dos extremos.
6. Se toma la cápsula con los dedos índice y pulgar descansando el dedo medio en el antebrazo del paciente, formando un ángulo de 45 grados con la horizontal.
7. Se retira el protector de la aguja.
8. Se atraviesa firmemente la piel y se introduce la aguja con el bisel hacia arriba por una distancia aproximada de 1 a 1.5 centímetros del lumen de la vena. En este instante el tubo vacutainer con anticoagulante (EDTA) debe traspasar por el extremo de la aguja que se encuentra dentro de la cápsula.
9. Se espera hasta que el tubo se llene con la cantidad deseada de sangre, se retira el tubo y se coloca otro; se quita el torniquete y se pide al paciente que abra el puño.
10. Se coloca una torunda de algodón-álcohol antiséptico en el sitio de la extracción y se retira lentamente la aguja. Se realiza una ligera presión para favorecer la hemostasia.

#### *2.5.3.1.2 Proceso para Elaboración de Muestras Artificiales*

Las muestras artificiales se prepararon formando una disolución de 1:10 de la dilución seriada elegida en sangre completa. En la fase preliminar se elaboraron 2 mL de muestra artificial, mientras que en la fase final del proyecto se escaló la preparación a 5 mL. El proceso empleado se explica seguidamente.

1. Se toma un tubo de dilución y se agita en un vórtex durante 30 segundos.

2. Se toma con una micropipeta 0.2 mL de la dilución (o 0.5 mL para el escalado) y se colocan en un tubo con 1.8 mL (o 4.5 mL para el escalado) de sangre periférica completa (dilución 1:10).
3. Se agita la dilución preparada suavemente en un vórtex durante 30 segundos.
4. El proceso se realizó por duplicado.

### **2.5.3.2 Siembra de Muestras Artificiales**

Se resolvió emplear LEVINE EMB Agar para *Escherichia coli*, Manitol Salt Phenol-Red Agar para *Staphylococcus aureus* y Agar Sangre para *Enterococcus faecalis*, como ya se describió anteriormente.

Cada uno de los medios se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se autoclavó por 15 minutos a 121°C, se dispensó en cajas tripetri y se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización.

Para la inoculación se usaron dos sistemas, para los cuales se emplearon 3 muestras artificiales preparadas a partir de 3 diluciones seriadas diferentes y se procedió como se detalla.

#### *2.5.3.2.1 Procedimiento del Sistema X*

Para esta técnica se requirió de tres triángulos de Drigalski previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. De cada duplicado de muestras artificiales se escogió un tubo al azar.

1. Se toma el tubo de muestra artificial escogido y se agita suavemente en un vórtex durante 30 segundos.
2. Se toma con una micropipeta 33.3 µL de la muestra artificial y se coloca sobre el agar.
3. Se extiende cuidadosamente la alícuota con un triángulo de Drigalski.

4. Se repite el procedimiento por triplicado y se sella la caja petri con parafilm.
5. Se repite el procedimiento con las 2 restantes muestras artificiales.
6. Se lleva las cajas a incubación a 37°C por 24 horas.

#### *2.5.3.2.2 Procedimiento del Sistema Y*

Para este método se requirió de un asa calibrada a 0.01 mL previamente esterilizada mediante su exposición directa al fuego. El sistema se detalla a continuación.

1. Se toma el tubo de muestra artificial escogido y se agita suavemente en un vórtex durante 30 segundos.
2. Se toma con el asa calibrada una alícuota (0.01 mL).
3. Se extiende la alícuota por estrías.
4. Se repite el procedimiento por triplicado y se sella la caja petri con parafilm.
5. Se repite el procedimiento con las 2 restantes muestras artificiales.
6. Se lleva las cajas a incubación a 37°C por 24 horas.

#### **2.5.3.3 Conteo de CFU de la Siembra de Muestras Artificiales**

Luego del período de incubación, se procede a la contabilización de CFU por caja. El conteo se lleva a cabo en un Contador de Colonias. Los datos se reportan en una hoja de resultados.

#### **2.5.3.4 Análisis Microscópico de Muestras Artificiales**

Para el análisis microscópico se usaron dos técnicas de conteo de células bacterianas: recuento en cámara de Neubauer y recuento por campos.

##### *2.5.3.4.1 Técnica de Recuento en Cámara de Neubauer*

La cámara de recuento es un instrumento especial de precisión. Se emplea para contabilizar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Estas cámaras

se usan esencialmente para el análisis de sangre y conteo de pulgadas en el licor. Pero las cámaras sirven también para el conteo de bacterias y esporas del moho.

La cámara de recuento de Neubauer es una placa de base rectangular y gruesa de vidrio óptico especial, del tamaño de un porta-objetos, en el tercio medio se hallan cuatro ranuras longitudinales, que transcurren en paralelo con respecto a los laterales cortos. La superficie del puente central es más honda que los dos puentes exteriores. En el puente central (fondo de la cámara) están grabadas las redes de conteo. Cuando se sitúa un cubreobjeto sobre los puentes exteriores, entre la cara inferior del cubreobjeto y el puente central de la cámara de conteo se origina una ranura que se llenará luego de la alimentación por capilaridad (Marienfeld, 2007).

La cámara de recuento de Neubauer fue alimentada con cada una de las muestras artificiales y se procedió a su observación en el microscopio. El proceso empleado se presenta inmediatamente.

1. Los puentes exteriores de la cámara se humedecen con agua destilada y luego se coloca el cubreobjeto ejerciendo una suave presión desde delante sobre la cámara de conteo. La formación de líneas de interferencia (anillos de Newton) entre los puentes exteriores y el cubreobjeto indica que el cubreobjeto ha sido correctamente colocado.
2. Se toma el tubo de muestra artificial escogido y se agita suavemente en un vórtex durante 30 segundos.
3. Se toma con una pipeta estéril una pequeña alícuota de la muestra artificial y se la mantiene inclinada hasta que se haya formado una pequeña gota en la punta de la misma.
4. Esta gota se sitúa en el punto entre el cubreobjeto y la cámara de conteo. Por capilaridad se llena la hendidura entre el cubreobjeto y el fondo de la cámara.
5. Antes de que la solución de sangre pueda recargarse en los bordes de la cámara, deberá haberse retirado hacia un lado la punta de la pipeta.

6. Se lleva la cámara al microscopio y se enfoca a la red de conteo. Se debe tomar en cuenta que el diagrama del condensador deberá estar cerrado en gran parte.
7. Se realiza el conteo iniciando desde la parte superior de los cuadros menores que están dentro del cuadro grande central de 1 x 1 mm y se continúa hasta la base. Si las células tocan los límites de los cuadros menores 0.2 x 0.2 mm, deben contarse únicamente las que toquen la parte superior y lado derecho del cuadro. Si las células tocan la parte inferior o la parte izquierda, no se cuentan. Si las células son demasiadas para contarse, la suspensión debe diluirse.

#### *2.5.3.4.2 Técnica de Recuento por Campos*

Para este procedimiento se debe preparar un frotis de la muestra artificial sobre una lámina porta objetos, la cual deberá ser correctamente coloreada mediante el método de tinción Gram. Una vez preparadas las láminas se puede proceder a la visualización de las mismas en el microscopio óptico con la lente de 40X. El conteo se realiza por campos de enfoque y se reporta el número de bacterias observadas en 10 de ellos. Los procedimientos empleados para la preparación del frotis, la tinción Gram y el conteo se describen a continuación.

##### *2.5.3.4.2.1 Preparación del frotis*

Para este ensayo se utilizó la técnica de frotis hematológico, la cual se describe en seguida.

1. Se toma dos láminas porta objetos y se las limpia cuidadosamente.
2. Se toma el tubo de muestra artificial escogido y se agita suavemente en un vórtex durante 30 segundos.
3. Se toma una pequeña gota de muestra artificial con una pipeta y se la coloca en la parte superior de una de las láminas porta objetos.
4. Se homogeniza la gota con la otra lamina porta objetos.
5. Se extiende la muestra con la otra lámina porta objetos con una inclinación de 30°.

6. Se fija la muestra esperando que seque al aire libre o ayudándose con la llama de un mechero, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo, puesto que el calor excesivo puede modificar la morfología celular de las bacterias a observar.

#### *2.5.3.4.2.2 Tinción Gram*

Para este paso se requiere de violeta cristal, lugol, decolorante y safranina, así como de un cronómetro. Esta coloración se lleva a cabo como se explica a continuación.

1. Se cubre la lámina por completo utilizando una cantidad suficiente de violeta cristal sobre la muestra. Se deja actuar al colorante por 1 minuto.
2. Se enjuaga la lámina con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua no debe caer directamente sobre la muestra.
3. Se cubre la lámina por completo utilizando una cantidad suficiente de mordiente yodo o lugol durante 1 minuto.
4. Se enjuaga la lámina con agua corriente.
5. Se decolora con etanol al 75 %, etanol al 95 %, acetona o alcohol-acetona, hasta que ya no escurra más líquido azul.
6. Se enjuaga la lámina con agua corriente.
7. Se cubre la lámina por completo utilizando una cantidad suficiente de colorante de contraste, como por ejemplo la safranina, durante 1 minuto.
8. Se enjuaga la lámina con agua corriente, se escurre el agua sobrante y se seca la placa.

#### *2.5.3.4.2.3 Conteo por Campos*

En esta fase las láminas preparadas fueron vistas al microscopio. Se utilizó aceite de inmersión y la lente de 40X para el enfoque de los campos de conteo. La contabilización se realizó en 10 campos diferentes y los recuentos se reportaron en una hoja de resultados.

#### **2.5.4 Técnica de Centrifugación Diferencial**

Se probó la técnica de centrifugación diferencial (CD) con el fin de eliminar el DNA humano presente en leucocitos mediante la remoción del plasma y la capa leuco-plaquetaria. Este tratamiento fue implementado a la muestra antes de la extracción de DNA y fue evaluado en comparación a muestras que no lo recibieron.

Para un correcto funcionamiento de la técnica se hizo un ensayo preliminar para evaluar el volumen de muestra necesario para el experimento. Posteriormente, se procesó con este método a una de las muestras artificiales de cada una de las dupletas, mientras que la otra se trataba como un control siguiendo el procedimiento de siembra de muestras artificiales.

##### **2.5.4.1 Determinación de Volumen de Muestra**

Se realizó un ensayo preliminar dispensando tres tubos de polipropileno con sangre completa anticoagulada con volúmenes de 2, 3 y 5 mL. Los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Luego de la centrifugación se procedió a observar qué tubo presentaba una capa de *buffy coat* representativa para la experimentación.

##### **2.5.4.2 Centrifugación Diferencial de Muestras Artificiales**

Los tubos escogidos para el procesamiento con CD fueron sometidos a centrifugación por 10 minutos a 3000 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a descartar el plasma y la capa leuco-plaquetaria de cada una de las muestras. Las muestras tratadas fueron posteriormente evaluadas mediante conteo de CFU.

##### **2.5.4.3 Siembra de Muestras Artificiales Sometidas a CD**

Se resolvió emplear LEVINE EMB Agar para *Escherichia coli*, Manitol Salt Phenol-Red Agar para *Staphylococcus aureus* y Agar Sangre para *Enterococcus faecalis*, como ya se describió anteriormente.



Cada uno de los medios se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se autoclavó por 15 minutos a 121°C, se dispensó en cajas tripetri y se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización.

Para esta etapa se requirió de un asa calibrada a 0.01 mL previamente esterilizada mediante su exposición directa al fuego. El sistema se detalla a continuación.

1. Se toma el tubo de muestra artificial sometido a centrifugación diferencial y se agita suavemente en un vórtex durante 30 segundos.
2. Se toma con el asa calibrada una alícuota (0.01 mL).
3. Se extiende la alícuota por estrías.
4. Se repite el procedimiento por triplicado y se sella la caja petri con parafilm.
5. Se repite el procedimiento con las 2 restantes muestras artificiales.
6. Se lleva las cajas a incubación a 37°C por 24 horas.

#### **2.5.4.4 Conteo de CFU de Siembra de Muestras Artificiales Sometidas a CD**

Luego del período de incubación, se procede a la contabilización de CFU por caja. El conteo se lleva a cabo en un Contador de Colonias. Los datos se reportan en una hoja de resultados.

#### **2.5.5 Extracción de DNA**

Se probaron algunos protocolos de extracción de DNA que probaron ser eficientes para el aislamiento de DNA de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La elección del mejor sistema de purificación de DNA dependió de su eficiencia para la extracción simultánea de ácido nucleico bacteriano y humano.

Todos los sistemas empleados se basan en el uso de un cóctel lítico para la destrucción de la pared celular bacteriana. Los protocolos empleados se detallan a

continuación. La verificación de la existencia de DNA en las muestras se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

### **2.5.5.1 Protocolo Manual para Aislamiento de DNA Genómico Bacteriano**

Este protocolo fue empleado para el aislamiento de DNA genómico bacteriano a partir de cultivos puros de las bacterias empleadas en el estudio.

1. Se coloca el tubo con la suspensión celular a temperatura ambiente hasta que se haya descongelado.
2. Se centrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm y se desecha con cuidado el sobrenadante.
3. Se adiciona al tubo 1 mL de buffer TE pH 8 y se incuba a 80°C en termobloque por 60 minutos dando un toque de vórtex cada 15 minutos.
4. Se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente y se luego se añaden 20 µL de solución I (lisozima 15 mg/mL), 20 µl de solución II (lisoestafina 1.8 mg/mL) y 20 µL de solución III (lítica 5U/µL).
5. Se agita la suspensión en un vórtex y se incuba a 37°C por 60 minutos.
6. Se añade después 76 µL de solución B, la cual se obtiene mezclando 700 µL de solución de SDS al 10% con 60 µL de solución de proteinasa K. Se agita la mezcla usando un vórtex y se incuba la suspensión a 65°C por 10 minutos.
7. Se adiciona 100 µL de NaCl 5M y se agita en vórtex. Luego se añaden 80 µL de solución CTAB/NaCl y nuevamente se agita vigorosamente los contenidos del tubo en el vórtex. Se incuba la suspensión resultante a 65°C por 10 minutos.
8. Se adicionan 700 µL de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se mezcla en el vórtex unos 15 segundos y luego se centrifuga el tubo eppendorf a 14000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
9. La fase superior se remueve con una pipeta (teniendo cuidado de no perturbar o absorber la fase blanquecina intermedia) a un nuevo tubo de 1.5 mL. Se completa el volumen con isopropanol. Se cierra el tubo y se lo invierte varias veces para mezclar el contenido. Se incuba al menos 30 minutos a -20°C.

10. Los ácidos nucleicos se colectan por centrifugación a 14000 rpm por 30 minutos. Se descarta cuidadosamente el sobrenadante y se añade aproximadamente 1 mL de etanol frío al 70% (v/v) con el cual se lava el *pellet*. Nuevamente se colectan los ácidos nucleicos por centrifugación a 14000 rpm por 15 minutos.
11. Se descarta el sobrenadante con cuidado y se evapora el etanol restante dejando reposar los tubos abiertos 30 minutos dentro de la cabina de bioseguridad para evitar contaminación.
12. Se disuelve el *pellet* en 100  $\mu$ L de buffer TE pH 8 cuidando de que todo el precipitado se disuelva.
13. La solución de ácidos nucleicos puede ser almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.5.5.2 Protocolo Manual Modificado para Aislamiento de DNA Genómico Bacteriano a partir de Muestras de Sangre**

Este protocolo fue modificado para el aislamiento de DNA genómico bacteriano a partir de muestras de sangre periférica.

1. Se coloca 5 mL de muestra de sangre con EDTA en un tubo de polipropileno de 15 mL y se lo congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
2. Se saca el tubo del congelador y se le añade directamente 5 mL de agua destilada estéril.
3. Se coloca en un agitador mientras aún está congelado y se agita por 5 minutos, comprobando la lisis de eritrocitos.
4. Se centrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm y se desecha con cuidado el sobrenadante.
5. Se adiciona al tubo 1 mL de buffer TE pH 8 y se incuba a  $80^{\circ}\text{C}$  en termobloque por 60 minutos dando un toque de vórtex cada 15 minutos.
6. Se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente y luego se añaden 20  $\mu$ L de solución I (lisozima 15 mg/mL), 20  $\mu$ L de solución II (lisoestafina 1.8 mg/mL) y 20  $\mu$ L de solución III (liticasa 5U/ $\mu$ L).
7. Se agita la suspensión en un vórtex y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos.

8. Se añade después 76  $\mu\text{L}$  de solución B, la cual se obtiene mezclando 700  $\mu\text{L}$  de solución de SDS al 10% con 60  $\mu\text{L}$  de solución de proteinasa K. Se agita intensamente la mezcla usando un vórtex y se incuba la suspensión a 65°C por 10 minutos.
9. Se adiciona 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M y se agita en vórtex. Luego se añaden 80  $\mu\text{L}$  de solución CTAB/NaCl y nuevamente se agita vigorosamente los contenidos del tubo en el vórtex. Se incuba la suspensión resultante a 65°C por 10 minutos.
10. Se adicionan 700  $\mu\text{L}$  de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se mezcla en el vórtex unos 15 segundos y luego se centrifuga el tubo eppendorf a 14000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
11. La fase superior se remueve con una pipeta (teniendo cuidado de no perturbar o absorber la fase blanquecina intermedia) a un nuevo tubo de 1.5 mL. Se completa el volumen con isopropanol. Se cierra el tubo y se lo invierte varias veces para mezclar el contenido. Se incuba al menos 30 minutos a -20°C.
12. Los ácidos nucleicos se colectan por centrifugación a 14000 rpm por 30 minutos. Se descarta cuidadosamente el sobrenadante y se añade aproximadamente 1 mL de etanol frío al 70% (v/v) con el cual se lava el *pellet*.
13. Nuevamente se colectan los ácidos nucleicos por centrifugación a 14000 rpm por 15 minutos.
14. Se descarta el sobrenadante con cuidado y se evapora el etanol restante dejando reposar los tubos abiertos 30 minutos dentro de la cabina de bioseguridad para evitar contaminación.
15. Se disuelve el *pellet* en 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE pH 8 cuidando de que todo el precipitado se disuelva.
16. La solución de ácidos nucleicos puede ser almacenada a -20°C.

### **2.5.5.3 Protocolo Modificado para Aislamiento de DNA Genómico Bacteriano a partir de Sangre (QIAGEN DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Alemania)**

Este protocolo fue empleado para el aislamiento de DNA genómico bacteriano y humano a partir de muestras de sangre periférica.

1. Se coloca 500  $\mu\text{L}$  de muestra de sangre con EDTA en un tubo de 1.5 mL y se lo congela a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
2. Se saca el tubo del congelador y se le añade directamente 1000  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril.
3. Se coloca en un agitador mientras aún está congelado y se agita por 5 minutos, comprobando la lisis de eritrocitos.
4. Se centrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm y se desecha con cuidado el sobrenadante.
5. Se repiten los pasos del 1 al 4.
6. Se adiciona al tubo 120  $\mu\text{L}$  de *buffer* AL, 20  $\mu\text{L}$  de solución I (lisozima 15 mg/mL), 20  $\mu\text{L}$  de solución II (lisoestafina 1.8 mg/mL) y 20  $\mu\text{L}$  de solución III (liticasa 5U/ $\mu\text{L}$ ) y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  en un termobloque por 60 minutos con agitación constante.
7. Se adiciona 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K o proteasa QUIAGEN, se agita la mezcla en un vórtex y se incuba la suspensión a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos con agitación constante.
8. Se añade 200  $\mu\text{L}$  de *buffer* AL, se mezcla en un vórtex por 15 segundos y se incuba a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.
9. Se adiciona 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% y se mezcla en un vórtex por 15 segundos.
10. Se coloca la mezcla (incluido el precipitado) en la columna QIAmp conectada a un tubo colector de 2 mL, sin tocar los bordes. Se cierra la tapa y se centrifuga por 1 minuto a 8000 rpm. Se descarta el tubo colector con el filtrado y se conecta un nuevo tubo colector de 2 mL a la columna.
11. Se adiciona 500  $\mu\text{L}$  de *buffer* AW1 en la columna QIAmp conectada a un tubo colector de 2 mL, sin tocar los bordes. Se cierra la tapa y se centrifuga por 1 minuto a 8000 rpm. Se descarta el tubo colector con el filtrado y se conecta un nuevo tubo colector de 2 mL a la columna.
12. Se adiciona 500  $\mu\text{L}$  de *buffer* AW2 en la columna QIAmp conectada a un tubo colector de 2 mL, sin tocar los bordes. Se cierra la tapa y se centrifuga por 3 minutos a 14000 rpm. Se descarta el tubo colector con el filtrado y se conecta un nuevo tubo de 1.5 mL a la columna.

13. Se adiciona 150  $\mu$ L de *buffer* AE en la columna QIAmp conectada a un tubo de 1.5 mL, sin tocar los bordes. Se cierra la tapa, se incuba por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifuga por 1 minuto a 8000 rpm.
14. Se repite el paso 10 y se almacena el DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En la extracción de DNA de muestras artificiales sometidas a CD, se utilizó un volumen de 5 mL de sangre contaminada y se la procesó como se indica en el procedimiento de centrifugación diferencial de muestras de sangre. Posteriormente, se siguió el protocolo expuesto con las siguientes modificaciones.

1. Se congela la muestra procesada por centrifugación diferencial a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
2. Se saca el tubo del congelador y se le añade directamente 10 mL de agua destilada estéril.
3. Se coloca en un agitador mientras aún está congelado y se agita por 5 minutos, comprobando la lisis de eritrocitos.
4. Se centrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm y se desecha con cuidado el sobrenadante.
5. Se continúa el procedimiento desde el paso 6 del protocolo antes expuesto.

#### **2.5.5.4 Electroforesis en Gel de Agarosa**

La comprobación de la existencia de DNA genómico se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Con esta técnica se verificó la integridad y estado del DNA genómico contenido en las preparaciones de aislamiento de DNA.

##### *2.5.5.4.1 Preparación de Gel de Agarosa al 0.8%*

Para la preparación de 100 mL de gel de agarosa al 0.8% se utilizó el protocolo que se describe en seguida.

1. Se pesa en una balanza analítica 0.8 g de agarosa.
2. Se coloca la agarosa pesada en un vaso de precipitación junto con 100 mL de *buffer* TAE 1X.
3. Se hidrata la agarosa por agitación en un *stir hot plate* durante 10 minutos.
4. Se lleva la mezcla a calentamiento en un microondas hasta su ebullición.
5. Se entremezcla por agitación en un *stir hot plate* durante 2 minutos
6. Se lleva la mezcla nuevamente a calentamiento hasta su ebullición.
7. Se entremezcla por agitación en un *stir hot plate* hasta que la temperatura del gel sea de 60°C.
8. Se toman 5 µL de bromuro de etidio y se mantiene la agitación constante.
9. Se vierte la preparación en la cubeta preparada y se espera hasta su solidificación.
10. Se retiran las peinetas, se desmolda el gel, se lo coloca en la cámara de electroforesis y se la llena con TAE 1X hasta cubrir el gel.

Una vez terminado este procedimiento, se cargan las muestras en el gel. Para este cometido, se combinan 10 µL de muestra con 2 µL de *buffer* de carga (Blue Juice 10X). Se toman 10 µL de esta mezcla y se cargan en el gel de agarosa, se repite el procedimiento para cada una de las muestras. Junto con todas las muestra se colocan un marcador de peso molecular de 1 Kb. Subsecuentemente, se cierra la cámara y se la conecta a una fuente de poder. La migración electroforética se realiza a 120 V durante 1 hora.

#### 2.5.5.4.2 Visualización de Resultados

Al finalizar la migración electroforética, se retira cuidadosamente el gel de la cámara y se lo lleva a un fotodocumentador (UVP BioDoc-It). La visualización se hace con luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm.

#### 2.5.6 Cuantificación de DNA por Fluorometría

Para medir la concentración de DNA extraído se empleó el fluorómetro Qubit™, el cual permite una cuantificación de DNA rápida y precisa. El kit Quant-iT dsDNA provee

los reactivos necesarios para la cuantificación (fluoróforo, *buffer* de dilución y estándares de calibración). El método es desarrollado a temperatura ambiente, se mantiene estable hasta por 3 horas. Además, tolera contaminantes tales como sales, solventes, detergentes y proteínas. A continuación se describe el protocolo empleado (Invitrogen Corp., 2007).

1. Se prepara la solución de trabajo, mezclando el fluoróforo con la *buffer* de dilución en una proporción de 1:200, tomando en cuenta que el volumen final por reacción es de 200  $\mu\text{L}$ .
2. Se elaboran las soluciones estándar mezclando 190  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo con 10  $\mu\text{L}$  de cada estándar de calibración. Se mezcla en un vórtex por 3 segundos.
3. Se preparan las pruebas mezclando la solución de trabajo con las muestras de DNA. Se puede añadir de 1 a 10  $\mu\text{L}$  de muestra de DNA (dependiendo de su concentración) y se ajusta con la solución de trabajo a un volumen final por reacción de 200  $\mu\text{L}$ . Se mezcla en un vórtex por 3 segundos.
4. Se incuban todos los tubos por 2 minutos.
5. Se calibra el equipo con los estándares 1 y 2 preparados anteriormente y se insertan las pruebas en el fluorómetro.
6. Se reporta los resultados en una hoja de registro.

### **2.5.7 Identificación de DNA Genómico Bacteriano mediante 16S rDNA PCR**

Para la identificación de la presencia de DNA genómico bacteriano se decidió emplear un ensayo de PCR de amplio espectro que amplifica un fragmento del gen *rrs* (16S rDNA).

Las secuencias de los cebadores empleadas fueron tomadas de Warwick, *et al.* (2003) y el protocolo de PCR de Izquierdo (2007). Los cebadores *Nf* (5' TCC TAG GGG AGG CAG CAG T 3') y *Nr* (5' GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT 3') poseen una longitud de 19 y 26 bp, respectivamente, y amplifican un fragmento de 476 bp.



### 2.5.7.1 Protocolo de 16S rDNA PCR

La PCR se ensambló incorporando en la *master mix* los reactivos que se detallan a continuación (Cuadros 2.1 y 2.2).

**Cuadro 2.1** Concentraciones de reactivos empleadas para PCR 16S rDNA (Izquierdo, 2007).

<b>Reactivo</b>	<b>Concentraciones de Reactivos</b>	<b>Concentraciones Empleadas</b>
<i>Taq</i> polimerasa	5.0 U/ $\mu$ L	2.5 U/ $\mu$ L
<i>Buffer</i>	10X	1X
<i>Primer Nf</i>	100 pmol	10 pmol
<i>Primer Nr</i>	100 pmol	10 pmol
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5 mM
dNTPs	20 mM	0.4 mM

**Cuadro 2.2** Volúmenes de reactivos empleados para cada reacción de PCR 16S rDNA (Izquierdo, 2007).

<b>Reactivo</b>	<b>1X (<math>\mu</math>L)</b>
<i>Taq</i> polimerasa	0.5
<i>Buffer</i>	5.0
<i>Primer Nf</i>	0.1
<i>Primer Nr</i>	0.1
MgCl <sub>2</sub>	2.5
dNTPs	1.0
H <sub>2</sub> O (Grado PCR)	35.8
<b><i>Volumen por Reacción</i></b>	<b>45</b>

El volumen de reacción final se ajustó a 50  $\mu$ L, añadiendo 5  $\mu$ L de muestra de DNA. Se realizó el ensayo por duplicado para cada muestra. Toda reacción de PCR poseyó un control negativo, al cual se añadió 5  $\mu$ L de agua grado PCR en lugar de muestra de DNA.

Una vez ensamblada la PCR se procedió a colocar las muestras en un termociclador, para proceder a la amplificación del fragmento deseado bajo las siguientes condiciones (Cuadro 2.3).

**Cuadro 2.3** Programación del termociclador para PCR 16S rDNA (Izquierdo, 2007).

<b>Nº de Ciclos</b>	<b>Proceso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
1	Denaturación Inicial	95	4 min.
40	Denaturación	95	10 seg.
	Alineamiento	60	1 min.
1	Extensión Final	72	4 min.
1	Espera Final	4	10 min.

### 2.5.7.2 Electroforesis en Gel de Agarosa

La visualización del resultado de la amplificación por PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.0%. Con esta técnica se verificó la existencia del amplicón deseado.

#### 2.5.7.2.1 Preparación de Gel de Agarosa al 2.0%

Para la preparación de 100 mL de gel de agarosa al 2.0% se utilizó el protocolo que se describe a continuación.

11. Se pesa en una balanza analítica 2.0 g de agarosa.
12. Se coloca la agarosa pesada en un vaso de precipitación junto con 100 mL de *buffer* TAE 1X.
13. Se hidrata la agarosa por agitación en un *stir hot plate* durante 10 minutos.
14. Se lleva la mezcla a calentamiento en un microondas hasta su ebullición.
15. Se entremezcla por agitación en un *stir hot plate* durante 2 minutos
16. Se lleva la mezcla nuevamente a calentamiento hasta su ebullición.
17. Se entremezcla por agitación en un *stir hot plate* hasta que la temperatura del gel sea de 60°C.
18. Se toman 5 µL de bromuro de etidio y se mantiene la agitación constante.
19. Se vierte la preparación en la cubeta preparada y se espera hasta su solidificación.
20. Se retiran las peinetas, se desmolda el gel, se lo coloca en la cámara de electroforesis y se la llena con TAE 1X hasta cubrir el gel.

Una vez terminado este procedimiento, se cargan los productos de PCR en el gel. Para este cometido, se combinan 10  $\mu\text{L}$  de producto con 2  $\mu\text{L}$  de *buffer* de carga (Blue Juice 10X). Se toman 10  $\mu\text{L}$  de esta mezcla y se cargan en el gel de agarosa, se repite el procedimiento para cada una de las muestras. Junto con todas las muestra se colocan un marcador de peso molecular de 100 bp o un *Low DNA Mass Ladder*. Subsecuentemente, se cierra la cámara y se la conecta a una fuente de poder. La migración electroforética se realiza a 120 V durante 45 minutos.

#### 2.5.7.2.2 Visualización de Resultados

Al finalizar la migración electroforética, se retira cuidadosamente el gel de la cámara y se lo lleva a un fotodocumentador (UVP BioDoc-It). La visualización se hace con luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm.

## 2.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron incorporados en una hoja electrónica para su posterior análisis mediante estadística descriptiva.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Ensayos Microbiológicos de Recuento de CFU

#### 3.1.1 Ensayo 1: Experimentación con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

##### 3.1.1.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido

Para este ensayo se empleó una cepa bacteriana Gram-positiva y una Gram-negativa. Se escogió para el experimento a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como microorganismos modelo. El crecimiento bacteriano obtenido tanto en agar como en medio líquido fue óptimo. Por lo tanto se procedió a efectuar las diluciones seriadas y sus respectivas siembras.

##### 3.1.1.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadas

Para la elaboración de diluciones seriadas se usó el *Sistema I* y para la siembra de las mismas al *Sistema A*. La inoculación se hizo acto seguido a la elaboración de las diluciones.

Para la siembra se escogieron las diluciones  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$ . Se colocó sobre el agar 100  $\mu$ L de muestra de cada solución, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 10 para la obtención de la concentración de CFU/mL de solución de cada tubo de dilución seriada. Los resultados obtenidos en la siembra para *E. coli* como para *S. aureus* se presentan en seguida (Tablas 3.1 y 3.2).

**Tabla 3.1** Resultados del recuento de CFU de *E. coli* del Ensayo 1.

Dilución Réplica	$10^7$	$10^8$	$10^9$	$10^{10}$
1	37	7	1	0
2	39	2	0	0
3	41	2	0	0
<b>Promedio</b>	39,00	3,67	0,33	0,00

**Tabla 3.2** Resultados del recuento de CFU de *S. aureus* del Ensayo 1.

Dilución Réplica	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
1	131	12	1	0
2	124	14	0	0
3	112	19	3	0
<b>Promedio</b>	122,33	15,00	1,33	0,00

A partir de estos resultados se calculó la concentración en CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada del Ensayo 1.

Bacteria	Dilución	Concentración (CFU/mL)
<i>E. coli</i>	10 <sup>7</sup>	390
	10 <sup>8</sup>	37
	10 <sup>9</sup>	3
	10 <sup>10</sup>	0
<i>S. aureus</i>	10 <sup>7</sup>	1223
	10 <sup>8</sup>	150
	10 <sup>9</sup>	13
	10 <sup>10</sup>	0

### 3.1.2 Ensayo 2: Experimentación con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

#### 3.1.2.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido

Se emplearon las mismas cepas bacterianas usadas para el ensayo 1. El crecimiento bacteriano obtenido tanto en agar como en medio líquido fue óptimo. Por lo tanto, se procedió a realizar las diluciones seriadas y sus correspondientes siembras.

#### 3.1.2.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadas

Para la elaboración de diluciones seriadas se usó el *Sistema I* y para la siembra de las mismas al *Sistema A*. A diferencia del ensayo 1 la inoculación se realizó 4 días después a la preparación de las diluciones.

Para la siembra se escogieron los tubos que poseían las diluciones  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$ . Se colocó sobre el agar un volumen de 33.3  $\mu\text{L}$  de muestra de cada solución, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 30 para la obtención de la concentración de CFU/mL de suero fisiológico de cada tubo de dilución seriada. Los resultados obtenidos en la siembra para *E. coli* como para *S. aureus* se describen a continuación (Tablas 3.4 y 3.5).

**Tabla 3.4** Resultados del recuento de CFU de *E. coli* del Ensayo 2.

Dilución Réplica	$10^6$	$10^7$	$10^8$	$10^9$
1	34	19	2	0
2	30	16	3	1
3	36	15	2	0
<b>Promedio</b>	33,33	16,67	2,33	0,33

**Tabla 3.5** Resultados del recuento de CFU de *S. aureus* del Ensayo 2.

Dilución Réplica	$10^6$	$10^7$	$10^8$	$10^9$
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	0,00	0,00	0,00	0,00

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada del Ensayo 2.

Bacteria	Dilución	Concentración (CFU/mL)
<i>E. coli</i>	$10^6$	1000
	$10^7$	500
	$10^8$	70
	$10^9$	10

Como se presenta en el Tabla 3.5, en este ensayo no hubo crecimiento bacteriano de *S. aureus*, por lo tanto, se decidió repetir el ensayo. Esta repetición fue realizada para probar la viabilidad de la cepa empleada.

### 3.1.3 Ensayo 3: Experimentación con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

#### 3.1.3.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido

Se trabajó con las mismas cepas bacterianas usadas para el ensayo 1 y 2. El crecimiento bacteriano conseguido tanto en agar como en medio líquido fue óptimo. Consecuentemente, se procedió a realizar las diluciones seriadas y sus correspondientes cultivos microbiológicos.

#### 3.1.3.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadas

Para la elaboración de diluciones seriadas se usó el *Sistema 2* y para la siembra de las mismas el *Sistema A*. El experimento se realizó acto seguido a la obtención del cultivo en medio líquido.

Para la siembra se escogieron los tubos que poseían las diluciones  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$ . Se colocó sobre el agar un volumen de 33.3  $\mu\text{L}$  de muestra de cada solución, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 30 para la obtención de la concentración de CFU/mL de suero fisiológico de cada tubo de dilución seriada. Los resultados obtenidos en la siembra para *E. coli* como para *S. aureus* se describen a continuación (Tablas 3.7 y 3.8).

**Tabla 3.7** Resultados del recuento de CFU de *E. coli* del Ensayo 3.

Dilución Réplica	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	$10^9$
<b>1</b>	N.C. <sup>†</sup>	210	40	3	2	0
<b>2</b>	N.C. <sup>†</sup>	274	44	5	0	0
<b>3</b>	N.C. <sup>†</sup>	264	41	5	1	0
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	249,33	41,67	4,33	1,00	0,00

<sup>†</sup> Incontable

**Tabla 3.8** Resultados del recuento de CFU de *S. aureus* del Ensayo 3.

Dilución Réplica	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada del Ensayo 3.

Bacteria	Dilución	Concentración (CFU/mL)
<i>E. coli</i>	10 <sup>4</sup>	N.D. <sup>†</sup>
	10 <sup>5</sup>	7480
	10 <sup>6</sup>	1250
	10 <sup>7</sup>	130
	10 <sup>8</sup>	30
	10 <sup>9</sup>	0

<sup>†</sup> Indeterminada

En este ensayo tampoco hubo crecimiento bacteriano de *S. aureus*. Se decidió utilizar una nueva cepa nueva de *S. aureus*.

### 3.1.4 Ensayo 4: Experimentación con *Staphylococcus aureus*

#### 3.1.4.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido

Para la realización de este ensayo, se trabajó con una cepa nueva de *S. aureus*, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Calos Andrade Marín, la misma que era sensible a vancomicina y resistente a ciprofloxacina, eritromicina y penicilina. El crecimiento bacteriano conseguido tanto en agar como en medio líquido fue óptimo. Consiguientemente, se procedió a realizar las diluciones seriadas y sus correspondientes cultivos microbiológicos.



### 3.1.4.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadadas

Para la elaboración de diluciones seriadas se usó el *Sistema 2* y para la siembra de las mismas al *Sistema A*. El experimento se realizó acto seguido a la obtención del cultivo en medio líquido.

Para la siembra se escogieron los tubos que poseían las diluciones  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$ . Se colocó sobre el agar un volumen de 33.3  $\mu\text{L}$  de muestra de cada solución, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 30 para la obtención de la concentración de CFU/mL de suero fisiológico de cada tubo de dilución seriada. Los resultados obtenidos en el cultivo microbiológico de *S. aureus* se describen a continuación (Tabla 3.10).

**Tabla 3.10** Resultados del recuento de CFU de *S. aureus* del Ensayo 4.

Dilución Réplica	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$
1	0	0	2	0	0	0
2	0	0	5	0	0	0
3	463	43	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	154,33	14,33	2,33	0,00	0,00	0,00

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.11).

**Tabla 3.11** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada del Ensayo 4.

Bacteria	Dilución	Concentración (CFU/mL)
<i>S. aureus</i>	$10^3$	4630
	$10^4$	430
	$10^5$	70
	$10^6$	0
	$10^7$	0
	$10^8$	0

En este experimento no se obtuvo el crecimiento bacteriano esperado de *S. aureus*, Se resolvió usar otra cepa bacteriana Gram-positiva.

### 3.1.5 Ensayo 5: Experimentación con *Enterococcus faecalis*

#### 3.1.5.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido

En este experimento se trabajó con una cepa ATCC de *Enterococcus faecalis* 29212, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Carlos Andrade Marín. Debido a que, el crecimiento bacteriano alcanzado tanto en agar como en medio líquido fue óptimo, se arrancó con la realización de las diluciones seriadas y sus correspondientes cultivos microbiológicos.

#### 3.1.5.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadas

Para la elaboración de diluciones seriadas se usó el *Sistema 2* y para la siembra de las mismas el *Sistema A*. El experimento se realizó después de la obtención del cultivo en medio líquido.

En el cultivo microbiológico fueron usadas las diluciones  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$ . Sobre el agar se colocó un volumen de 100  $\mu$ L de cada dilución, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 10 para la obtención de la concentración de CFU/mL de suero fisiológico. Los resultados obtenidos en el cultivo microbiológico de *E. faecalis* se describen en la Tabla 3.12.

**Tabla 3.12** Resultados del recuento de CFU de *E. faecalis* del Ensayo 5.

Dilución Réplica	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$
1	199	47	0	0
2	210	37	3	0
3	207	31	3	0
<b>Promedio</b>	205,33	35,00	2,00	0,00

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.13).

**Tabla 3.13** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada del Ensayo 5.

<b>Bacteria</b>	<b>Dilución</b>	<b>Concentración (CFU/mL)</b>
<i>E. faecalis</i>	10 <sup>5</sup>	2053
	10 <sup>6</sup>	350
	10 <sup>7</sup>	20
	10 <sup>8</sup>	0

En este experimento el microorganismo modelo empleado funcionó de la manera deseada, pero para verificar su correcto desempeño se decidió repetir el ensayo.

### **3.1.6 Ensayo 6: Experimentación con *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli***

#### **3.1.6.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido**

Se trabajó con estos dos microorganismos modelo para verificar el correcto desempeño del sistema. Gracias a que, el crecimiento bacteriano conseguido tanto en agar como en medio líquido fue óptimo, se inició la elaboración de las diluciones seriadas y sus correspondientes cultivos microbiológicos.

#### **3.1.6.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadas**

Para la elaboración de diluciones seriadas se usó el *Sistema 2* y para la siembra de las mismas el *Sistema A*. El experimento se realizó después de la obtención del cultivo en medio líquido.

En el cultivo microbiológico fueron usadas las diluciones 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup>. Sobre el agar se colocó un volumen de 33.3 µL de cada dilución, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 30 para la obtención de la concentración de CFU/mL de solución. Los resultados alcanzados en el cultivo microbiológico de *E. faecalis* y *E. coli* se representan en las Tablas 3.14 y 3.15.

**Tabla 3.14** Resultados del recuento de CFU de *E. faecalis* del Ensayo 6.

Dilución Réplica	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
1	N.C. <sup>†</sup>	270	47	5	0
2	N.C. <sup>†</sup>	273	30	2	1
3	N.C. <sup>†</sup>	290	31	1	0
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	277,67	36,00	2,67	0,33

<sup>†</sup> Incontable

**Tabla 3.15** Resultados del recuento de CFU de *E. coli* del Ensayo 6.

Dilución Réplica	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
1	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	109	22
2	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	291	13
3	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	137	24
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	112,33	19,67

<sup>†</sup> Incontable

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.16).

**Tabla 3.16** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada del Ensayo 6.

Bacteria	Dilución	Concentración (CFU/mL)
<i>E. faecalis</i>	10 <sup>4</sup>	N.D. <sup>†</sup>
	10 <sup>5</sup>	8330
	10 <sup>6</sup>	1080
	10 <sup>7</sup>	80
	10 <sup>8</sup>	10
<i>E. coli</i>	10 <sup>4</sup>	N.D. <sup>†</sup>
	10 <sup>5</sup>	N.D. <sup>†</sup>
	10 <sup>6</sup>	N.D. <sup>†</sup>
	10 <sup>7</sup>	3370
	10 <sup>8</sup>	590

<sup>†</sup> Indeterminada

Con este ensayo se confirmó el adecuado desempeño de la cepa bacteriana y se decidió trabajar con ésta en las siguientes pruebas.

## **3.2 Preparación y Evaluación de Muestras Artificiales**

### **3.2.1 Experimento 1: Preparación y Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de CFU**

#### **3.2.1.1 Preparación de Muestras Artificiales**

Se escogió a *E. coli* para la realización de este experimento. Las muestras artificiales (2 mL) fueron preparadas a partir de las diluciones seriadas  $10^5$  y  $10^6$  del ensayo 3 (ensayo microbiológico de recuento de CFU). Se prepararon tres muestras artificiales con sus respectivos duplicados, dos de ellas correspondientes a las diluciones expuestas anteriormente y la última a la mezcla en partes iguales de las mismas.

#### **3.2.1.2 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de CFU**

Para la siembra de las muestras artificiales se empleó el *Sistema X*. La inoculación se hizo acto seguido a la elaboración de las muestras artificiales. Se pusieron sobre el agar 33.3  $\mu\text{L}$  de muestra artificial.

No hubo crecimiento bacteriano luego de este ensayo. Se presume que la sangre empleada para la elaboración de las muestras artificiales poseyó inhibidores de crecimiento y, por lo tanto, impidió la obtención de resultados.

### **3.2.2 Experimento 2: Preparación y Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de CFU**

#### **3.2.2.1 Preparación de Muestras Artificiales**

Se escogió a *E. faecalis* para la realización de este experimento. Las muestras artificiales (2 mL) fueron preparadas a partir de las diluciones seriadas  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y

10<sup>6</sup> del ensayo 6 (ensayo microbiológico de recuento de CFU). Las muestras fueron denominadas MA1, MA2, MA3, MA4 y MA5, respectivamente.

### 3.2.2.2 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de CFU

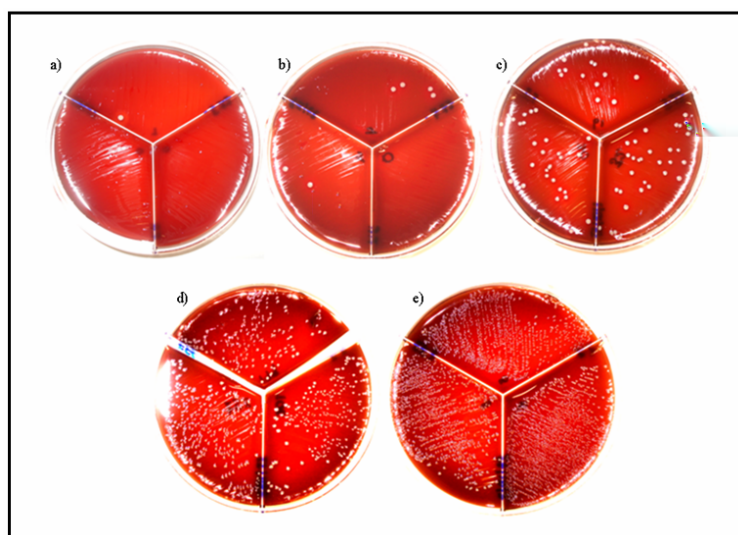
Para la siembra de las muestras artificiales se empleó al *Sistema Y*. La inoculación se hizo acto seguido a la elaboración de las muestras artificiales.

La siembra se realizó con asa calibrada a 0.01 mL, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 100 para la obtención de la concentración de CFU/mL de muestra. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.17 y Figura 3.1.

**Tabla 3.17** Resultados del recuento de CFU de muestras artificiales de *E. faecalis* del Experimento 2.

Muestra \ Réplica	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5
1	N.C. <sup>†</sup>	199	19	4	1
2	N.C. <sup>†</sup>	201	62	4	0
3	N.C. <sup>†</sup>	257	30	0	0
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	219,00	27,00	2,67	0,33

<sup>†</sup> Incontable



**Figura 3.1** Ensayo de conteo de CFU de muestras artificiales de *E. faecalis* del Experimento 2. Resultado correspondiente a muestra artificial: a) MA5; b) MA4; c) MA3; d) MA2; e) MA1.

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de muestra. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.18).

**Tabla 3.18** Concentración bacteriana calculada por tubo de muestra artificial de *E. faecalis* del Experimento 2.

Bacteria	Muestra	Concentración (CFU/mL)
<i>E. faecalis</i>	MA1	N.D. <sup>†</sup>
	MA2	21900
	MA3	2700
	MA4	267
	MA5	33

<sup>†</sup> Indeterminada

El sistema de siembra empleado mostró buenos resultados. Se decidió emplearlo para los siguientes ensayos.

### 3.2.3 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento en Cámara de Neubauer

#### 3.2.3.1 Elección de Muestras Artificiales

Se emplearon las muestras artificiales preparadas para el experimento 1. Las muestras usadas estuvieron conservadas a -80°C antes de su utilización.

#### 3.2.3.2 Evaluación de Muestras Artificiales por Método de Neubauer

Se siguió cuidadosamente el procedimiento expuesto en el capítulo anterior para el recuento en cámara de Neubauer. Sin embargo, no se obtuvieron resultados, debido a que, la predominancia de elementos sanguíneos impidió la visualización de las bacterias.

### 3.2.4 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de Campos

#### 3.2.4.1 Preparación de Muestras Artificiales

Para este ensayo se escogieron diluciones preparadas anteriormente, tanto de *E. coli* como de *E. faecalis*.

Para la elaboración de las muestras artificiales se emplearon las diluciones seriadas  $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$  de los dos microorganismos del ensayo 6. Las muestras fueron nombradas EC9, EC8 y EC7 para *E. coli* y EF9, EF8 y EF7 para *E. faecalis*, respectivamente. El ensayo se realizó por duplicado.

#### **3.2.4.2 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de CFU**

Para la siembra de las muestras artificiales se empleó al *Sistema Y*. La inoculación se hizo acto seguido a la elaboración de las muestras artificiales.

La siembra se realizó con asa calibrada a 0.01 mL, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU debieron multiplicarse por 100 para la obtención de la concentración de CFU/mL de muestra. Sin embargo en todas las cajas inoculadas se encontró crecimiento masivo, por lo que no se realizó el cálculo de la concentración de CFU/mL de muestra artificial.

#### **3.2.4.3 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de Campos**

Se realizó un frotis de cada una de las muestras artificiales y sus duplicados. Cada una de las láminas fue tratada mediante coloración Gram y posteriormente llevada al microscopio para su observación.

Las láminas pertenecientes a las muestras artificiales contaminadas con *E. coli* fueron analizadas exitosamente. Por otro lado, aquellas con *E. faecalis* presentaron inconvenientes al momento del conteo, debido a que las estructuras observadas eran demasiado pequeñas para poder ser evaluadas.

*E. coli* fue identificado como un bacilo Gram-negativo, claramente distinguible, por lo cual, se decidió reportar solamente sus resultados (Tabla 3.19).



**Tabla 3.19** Resultados del recuento por campos de muestras artificiales de *E. coli*.

<b>Muestra</b>	<b>EC8</b>	<b>EC8</b>	<b>EC7</b>	<b>EC7</b>	<b>EC6</b>	<b>EC6</b>
<b>Campo</b>	<b>(1)</b>	<b>(2)</b>	<b>(1)</b>	<b>(2)</b>	<b>(1)</b>	<b>(2)</b>
<b>1</b>	16	17	4	2	2	0
<b>2</b>	8	8	3	2	0	0
<b>3</b>	7	9	4	2	0	0
<b>4</b>	8	10	2	3	0	0
<b>5</b>	11	8	2	4	0	2
<b>6</b>	15	16	2	2	4	0
<b>7</b>	8	10	5	4	0	0
<b>8</b>	14	8	5	2	2	0
<b>9</b>	7	9	2	3	0	2
<b>10</b>	11	8	4	3	0	0
<b>Promedio</b>	10,5	10,3	3,3	2,7	0,8	0,4

La Tabla 3.19 muestra que, el número de bacterias es mayor con diluciones más concentradas. Este resultado es coherente y ratifica la funcionalidad del método empleado para la preparación de muestras artificiales.

### **3.3 Evaluación por Recuento de CFU de Separación de Componentes de Sangre**

#### **3.3.1 Determinación del Volumen de Trabajo para Muestras Artificiales**

Para la separación del plasma y la capa leuco-plaquetaria de la muestra tratada con centrifugación diferencial, se requiere una clara identificación de la interfase. Por lo cual, se probó con tres volúmenes de sangre completa y se comparó el respectivo *buffy coat*.

Las muestras de 2 y 3 mL de sangre mostraron un pobre *buffy coat*. Por otro lado, la muestra de 5 mL exhibió una capa leuco-plaquetaria de fácil observación e identificación. Por consiguiente, se escogió al volumen de 5 mL como volumen de trabajo.

Para los ensayos que se presentan a continuación, se escaló el volumen final de diluciones seriadas y muestras artificiales a 5mL.

### 3.3.2 Preparación, Procesamiento y Evaluación de Muestras Artificiales con *E. coli* Tratadas por Centrifugación Diferencial

#### 3.3.2.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido

Los resultados obtenidos tanto agar como en medio líquido fueron adecuados, por lo tanto se procedió a la realización de las diluciones seriadas y sus correspondientes siembras microbiológicas.

#### 3.3.2.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadas

Para la elaboración de diluciones seriadas se usó el *Sistema 2* y para la siembra de las mismas al *Sistema B*. La inoculación se hizo inmediatamente a la elaboración de las diluciones.

Para la siembra se escogieron las diluciones  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , y  $10^7$ . La inoculación se realizó con asa calibrada a 0.01 mL, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 100 para la obtención de la concentración de CFU/mL de solución. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.20.

**Tabla 3.20** Resultados del recuento de CFU de las diluciones seriadas de *E. coli* para preparación de muestras artificiales del ensayo de evaluación de la técnica de centrifugación diferencial.

Dilución Réplica	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^{10}$
1	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	233	34	4	1
2	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	238	46	4	1
3	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	255	45	3	1
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	242,00	41,67	3,67	1,00

<sup>†</sup> Incontable

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.21).

**Tabla 3.21** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada de *E. coli* para preparación de muestras artificiales del ensayo de evaluación de la técnica de centrifugación diferencial.

Bacteria	Dilución	Concentración (CFU/mL)
<i>E. coli</i>	10 <sup>2</sup>	N.D. <sup>†</sup>
	10 <sup>3</sup>	N.D. <sup>†</sup>
	10 <sup>4</sup>	24200
	10 <sup>5</sup>	4167
	10 <sup>6</sup>	367
	10 <sup>7</sup>	100

<sup>†</sup> Indeterminada

### 3.3.2.3 Preparación de Muestras Artificiales

Las muestras artificiales (5 mL) fueron preparadas a partir de las diluciones seriadas 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup>. Las muestras contaminadas fueron preparadas por duplicado, para de esta manera conservar un tubo como control y al otro someterlo a centrifugación diferencial y hacer una comparación de los resultados obtenidos. Las muestras artificiales fueron denominadas MEC8, MEC7 y MC6, respectivamente.

### 3.3.2.4 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de CFU

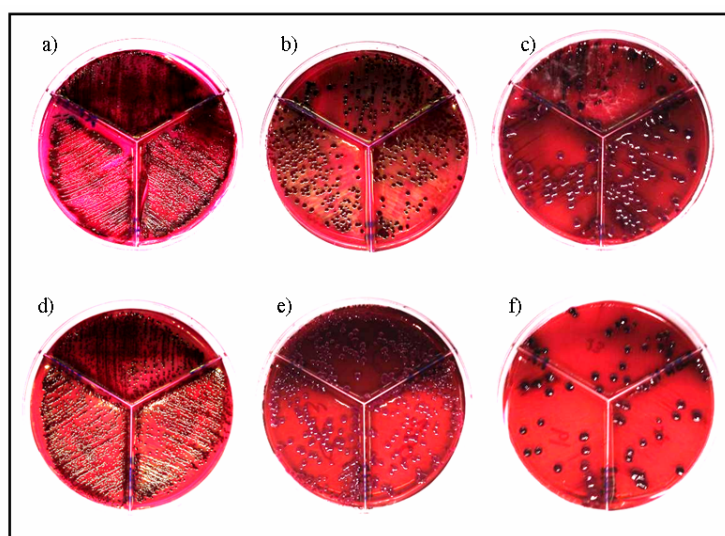
Uno de los tubos de cada dupla de muestras artificiales fue sometido a centrifugación diferencial, mientras que el otro se conservó como un control. Luego de la separación de componentes sanguíneos al primer tubo se le retiró el plasma y la capa leucoplaquetaria y posteriormente se trabajó con la capa restante llamada capa eritrocitaria.

La siembra se realizó con asa calibrada a 0.01 mL, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU debieron multiplicarse por 100 para la obtención de la concentración de CFU/mL de muestra tratada o control. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.22 y Figura 3.2.

**Tabla 3.22** Resultados del recuento de CFU de las muestras contaminadas con *E. coli* tratadas y no tratadas con la técnica de centrifugación diferencial (CD).

Muestra Réplica	MEC8 Control	MEC7 Control	MEC6 Control	MEC8 CD	MEC7 CD	MEC6 CD
1	N.C. <sup>†</sup>	220	26	N.C. <sup>†</sup>	488	33
2	N.C. <sup>†</sup>	223	23	N.C. <sup>†</sup>	455	50
3	N.C. <sup>†</sup>	217	19	N.C. <sup>†</sup>	401	84
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	220,00	22,67	N.C. <sup>†</sup>	448,00	55,67

<sup>†</sup> Incontable



**Figura 3.2** Resultados del recuento de CFU de las muestras contaminadas con *E. coli* tratadas con centrifugación diferencial (CD): a)MEC8, b)MEC7 y c)MEC6 y sus controles: d)MEC8, e)MEC7 y f)MEC6

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.23).

**Tabla 3.23** Concentración bacteriana calculada por tubo de muestra contaminada con *E. coli* tratadas y no tratadas con la técnica de centrifugación diferencial (CD).

Bacteria	Muestra	Concentración (CFU/mL)
<i>E. coli</i>	MEC8 Control	N.D. <sup>†</sup>
	MEC7 Control	22000
	MEC6 Control	2267
	MEC8 CD	N.D. <sup>†</sup>
	MEC7 CD	44800
	MEC6 CD	5567

<sup>†</sup> Indeterminada

### 3.3.2.5 Análisis de Resultados

El plasma y la capa leuco-plaquetaria representan alrededor del 50 a 60% de la sangre. Al retirar estos componentes, se debe originar una concentración de las bacterias en la capa eritrocitaria, provocando un incremento en el número de CFU de la muestra tratada con centrifugación diferencial. Esto se vio reflejado en los resultados obtenidos en este ensayo, demostrando que por medio de esta técnica se puede retirar el DNA genómico humano presente en leucocitos, sin alterar significativamente el número de bacterias presentes en muestras artificialmente contaminadas (Tabla 3.24).

**Tabla 3.24** Comparación de resultados esperados y obtenidos luego del uso de la técnica de centrifugación diferencial (CD) en base a los resultados de los controles.

<b>Muestra Artificial</b>	<b>Control (CFU/mL)</b>	<b>Rango Esperado Después de CD (CFU/mL)</b>	<b>CD (CFU/mL)</b>
MEC8	N.C. <sup>†</sup>	N.D. <sup>††</sup>	N.C. <sup>†</sup>
MEC7	22000	44000 - 55000	44800
MEC6	2267	4534- 5668	5567

<sup>†</sup> Incontable

<sup>††</sup> Indeterminado

Como se observa en esta Tabla, los resultados obtenidos luego de la eliminación del plasma y la capa leuco-plaquetaria se encuentran dentro de los rangos esperados de número de CFU/mL de muestra, probando que las bacterias luego de la centrifugación diferencial se concentran en la capa eritrocitaria de la sangre, facilitando la posibilidad de aislamiento del DNA genómico bacteriano sin la interferencia del DNA genómico humano.

### 3.3.3 Preparación, Procesamiento y Evaluación de Muestras Artificiales con *E. faecalis* Tratadas por Centrifugación Diferencial

#### 3.3.3.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido

Los resultados alcanzados en agar como medio líquido fueron apropiados, por lo tanto se inició la realización de las diluciones seriadas y sus correspondientes siembras microbiológicas.

### 3.3.3.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadadas

Para la elaboración de diluciones seriadas se usó el *Sistema 2* y para la siembra de las mismas al *Sistema B*. La inoculación se hizo acto seguido a la elaboración de las diluciones.

Para la siembra se escogieron las diluciones  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , y  $10^7$ . La inoculación se realizó con asa calibrada a 0.01 mL, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 100 para la obtención de la concentración de CFU/mL de solución. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.25.

**Tabla 3.25** Resultados del recuento de CFU de las diluciones seriadas de *E. faecalis* para preparación de muestras artificiales del ensayo de evaluación de la técnica de centrifugación diferencial.

Dilución Réplica	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^{10}$
<b>1</b>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	174	28	2
<b>2</b>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	206	21	2
<b>3</b>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	245	19	1
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	208,33	22,67	1,67

<sup>†</sup> Incontable

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.26).

**Tabla 3.26** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada de *E. faecalis* para preparación de muestras artificiales del ensayo de evaluación de la técnica de centrifugación diferencial.

Bacteria	Dilución	Concentración (CFU/mL)
<i>E. faecalis</i>	$10^2$	N.D. <sup>†</sup>
	$10^3$	N.D. <sup>†</sup>
	$10^4$	N.D. <sup>†</sup>
	$10^5$	20833
	$10^6$	2267
	$10^7$	167

<sup>†</sup> Indeterminada

### 3.3.3.3 Preparación de Muestras Artificiales

Las muestras artificiales (5 mL) fueron preparadas a partir de las diluciones seriadas  $10^2$ ,  $10^3$  y  $10^4$ . Las muestras contaminadas fueron preparadas por duplicado para de esta manera conservar un tubo como control y al otro someterlo a centrifugación diferencial y hacer una comparación de los resultados obtenidos. Las muestras infectadas fueron denominadas MEF8, MEF7 y MEF6, respectivamente.

### 3.3.3.4 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de CFU

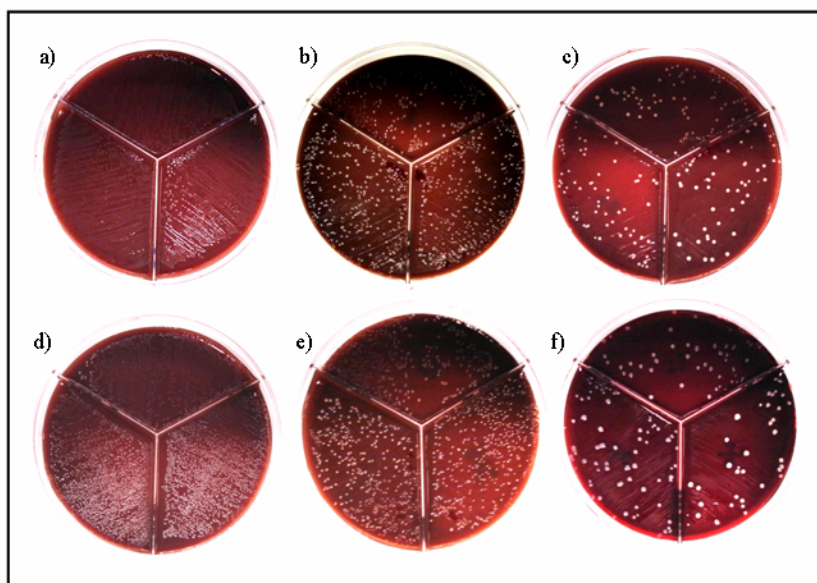
Uno de los tubos de cada dupleta de muestras artificiales fue sometido a centrifugación diferencial, mientras que el otro se conservó como un control. Luego de la separación de componentes sanguíneos al primer tubo se le retiró el plasma y la capa leucoplaquetaria y posteriormente se trabajó con la capa restante llamada capa eritrocitaria.

La siembra se realizó con asa calibrada a 0.01 mL, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU debieron multiplicarse por 100 para la obtención de la concentración de CFU/mL de muestra tratada o control. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.27 y Figura 3.3.

**Tabla 3.27** Resultados del recuento de CFU de las muestras contaminadas con *E. faecalis* tratadas y no tratadas con la técnica de centrifugación diferencial (CD).

Muestra Réplica	MEF8 Control	MEF7 Control	MEF6 Control	MEF8 CD	MEF7 CD	MEF6 CD
1	N.C. <sup>†</sup>	66	26	N.C. <sup>†</sup>	300	48
2	N.C. <sup>†</sup>	69	23	N.C. <sup>†</sup>	277	64
3	N.C. <sup>†</sup>	47	19	N.C. <sup>†</sup>	282	57
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	60,67	22,67	N.C. <sup>†</sup>	286,33	56,33

<sup>†</sup> Incontable



**Figura 3.3** Resultados del recuento de CFU de las muestras contaminadas con *E. faecalis* tratadas con centrifugación diferencial (CD): a) MEF8, b) MEF7 y c) MEF6 y sus controles: d) MEF8, e)MEF7 y f)MEF6

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.28).

**Tabla 3.28** Concentración bacteriana calculada por tubo de muestra contaminada con *E. faecalis* tratadas y no tratadas con la técnica de centrifugación diferencial (CD).

Bacteria	Muestra	Concentración (CFU/mL)
<i>E. coli</i>	MEC8 Control	N.D. <sup>†</sup>
	MEC7 Control	6067
	MEC6 Control	2267
	MEC8 CD	N.D. <sup>†</sup>
	MEC7 CD	28633
	MEC6 CD	5633

<sup>†</sup> Indeterminada

### 3.3.3.5 Análisis de Resultados

El plasma y la capa leuco-plaquetaria representan alrededor del 50 a 60% de la sangre. Al retirar estos componentes, se debe originar una concentración de las bacterias en la capa eritrocitaria, provocando un incremento en el número de CFU de la muestra tratada



con centrifugación diferencial. Esto se vio reflejado en los resultados obtenidos en este ensayo, demostrando que por medio de esta técnica se puede retirar el DNA genómico humano presente en leucocitos, sin alterar significativamente el número de bacterias presentes en muestras contaminadas (Tabla 3.29).

**Tabla 3.29** Comparación de resultados esperados y obtenidos luego del uso de la técnica de centrifugación diferencial (CD) en base a los resultados de los controles.

<b>Muestra Artificial</b>	<b>Control (CFU/mL)</b>	<b>Rango Esperado Después de CD (CFU/mL)</b>	<b>CD (CFU/mL)</b>
MEF8	N.C. <sup>†</sup>	N.D. <sup>††</sup>	N.C. <sup>†</sup>
MEF7	6067	12134 - 15168	28633
MEF6	2267	4534- 5668	5633

<sup>†</sup> Incontable

<sup>††</sup> Indeterminado

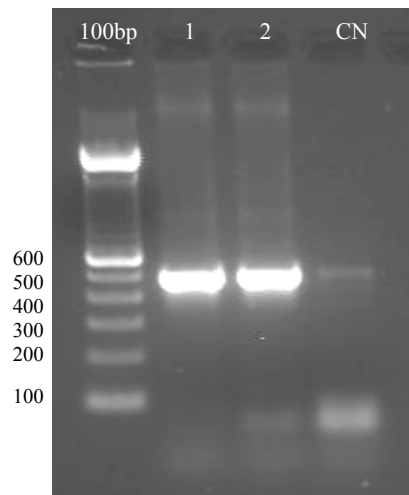
Como se observa en el Tabla 3.24, los resultados obtenidos luego de la eliminación del plasma y la capa leuco-plaquetaria se encuentran dentro de los rangos esperados de número de CFU/mL de muestra o lo superan, probando que las bacterias luego de la centrifugación diferencial se concentran en la capa eritrocitaria de la sangre, facilitando la posibilidad de aislamiento del DNA genómico bacteriano sin la interferencia del DNA genómico humano.

### 3.4 Verificación del Correcto Funcionamiento del Sistema 16S rDNA PCR

Se realizó una prueba preliminar del sistema 16S rDNA PCR, usando DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, con el fin de probar el correcto funcionamiento del mismo. Para este cometido, se siguió el protocolo de ensamblaje de reacción de PCR que se presentó en el capítulo anterior.

Para este ensayo se usaron dos controles positivos (DNA de *M. tuberculosis*) y un control negativo (agua grado biología molecular).

Luego de transcurrida la reacción de PCR, se procedió a hacer una electroforesis en la que se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 3.4).



**Figura 3.4** Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR del ensayo de verificación del funcionamiento del sistema 16S rDNA. Las muestras 1 y 2 son los controles positivos y la muestra CN es el control negativo.

En la fotografía se puede observar un amplicón de 476 bp, muy marcado para los controles positivos (1 y 2) y leve para el control negativo (CN). Esta PCR demostró el correcto funcionamiento del sistema.

La presencia de un amplicón en el control negativo se generó posiblemente por problemas con la contaminación de reactivos que provengan de una fuente bacteriana, como la *Taq* polimerasa.

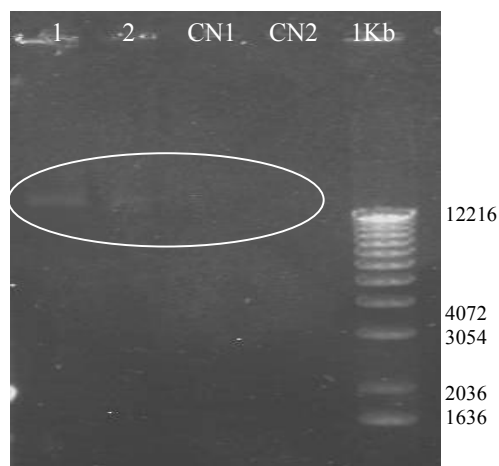
### 3.5 Extracción de DNA de Cultivos Puros

#### 3.5.1 Primer Ensayo de Aislamiento de DNA Genómico Bacteriano

Se prepararon cultivos bacterianos puros en medio líquido para este experimento. El procesamiento se desarrolló con el protocolo manual para aislamiento de DNA genómico bacteriano descrito en el capítulo anterior.

En este ensayo se procesó 1 mL de cultivo puro de cada bacteria empleada en el estudio y dos controles negativos, uno para cada microorganismo.

Una vez terminado el proceso de aislamiento de DNA se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la existencia de DNA. Los resultados se pueden observar a continuación (Figura 3.5).



**Figura 3.5** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio donde se observan los resultados del primer ensayo de extracción manual de DNA genómico de cultivos bacterianos puros. La muestra 1 corresponde al DNA genómico de *E. coli*, la muestra 2 al de *E. faecalis*, CN1 y CN2 son los controles negativos.

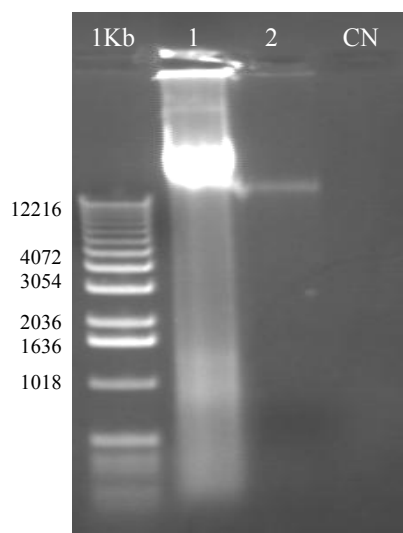
Se encontró poco DNA en los carriles 1 y 2, por lo que se decidió emplear un volumen de cultivo bacteriano puro mayor. Los controles negativos exhibieron ausencia de DNA mostrando que no hubo contaminación en el proceso de aislamiento.

### 3.5.2 Segundo Ensayo de Aislamiento de DNA Genómico Bacteriano

Se hicieron cultivos bacterianos puros en medio líquido para esta experimentación. El procesamiento se desarrolló con el protocolo para aislamiento manual de DNA genómico bacteriano detallado en el capítulo anterior.

En este ensayo se procesaron 10 mL de cultivo puro de cada bacteria usada en la investigación y un control negativo (agua grado biología molecular).

Una vez ejecutado el proceso de aislamiento de DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa para demostrar la presencia de DNA. Los resultados se pueden observar a continuación (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio donde se observan los resultados del segundo ensayo de extracción manual de DNA genómico de cultivos bacterianos puros. La muestra 1 corresponde al DNA genómico de *E. coli*, la muestra 2 al de *E. faecalis* y CN es el control negativo.

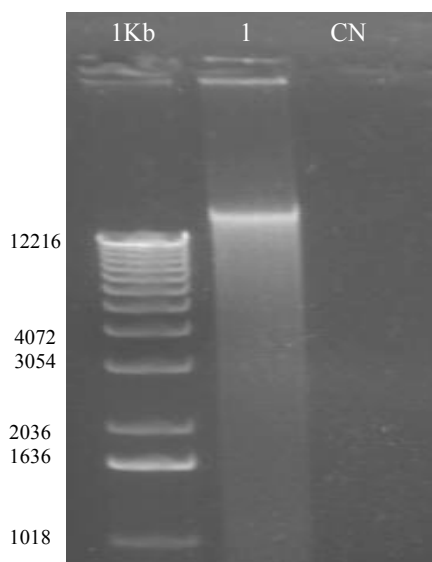
El protocolo mostró éxito en la extracción de DNA genómico de *E. coli*. No obstante, el método fracasó en la extracción de DNA de *E. faecalis*, por lo cual se decidió incrementar la incubación de esta muestra con el cóctel lítico a 3 horas.

### 3.5.3 Tercer Ensayo de Aislamiento de DNA Genómico Bacteriano

Se elaboraron cultivos bacterianos puros en medio líquido para esta experiencia. El procesamiento se llevó a cabo con el protocolo para aislamiento manual de DNA genómico bacteriano definido en el capítulo anterior con un ampliación en la incubación con cóctel lítico de 3 horas.

En este ensayo se procesaron 10 mL de cultivo puro de *E. faecalis* y un control negativo (agua grado biología molecular).

Una vez concluido el proceso de aislamiento de DNA se procedió a efectuar una electroforesis en gel de agarosa para evidenciar la existencia de DNA. Los resultados se pueden observar en seguida (Figura 3.7).



**Figura 3.7** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio donde se observan los resultados del tercer ensayo de extracción manual de DNA genómico de cultivos bacterianos puros. La muestra 1 corresponde al DNA genómico de *E. faecalis* y CN es el control negativo.

La incubación por tres horas con cóctel lítico incrementó la eficiencia de aislamiento de DNA genómico de *E. faecalis*. Por esta razón, se decidió usar este paso modificado en posteriores extracciones con este protocolo.

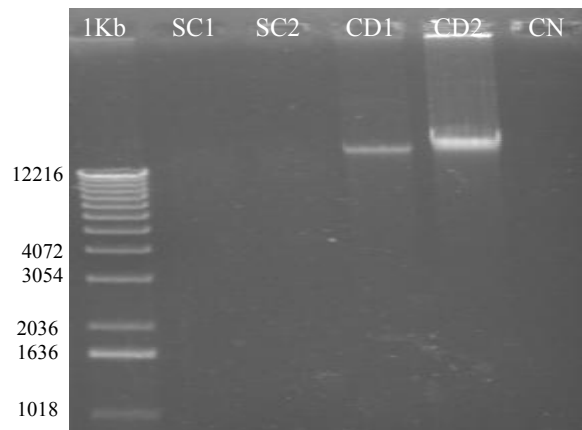
### **3.6 Evaluación del Sistema Diseñado para Aislamiento de DNA Bacteriano en Sangre**

#### **3.6.1 Aislamiento Manual de DNA Genómico de Muestras Artificiales**

Se prepararon cuatro muestras artificiales de 5 mL a partir de cultivos puros de *E. coli*. Las muestras contaminadas fueron tratadas por dupletas, es decir, se conservaron dos tubos como control y a los dos restantes se los sometió a centrifugación diferencial y eliminación de plasma y capa leuco-plaquetaria.

Posteriormente, se realizó una lisis de eritrocitos y se centrifugó las muestras a 6000 rpm por 10 minutos. Luego de este tratamiento especial se empleó el protocolo para aislamiento manual de DNA genómico bacteriano definido en el capítulo anterior con un aumento en la incubación con cóctel lítico de 3 horas.

Una vez acabado el proceso de aislamiento de DNA se procedió a efectuar una electroforesis en gel de agarosa para evidenciar la existencia de DNA. Los resultados se pueden observar a continuación (Figura 3.8).



**Figura 3.8** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio donde se observan los resultados del aislamiento manual de DNA genómico de muestras artificiales. SC1 y SC2 corresponden a las muestras de sangre completa, CD1 y CD2 a aquellas tratadas por separación de componentes sanguíneos y CN es el control negativo.

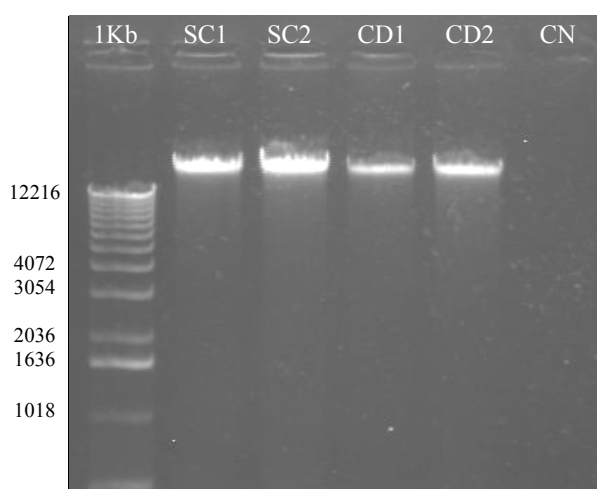
Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, debido a que se esperaba obtener todo el DNA presente en la muestra, ya sea humano o bacteriano y al parecer este método no aísla el *background* genómico humano necesario para la evaluación del sistema.

### 3.6.2 Aislamiento por Kit de DNA Genómico de Muestras Artificiales

Se prepararon cuatro muestras artificiales de 1 mL a partir de cultivos puros de *E. coli*. Las muestras contaminadas fueron tratadas por dupletas, es decir, se conservaron dos tubos como control y a los dos restantes se los sometió a centrifugación diferencial y eliminación de plasma y capa leuco-plaquetaria. Posteriormente, se empleó el protocolo

modificado para aislamiento de DNA genómico bacteriano a partir de muestras de sangre (QIAGEN DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Alemania).

Una vez completado el proceso de aislamiento de DNA se efectuó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia de DNA. Los resultados se pueden observar a continuación (Figura 3.9).



**Figura 3.9** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio donde se observan los resultados del aislamiento con kit de DNA genómico de muestras artificiales donde SC1 y SC2 corresponden a las muestras de sangre completa, CD1 y CD2 a aquellas tratadas por separación de componentes sanguíneos y CN es el control negativo.

Los resultados conseguidos fueron satisfactorios, debido a que se esperaba obtener todo el DNA presente en la muestra, ya sea humano o bacteriano y este método se ajustó a las necesidades del trabajo.

Se realizó una cuantificación de DNA de las muestras mediante fluorometría. Se hicieron dos mediciones y se efectuó el cálculo de concentración de DNA en ng/ $\mu$ L como se muestra en el Anexo 1. La cantidad de DNA determinada mediante este método se detalla a continuación (Tabla 3.30)

**Tabla 3.30** Concentración de DNA calculada por muestra. SC1 y SC2 corresponden a las muestras de sangre completa y CD1 y CD2 a aquellas tratadas por separación de componentes sanguíneos

Muestra Lectura	SC1 (ng/μL)	SC2 (ng/μL)	CD1 (ng/μL)	CD2 (ng/μL)
1°	35,8	43,8	18,88	25,4
2°	35,4	43,6	17,90	25,4
<b>Promedio</b>	35,6	43,7	18,39	25,4

Como se puede observar en el Tabla 3.30, las muestras de sangre completa poseen mayor concentración de DNA que las muestras tratadas por centrifugación diferencial y a las cuales se eliminó el plasma y la capa leuco-plaquetaria.

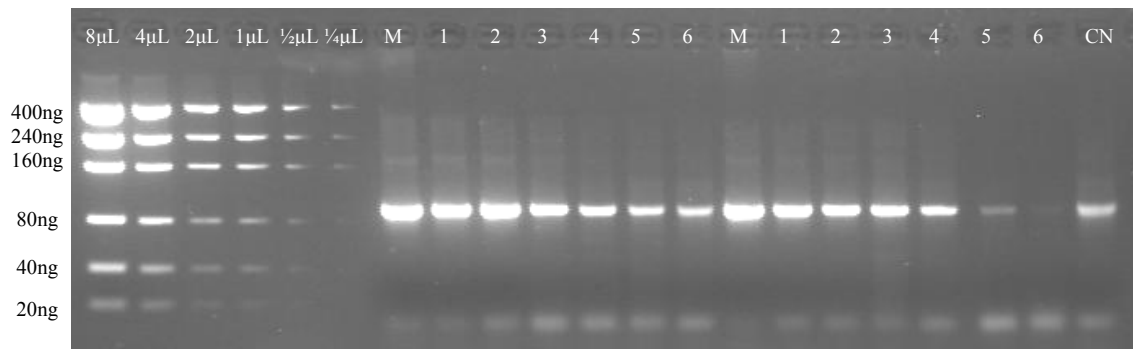
Con el resultado obtenido se puede presumir que las primeras muestras contienen una mezcla de DNA humano y bacteriano, mientras que las últimas poseen únicamente DNA bacteriano debido a la eliminación de leucocitos.

### 3.7 Ensayo Preliminar de Determinación del Límite de Detección del Sistema Diseñado

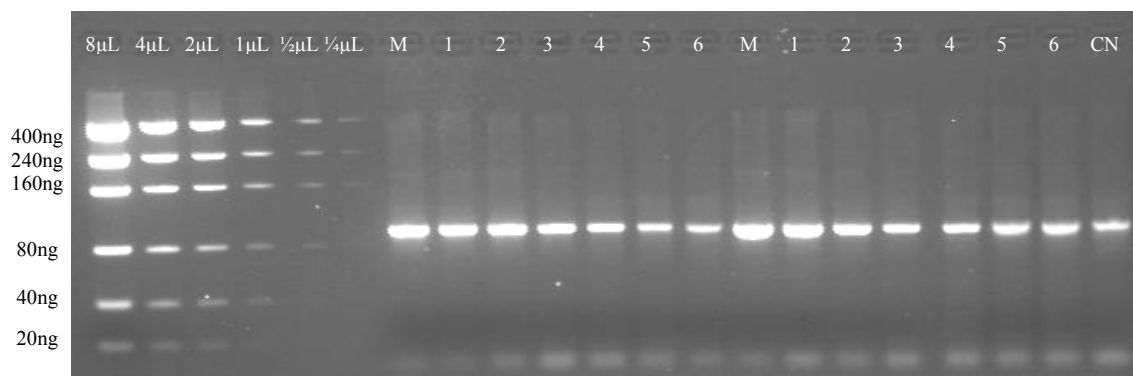
Para este cometido se emplearon las muestras SC2 y CD2 del ensayo anterior y se hicieron seis diluciones del DNA en las proporciones  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$ . Posteriormente, se ensambló una reacción de PCR bajo las condiciones expuestas anteriormente para el sistema 16S rDNA. Las reacciones se hicieron por duplicado para cada dilución de DNA, incluyendo la muestra original. Se empleó un control negativo para cada ensayo.

Luego de transcurrida la reacción de PCR, se procedió a hacer una electroforesis en gel de agarosa al 2% en la que se añadió un marcador molecular cuantitativo (low DNA mass ladder) (Figuras 3.10 y 3.11).





**Figura 3.10** Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR correspondientes a las diluciones de DNA realizadas a partir de la muestra SC2. Los primeros seis carriles corresponden al marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder), M corresponde a la muestra sin diluir, 1 a la dilución  $10^1$ , 2 a la dilución  $10^2$ , 3 a la dilución  $10^3$ , 4 a la dilución  $10^4$ , 5 a la dilución  $10^5$ , 6 a la dilución  $10^6$  y CN al control negativo. El ensayo se hizo por duplicado.



**Figura 3.11** Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR correspondientes a las diluciones de DNA realizadas a partir de la muestra CD2. Los primeros seis carriles corresponden al marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder), M corresponde a la muestra sin diluir, 1 a la dilución  $10^1$ , 2 a la dilución  $10^2$ , 3 a la dilución  $10^3$ , 4 a la dilución  $10^4$ , 5 a la dilución  $10^5$ , 6 a la dilución  $10^6$  y CN al control negativo. El ensayo se hizo por duplicado.

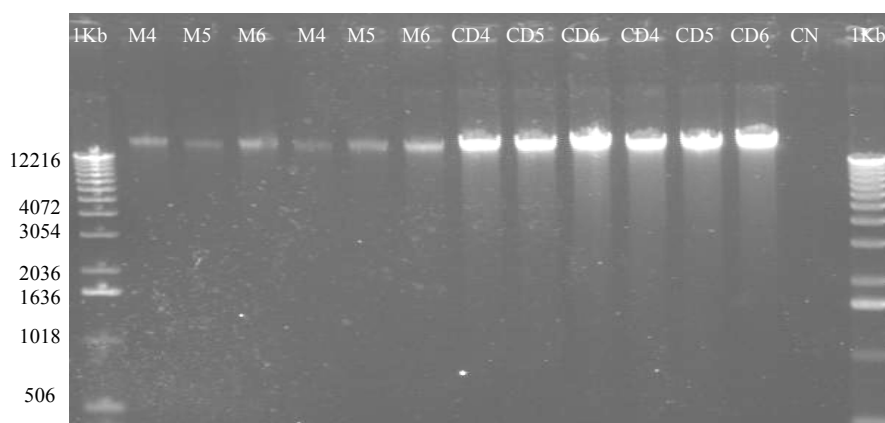
Con este ensayo se demostró que la eliminación del DNA humano de la muestra contaminada promueve la reproducibilidad del ensayo. Dicho hecho se puede evidenciar en la Figura 3.11, en la cual se vislumbra homogeneidad en las dupletas de cada producto de PCR. Mientras tanto, en la figura 3.10 se puede observar la inconsistencia del sistema en presencia de DNA genómico humano, el cual impide una amplificación homogénea de los duplicados.

### 3.8 Ensayo Preliminar del Sistema Diseñado con un Alto Volumen de Muestra

Para este ensayo se preparó un tubo de cultivo puro de *E. coli* en medio líquido. A partir de éste, se prepararon 6 diluciones seriadas con un volumen final de 5 mL, de las cuales se emplearon las tres últimas, es decir, las diluciones  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$ .

Las diluciones seriadas escogidas fueron empleadas para la preparación de muestras artificiales. Para este ensayo se requirió de 3 muestras artificialmente contaminadas de 1 y 5 mL y sus respectivas dupletas. Las muestras de 1 mL fueron denominadas M4, M5 y M6, en función de la dilución seriada a partir de la cual fueron hechas. Las muestras artificiales de 5 mL fueron sometidas a centrifugación diferencial y eliminación de plasma y capa leuco-plaquetaria. A estas muestras se las denominó CD4, CD5 y CD6 según la dilución seriada de la que partieron. Por otro lado, las muestras de 1 mL se procesaron sin ningún tratamiento adicional. Posteriormente, se empleó el protocolo modificado para aislamiento de DNA genómico bacteriano a partir de muestras de sangre (QIAGEN DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Alemania).

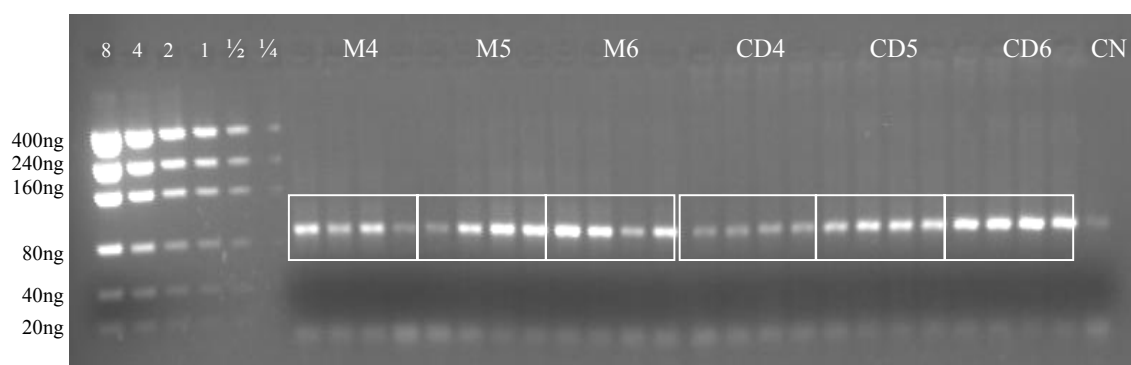
Una vez completado el proceso de aislamiento de DNA se efectuó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia de DNA (Figura 3.12).



**Figura 3.12** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio donde se observan los resultados del aislamiento de DNA con kit del ensayo preliminar del sistema diseñado con empleo de un alto volumen de muestra. M4, M5 y M6 corresponden a las muestras artificiales de 1 mL sin tratar; CD4, CD5 y CD6 a las muestras de 5 mL tratadas por separación de componentes de sangre y CN al control negativo.

Como se puede observar en la Figura 3.12, el sistema diseñado sí soportó altos volúmenes de muestra. Claramente se puede visualizar que la cantidad de DNA obtenido mediante este sistema es mucho mayor a la conseguida por el método de aislamiento habitual, incrementando la posibilidad de detección de los ácidos nucleicos de patógenos en muestras contaminadas. Cabe recalcar que en las muestras M4, M5 y M6 existe presencia de DNA humano y patógeno, mientras que, en CD4, CD5 y CD6 el material genético es únicamente bacteriano.

Para validar el sistema de aislamiento de DNA patógeno con alto volumen de muestra se ensambló una reacción de PCR bajo las condiciones expuestas anteriormente para el sistema 16S rDNA. Las reacciones se hicieron por duplicado y se empleó un control negativo en el ensayo. Luego de transcurrida la reacción de PCR, se procedió a hacer una electroforesis en la que se añadió un marcador molecular cuantitativo (low DNA mass ladder) (Figura 3.13).



**Figura 3.13** Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR del ensayo preliminar del sistema diseñado con empleo de un alto volumen de muestra. Los primeros seis carriles corresponden al marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder) cada valor está dado en  $\mu\text{L}$ , M4, M5 y M6 corresponden al DNA de las muestras artificiales de 1 mL sin tratar; CD4, CD5 y CD6 al DNA de las muestras de 5 mL tratadas por separación de componentes de sangre y CN al control negativo

En esta Figura se evidencia el efecto de la eliminación del *background* genómico humano en el momento del aislamiento. En las primeras muestras se puede observar que ninguna de las dupletas es similar a la otra, mientras que en las tres últimas se visualiza

homogeneidad en los duplicados y entre muestras del mismo tipo. Estos resultados reflejan que el sistema diseñado es reproducible y puede ser usado con volúmenes de muestra mucho más grandes a los empleados hoy en día.

### 3.9 Determinación del Límite de Detección del Sistema de Alta Capacidad Diseñado para Aislamiento de DNA de Patógenos en Muestras de Sangre

#### 3.9.1 Preparación y Procesamiento de Muestras Contaminadas con *E. coli*

##### 3.9.1.1 Obtención de Cultivos Puros en Agar y Medio Líquido

Se obtuvieron buenos resultados en agar como medio líquido, por lo tanto se procedió a la realización de las diluciones seriadas y sus correspondientes siembras microbiológicas.

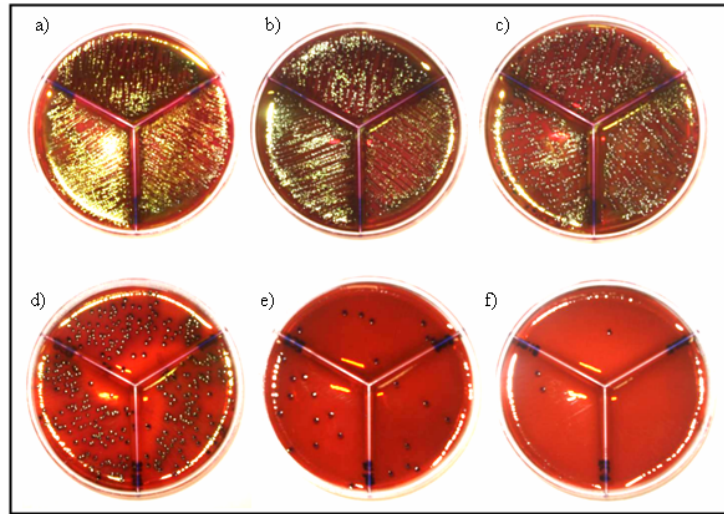
##### 3.9.1.2 Preparación y Evaluación de Diluciones Seriadas

Para el procesamiento se usó el *Sistema 2* y el *Sistema B*. Las siembras se realizaron a partir de las diluciones  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , y  $10^7$ . La inoculación se realizó con asa calibrada a 0.01 mL, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU fueron multiplicados por 100 para la obtención de la concentración de CFU/mL de solución. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.31 y Figura 3.14.

**Tabla 3.31** Resultados del recuento de CFU de las diluciones seriadas de *E. coli* para preparación de muestras artificiales del ensayo de determinación del límite de detección del sistema de alta capacidad diseñado para aislamiento de DNA de patógenos en muestras de sangre.

Dilución Réplica	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^{10}$
1	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	128	8	2
2	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	150	14	1
3	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	133	9	0
<b>Promedio</b>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	N.C. <sup>†</sup>	135,33	10,33	1,00

<sup>†</sup> Incontable



**Figura 3.14** Resultados del recuento de CFU de las diluciones seriadas de *E. coli*. a)  $10^2$ , b)  $10^3$ , c)  $10^4$ , d)  $10^5$ , e)  $10^6$  y f)  $10^7$ .

A partir de estos resultados se calculó la concentración de CFU/mL de solución. Para el procesamiento de datos se empleó el promedio de cada resultado (Tabla 3.32).

**Tabla 3.32** Concentración bacteriana calculada por tubo de dilución seriada de *E. coli* para preparación de muestras artificiales del ensayo de determinación del límite de detección del sistema de alta capacidad diseñado para aislamiento de DNA de patógenos en muestras de sangre.

Bacteria	Dilución	Concentración (CFU/mL)
<i>E. coli</i>	$10^2$	N.D. <sup>†</sup>
	$10^3$	N.D. <sup>†</sup>
	$10^4$	N.D. <sup>†</sup>
	$10^5$	13533
	$10^6$	1033
	$10^7$	100

<sup>†</sup> Indeterminada

### 3.9.1.3 Preparación de Muestras Artificiales

Las muestras artificiales (5 mL) fueron preparadas a partir de las diluciones seriadas  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$ . Las muestras contaminadas fueron preparadas por duplicado, para de esta manera conservar un tubo como control y al otro someterlo a centrifugación

diferencial y hacer una comparación de los resultados obtenidos. Las muestras artificiales fueron denominadas MEC5, MEC6, MC7 y MC8, respectivamente.

#### **3.9.1.4 Evaluación de Muestras Artificiales por Recuento de CFU**

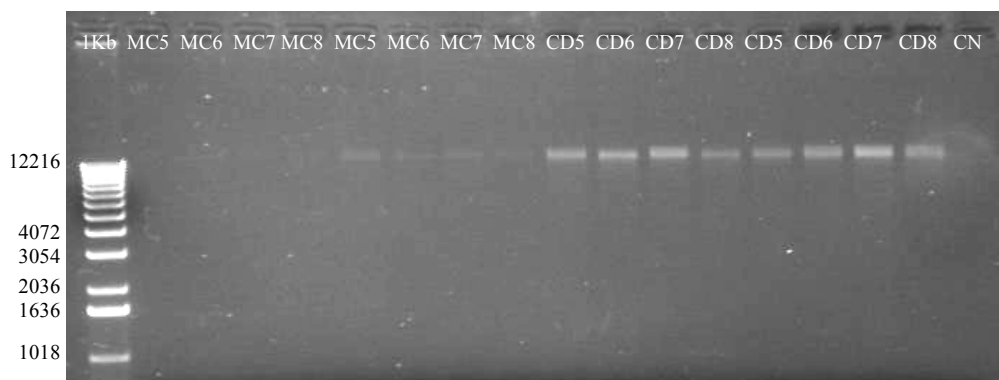
Uno de los tubos de cada dupleta de muestras artificiales fue sometido a centrifugación diferencial, mientras que el otro se conservó como un control. Luego de la separación de componentes sanguíneos al primer tubo se le retiró el plasma y la capa leuco-plaquetaria y posteriormente se trabajó con la capa restante conocida como capa eritrocitaria.

La siembra se realizó con asa calibrada a 0.01 mL, por lo tanto, los resultados obtenidos en el conteo de CFU debieron multiplicarse por 100 para la obtención de la concentración de CFU/mL de muestra tratada o control. Lastimosamente, no se obtuvieron resultados. Se presume que la sangre empleada para el ensayo poseía inhibidores de crecimiento bacteriano. Sin embargo, según los resultados obtenidos en las diluciones seriadas se estima que las muestras MEC5, MEC6, MC7 y MC8 poseen 1000, 100, 10 y 1 CFU/mL, respectivamente, ya sean tratadas o no con centrifugación diferencial y eliminación de plasma y capa leuco-plaquetaria.

#### **3.9.2 Aislamiento de DNA**

Para este ensayo se requirió de 3 muestras contaminadas de 1 y 5 mL y sus respectivas dupletas. Las muestras de 1 mL fueron denominadas MC5, MC6, MC7 y MC8, en función de la dilución seriada a partir de la cual fueron hechas. Las muestras artificiales de 5 mL fueron sometidas a centrifugación diferencial y eliminación de plasma y capa leuco-plaquetaria. A estas muestras se las denominó CD5, CD6, CD7 y CD8 según la dilución seriada de la que partieron. Por otro lado, las muestras de 1 mL se procesaron sin ningún tratamiento adicional. Posteriormente, se empleó el protocolo modificado para aislamiento de DNA genómico bacteriano a partir de muestras de sangre (QIAGEN DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Alemania).

Una vez finalizado el proceso de aislamiento de DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa para evidenciar la presencia de DNA. Los resultados se observan en la Figura 3.15.



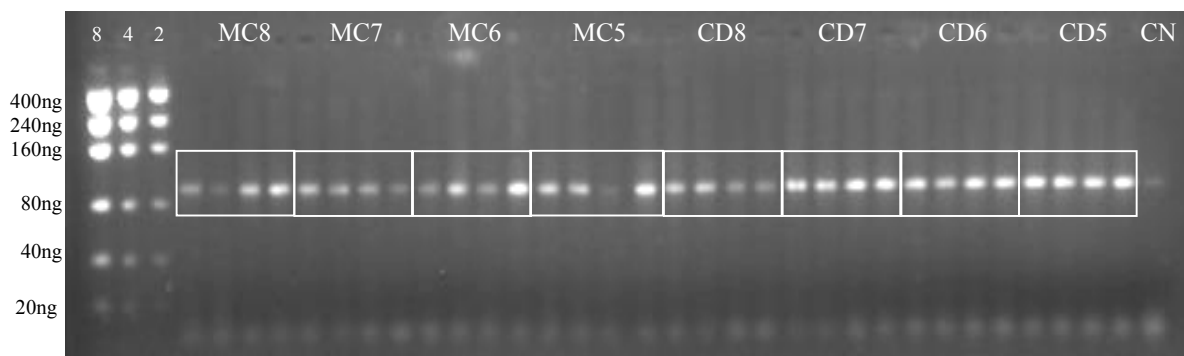
**Figura 3.15** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio donde se observan los resultados del aislamiento de DNA con kit del ensayo de determinación del límite de detección del sistema de alta capacidad diseñado para aislamiento de DNA de patógenos en muestras de sangre. MC5, MC6, MC7 y MC8 corresponden a las muestras artificiales de 1 mL sin tratar y CD5, CD6, CD7 y CD8 a las muestras de 5 mL tratadas por separación de componentes de sangre y CN al control negativo.

Los resultados obtenidos fueron los esperados. Por lo tanto, se procedió a la realización de un ensayo de 16S rDNA PCR.

### 3.9.3 16S rDNA PCR

Se ensambló la reacción bajo las condiciones mostradas inicialmente para el sistema 16S rDNA. Las reacciones se hicieron por duplicado y se empleó un control negativo en el ensayo.

Luego de transcurrida la reacción de PCR, se procedió a hacer una electroforesis en la que se añadió un marcador molecular cuantitativo (low DNA mass ladder) (Figura 3.16).



**Figura 3.16** Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR del ensayo de determinación del límite de detección del sistema de alta capacidad diseñado para aislamiento de DNA de patógenos en muestras de sangre. Los primeros tres carriles corresponden al marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder) cada valor está dado en  $\mu\text{L}$ , MC5, MC6, MC7 y MC8 corresponden al DNA de las muestras artificiales de 1 mL sin tratar; CD5, CD6, CD7 y CD8 al DNA de las muestras de 5 mL tratadas por separación de componentes de sangre y CN al control negativo.

En este ensayo se ratificó que la eliminación del DNA genómico humano mejora las reacciones de PCR, debido a que anula la interferencia que éste genera al momento de la reacción. Además, se observa una mejor reproducibilidad de la prueba al emplear el sistema de aislamiento diseñado, por lo que se puede determinar un límite de detección de manera más precisa.

Según los resultados obtenidos, este sistema puede detectar menos de 1 CFU/mL de sangre. Si tomamos en cuenta el número de CFU/mL presente en bacteriemias en adultos y niños, la implementación de este método de aislamiento podría ayudar al diagnóstico de bacteriemias de bajo nivel.

### **3.10 Evaluación del Sistema de Alta Capacidad de Aislamiento de DNA de Patógenos en Sangre con Muestras Clínicas**

Para la evaluación del sistema de alta capacidad de aislamiento de DNA patógeno en muestras de sangre, se emplearon dos muestras clínicas pertenecientes a una misma paciente del Hospital de Niños Baca Ortiz de Quito. Esta paciente ingresó al área de cirugía



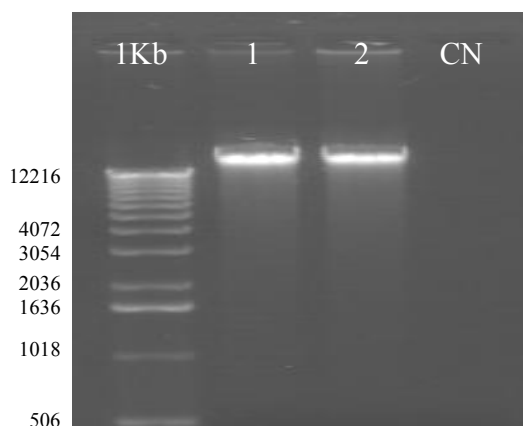
pediátrica con diagnóstico de sepsis. La información de la niña se presenta a continuación (Tabla 3.33).

**Tabla 3.33** Información de la paciente de la cual se obtuvieron las muestras para la evaluación del sistema de alta capacidad de aislamiento de DNA patógeno en sangre con muestras clínicas.

<b>Edad</b>	2 años
<b>Sepsis</b>	Positivo (Hemocultivo)

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron centrifugadas diferencialmente y se eliminó el plasma y la capa leuco-plaquetaria de las mismas. Luego, se procedió a realizar la extracción de ácidos nucleicos por medio del protocolo modificado para aislamiento de DNA genómico bacteriano a partir de muestras de sangre (QIAGEN DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Alemania).

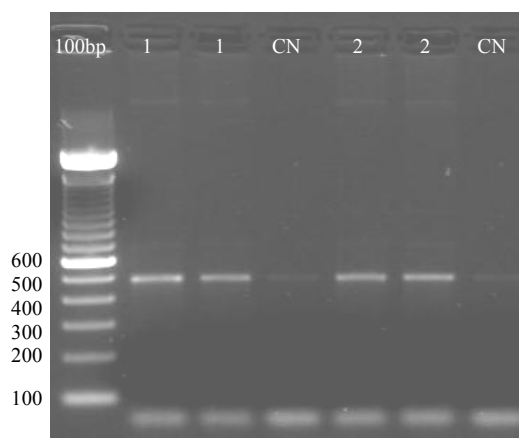
Una vez terminado el proceso de aislamiento de DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para visualizar la presencia de DNA y se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 3.17)



**Figura 3.17** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio donde se observan los resultados del aislamiento de DNA con kit del ensayo evaluación del sistema de alta capacidad de aislamiento de DNA patógeno en sangre con muestras clínicas. 1 y 2 corresponden a las muestras clínicas y CN al control negativo.

Se confirmó la presencia de DNA, por lo tanto se procedió a realizar una prueba de 16S rDNA PCR. Con este ensayo se probó si el sistema diseñado funciona con muestras clínicas. Se ensambló la reacción bajo las condiciones mostradas anteriormente para el sistema 16S rDNA. Las reacciones se hicieron por duplicado y se empleó un control negativo para cada dupleta.

Luego de transcurrida la reacción de PCR, se procedió a hacer una electroforesis en gel de agarosa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.18.



**Figura 3.18** Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR del ensayo de evaluación del sistema de alta capacidad de aislamiento de DNA patógeno en sangre con muestras clínicas. 1 y 2 corresponden a las muestras clínicas y CN a los controles negativos.

El ensayo funcionó perfectamente con muestras clínicas, en este caso en particular se ratificó la presencia de DNA bacteriano en la muestra, lo cual apoya la presunción clínica de sepsis en la paciente.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Las infecciones sistémicas son de vital importancia en el área de investigación biomédica, debido a que conllevan tasas de morbilidad y mortalidad elevadas. La presencia de bacterias en la sangre en un proceso infeccioso incrementa las tasas de complicaciones y muerte, ubicándose dichas tasas en rangos del 20 a 50% (Reimer *et al.*, 1997).

El análisis molecular es un complemento valioso en el diagnóstico precoz de este tipo de patologías, ya que puede contribuir con valiosa información en ocasiones en las que los métodos tradicionales no son suficientemente sensibles y rápidos para la obtención de resultados (Reno *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2003). Sin embargo, estos sistemas presentan algunos limitantes, tales como la falta de estandarización y reproducibilidad en el uso de la técnica de aislamiento de DNA de patógenos en muestras clínicas, así como, la carencia de sistemas de extracción de alta capacidad que soporten grandes volúmenes de muestra (Ley *et al.*, 1998).

Este estudio aportó a la superación de estos limitantes mediante el diseño de una técnica de extracción de ácidos nucleicos que elimina el *background* genómico humano, incrementando la eficiencia de detección de DNA de patógenos en muestras clínicas. Además, este método permite el procesamiento de altos volúmenes de muestra, hecho que incrementa la sensibilidad del sistema posibilitando el diagnóstico de bacteriemias de bajo nivel.

Debido a que los agentes etiológicos más comunes en bacteriemias son *Escherichia coli* (Gram-negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), se decidió emplearlos como microorganismos modelo de este estudio (Reimer *et al.*, 1997). Sin embargo, como se presenta en los resultados de los ensayos microbiológicos de recuento de CFU, *S. aureus* no se comportó adecuadamente. Se presume que este hecho se debe a que, las cepas empleadas para los ensayos fueron sometidas a un estrés excesivo y por lo tanto perdieron su viabilidad. Para superar este inconveniente, se decidió emplear otra cepa

bacteriana Gram-positiva, *Enterococcus faecalis*, con la que se obtuvieron los resultados deseados.

Conociendo de antemano que las bacterias pueden adherirse a las células sanguíneas, en especial linfocitos, mediante fuerzas físico-químicas o por especificidad del microorganismo a determinada superficie (Henderson *et al.*, 2000), fue necesario el análisis de muestras contaminadas a través de recuento de CFU, para de esta manera conocer si la pérdida de bacterias en el proceso de eliminación de componentes de la sangre afectaba de manera significativa los resultados del ensayo.

Para conseguir la eliminación del DNA genómico humano, se decidió emplear la técnica de centrifugación diferencial, ya que con ésta se consigue separar muestras sanguíneas en sus componentes principales: plasma, linfocitos y eritrocitos (Anaya *et al.*, 2005). La fase de interés para el estudio fue la capa eritrocitaria, por lo que al descartar el plasma y la capa leuco-plaquetaria se cumplió con el fin de anular el *background* genómico humano presente en linfocitos y mantener a las bacterias en la fracción restante de la muestra. La evaluación de este proceso demostró que no existe una pérdida representativa de microorganismos, es decir que la eliminación del DNA humano no afecta a los resultados que se puedan obtener a partir de la muestra. Además, se consigue la concentración de las bacterias en una pequeña fracción de la sangre, hecho que aporta al sistema de aislamiento de DNA.

Una vez cumplido el análisis de muestras artificiales, se procedió a probar métodos de aislamiento de DNA que provean el material genético necesario para la evaluación del sistema, que en este caso se refiere a la totalidad del DNA presente en la muestra artificialmente contaminada, ya sea humano o bacteriano.

El posible organismo blanco de una prueba de PCR de amplio espectro puede ser altamente inestable en su capacidad de soportar procedimientos físicos y químicos (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002). Por lo tanto, se requiere que el método de aislamiento de DNA genómico bacteriano empleado pueda lisar las paredes más resistentes (bacterias

Gram positivas) sin dañar indirectamente el DNA blanco purificado de especies más frágiles (bacterias Gram negativas) (Coyne *et al.*, 2004). Los dos sistemas examinados cumplen con estas características y están basados en un cóctel enzimático con el fin de obtener DNA de ambos tipos de bacterias con igual eficiencia y sin comprometer a los ácidos nucleicos de las especies más sensibles a ruptura celular.

El sistema de extracción manual modificado no se acomodó a los requerimientos necesarios para la evaluación del sistema debido a que se comportó selectivamente, es decir, no todas las especies de DNA en la muestra fueron aisladas con la misma eficiencia. Se presume que este hecho se debió a que la muestra no estuvo incubada por suficiente tiempo con proteinasa K, limitando la liberación del DNA genómico humano. Sin embargo se comprobó con este método que la eliminación del plasma y el *buffy coat* mejora la extracción de DNA de patógenos en muestras clínicas.

El método modificado para aislamiento de ácidos nucleicos por kit de adsorción a columnas de sílica fue altamente eficiente para la extracción del DNA presente en la muestra. Por lo tanto, este sistema fue elegido para realizar la eliminación de DNA genómico humano y posteriormente demostrar que la exclusión de éste disminuye la interferencia que el DNA genómico produce en la reacción de PCR y hace al ensayo más reproducible. Además, este método fue usado para el procesamiento de altos volúmenes de muestra sin perder su eficiencia.

El sistema de aislamiento diseñado fue validado mediante el uso de 16S rDNA PCR, debido a que la amplificación directa del DNA bacteriano a partir de muestras artificialmente contaminadas mediante el uso de PCR de amplio espectro es una ventaja para la determinación de patógenos infecciosos en tejidos comúnmente estériles (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002).

La presencia de un amplicón de 476 bp en el control negativo, en todos los ensayos de 16S rDNA PCR, se generó por contaminación de reactivos que provienen de una fuente bacteriana, como la *Taq* polimerasa. Este, como otros reactivos, puede contener

DNA contaminante como resultado de su manufactura y su incompleta purificación (Corless *et al.* 2000; Newsome *et al.*, 2004).

El efecto de la eliminación del *background* genómico humano en el momento del aislamiento se ve evidenciado en las Figuras 3.13 y 3.16. Se puede observar que los productos de PCR pertenecientes a las muestras procesadas sin ningún tratamiento adicional no presentan uniformidad alguna en la amplificación. Mientras tanto, en las muestras tratadas por eliminación del plasma y linfocitos se visualiza homogeneidad en los duplicados y entre muestras del mismo tipo. Estos resultados reflejan que el sistema diseñado es reproducible y puede ser usado con grandes volúmenes de muestra.

Con este sistema se puede detectar menos de 1 CFU/mL de sangre. Por lo tanto, la implementación de este método de aislamiento puede ayudar al diagnóstico de bacteriemias de bajo nivel.

La evaluación del sistema con muestras clínicas fue exitosa. Se ratificó el diagnóstico tradicional por hemocultivo de una paciente del Hospital de Niños Baca Ortiz de la ciudad de Quito mediante el uso de esta técnica.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Se modificó exitosamente un sistema de extracción de DNA basado en columnas de sílica, empleando altos volúmenes de muestra de sangre y haciendo uso de técnicas de centrifugación diferencial y separación de componentes de sangre.
- Luego de la centrifugación diferencial la mayoría de las bacterias presentes en una muestra contaminada se encuentran en la capa eritrocitaria de la misma.
- El proceso de eliminación del DNA genómico humano no disminuye representativamente el número de CFU/mL de muestra.
- Se puede eliminar el *background* genómico humano de una muestra clínica mediante la eliminación del plasma y la capa leuco-plaquetaria.
- Este sistema de aislamiento de DNA de patógenos a partir de muestras clínicas soporta grandes volúmenes de muestra sin que su eficiencia se vea alterada.
- La sensibilidad analítica del sistema se incrementa mediante la eliminación del *background* genómico humano.
- El sistema de extracción manual modificado no se acopló a los requerimientos necesarios para la evaluación del sistema debido a que se comportó selectivamente. Sin embargo se demostró con esta técnica que la eliminación del plasma y el *buffy coat* mejora la extracción de DNA de patógenos en muestras clínicas.
- El método modificado para aislamiento de ácidos nucleicos por kit extrae gran parte del DNA presente en la muestra. Por lo tanto, sirvió para demostrar que la eliminación del DNA humano presente en una en sangre mejora la eficiencia del sistema de detección.

- Se confirma la hipótesis propuesta de que la eliminación del DNA genómico humano, presente en leucocitos facilita el diagnóstico bacteriano por PCR, anulando la interferencia que éste produce en la reacción y permitiendo determinar experimentalmente los verdaderos límites de detección en muestras clínicas.
- Mediante el uso de este método de aislamiento de DNA bacteriano se consigue un límite de detección por 16S rDNA PCR menor a 1 CFU/mL de muestra.
- El sistema funciona eficientemente en muestras clínicas y ratifica los resultados obtenidos por hemocultivo.
- La presencia de un amplicón de 476 bp en el control negativo, en todos los ensayos de 16S rDNA PCR, se generó por problemas con la contaminación de reactivos.



## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- El seguir adecuadamente las normas de bioseguridad, incluyendo los requerimientos de infraestructura y diseño del laboratorio, permite un mayor control de la contaminación. Por lo tanto, se recomienda que los materiales y equipos empleados en un sitio específico no sean trasladados del lugar designado y que las áreas designadas para trabajo cumplan con las normas adecuadas, así como la preparación del personal del laboratorio.
- Se recomienda el uso de ensayos preliminares para establecer el correcto funcionamiento de los sistemas a emplearse.
- Se recomienda trabajar todas las muestras que contengan bacterias en fresco, debido a que la congelación y la refrigeración disminuyen la viabilidad debido al estrés que el cambio de temperatura genera en los microorganismos.
- El uso de un asa calibrada para los ensayos de recuento de CFU aporta con mejores resultados a los obtenidos con triángulos de Drigalski. Las colonias presentes en las cajas con medio de cultivo se ven mejor diseminadas y su morfología es más definida.
- La PCR de amplio espectro es más propensa a contaminación con DNA exógeno que otros ensayos de PCR. Por lo tanto, se deben tomar las precauciones necesarias para asegurar la obtención de resultados precisos.
- La sensibilidad del sistema puede mejorarse mediante la utilización de una *Taq* polimerasa de alta eficiencia.
- Se recomienda el empleo de DNasas en la reacción de PCR o la descontaminación del sistema para evitar la incidencia de falsos positivos.

- Para la conservación adecuada de los reactivos, es recomendable hacer alícuotas de estos antes de su uso. Además, de esta manera se disminuye significativamente la contaminación de los mismos y por ende la de la reacción.
- Se recomienda complementar el presente estudio con una fase de validación clínica a mayor escala. Este estudio deberá incluir una fase de descontaminación del ensayo de PCR de amplio espectro y un sistema complementario de identificación del patógeno presente en la muestra.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Aellen, S., Que, Y., Guignard, B., Haenni, M. & Moreillon, F. 2006. *Detection of live and antibiotic-killed bacteria by quantitative real-time PCR of specific fragments of rRNA*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(6), 1913-1920.
2. Anaya, J., Shoenfeld, Y., Correa, P., García, M. & Cervera, M. 2005. *Autoinmunidad y Enfermedad Autoimmune*. Corporación para Investigaciones Biológicas.
3. Angus, D., Burgner, D., Wunderink, R., Mira, J., Gerlach, H., Widermann, C. & Vincent, J. 2003. *The PIRO concept: P is for predisposition*. Critical Care, 7, 248-251.
4. Brunn, G. & Platt, J. 2006. *Etiology of sepsis: turned inside out*. Trend of Molecular Medicine, 12(1), 10-16.
5. Cabrera, J. y Herráez, M. 2001. *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud (3ra edición)*. Madrid: Harcourt.
6. Corless, C., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarek, E. & Fox, A. 2000. *Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rDNA PCR*. Journal of Clinical Microbiology, 38(5), 1747-1752.
7. Coyne, S., Craw, P., Norwood, D. & Ulrich, M. 2004. *Comparative analysis of the Schleicher and Schuell isocode stix DNA isolation device and the Qiagen QIAamp DNA mini kit*. Journal of Clinical Microbiology, 42(10), 4859-4862.
8. Crowley, P. 2002. *Prophylactic corticosteroids from preterm birth*. Cochrane Database Systems Reviews, 4, 2002.
9. Cursons, R., Jeyerajah, E. & Sleigh, J. *The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critical ill patients*. Critical Care Medicine, 27, 937-940.
10. Flaatten, H. 2004. *Epidemiology of sepsis in Norway in 1999*. Critical Care, 8, 180-184.

11. Goldenberger, D., Künzli, A., Vogt, P., Zbinden, R. & Altwegg, M. 1997. *Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing.* Journal of Clinical Microbiology, 35(11), 2733–2739.
12. Granja, C., Dias, C., Costa-Pereira, A. & Sarmento, A. 2004. *Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness.* Critical Care, 8, 91-98.
13. Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A. & Leong, D. 1994. *PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid.* Journal of Clinical Microbiology, 32(2), 335-351.
14. Harris, K. & Hartley, J. 2003. *Development of a broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service.* Journal of Medical Microbiology, 52, 685-691.
15. Henderson, B., Wilson, M. & McNab, R. 2000. *Cellular Microbiology: Bacteria-Host Interactions in health and Disease.* Great Britain: Wiley.
16. Hendolin, P., Paulin, L. & Ylikoski, J. 2000. *Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens.* Journal of Clinical Microbiology, 38, 125-132.
17. Horisberger, T., Harbarth, S., Nadal, D., Baenziger, O., & Fischer, J. 2004. *G-CSF and IL-8 for Early Diagnosis of Sepsis in Neonates and Critically Ill Children – Safety and Cost Effectiveness of a New Laboratory Prediction Model: Study Protocol of a Randomized Controlled Trial [ISRCTN91123847].* Critical Care, 8(6), 443-450.
18. Hughes, M., Beck, L. & Skuce, R. 1994. *Identification and elimination of DNA sequences in taq DNA polymerase.* Journal of Clinical Microbiology, 32(8), 2007-2008.
19. Invitrogen Corporation. 2007. *Qubit Fluorometer.* Invitrogen, Molecular Probes. <http://probes.invitrogen.com/products/qubit/index.html>

20. Izquierdo, A. 2007. *Diseño y Optimización de un Sistema de Diagnóstico Molecular de sepsis Neonatal mediante la Técnica de PCR-RFLP a partir de Cultivos Bacterianos*. Sangolquí.
21. Jordan, J. & Durso, M. 2000. *Comparison of 16S rRNA gene PCR and Bactec 9240 for detection of neonatal bacteremia*. Journal of Clinical microbiology, 38(7), 2574-2578.
22. Kaufman, D. & Fairchild, K. 2004. *Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants*. Clinical microbiology Reviews, 17(3), 638-680.
23. Lawrence, S., Roth, V., Slinger, R. Toye, B., Gaboury, I. & Lemyre, B. 2005. *Cloxacillin versus vancomycin for presumed late-onset sepsis in the Neonatal Intensive Care Unit and the impact upon outcome of coagulase negative staphylococcal bacteremia: a retrospective cohort study*. BMC Pediatrics, 5(49), 1471-1479.
24. Ley, B., Linton, C., Bennett, D., Jalal, H., Foot, A. & Millar, M. 1998. *Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction*. European Journal of Clinical Microbiology, 17, 247-253.
25. Mackay, I. 2004. *Real-time PCR in the microbiology laboratory*. Clinical Microbiology Infections, 10, 190–212.
26. Makhoul, I., Smolkin, T., Sujov, P., Kassis, I., Tamir, A., Shalginov, R. & Sprecher, H. 2005. *PCR-based diagnosis of neonatal staphylococcal bacteremias*. Journal of Clinical Microbiology, 43(9), 4823–4825.
27. Marienfeld Laboratory Glassware. 2007. *Información Cámara de Recuento*.
28. Meier, A., Persing, D., Finken, M. & Böttger, E. 1993. *Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens*. Journal of Clinical Microbiology, 31(3), 646-652.
29. Merck. 2000. *Microbiology Manual*.

30. Murray, P., Baron, E., Tenover, J., Tenover, J., Pfaller, M. & Tenover, R. 2003. *Manual of Clinical Microbiology (8<sup>th</sup> edition)*. Washington D.C.: ASM PRESS.
31. Petti, C. 2007. *Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing*. Medical Microbiology, 44, 1108-1114.
32. Rallu, F., Barriga, P., Scrivo, C., Martel-Laferrière, V. & Laferrière, C. 2006. *Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B Streptococcus carriage in pregnant women*. Journal of Clinical Microbiology, 44(3), 725-728.
33. Rantakokko-Jalava, K. & Jalava, J. 2002. *Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR*. Journal of Clinical Microbiology, 40(11), 4211-4217.
34. Rantakokko-Jalava, K., Nikkari, S., Jalava, J., Eerola, E., Skurnik, M., Meurman, O., Ruuskanen, O., Alanen, A., Kotilainen, E., Toivanen, P. & Kotilainen, P. 2002. *Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections*. Journal of Clinical Microbiology, 38(1), 32-39.
35. Reimer, L., Wilson, M. & Weinstein, M. 1997. *Update on detection of bacteremia and fungemia*. Clinical Microbiology Reviews, 10(3), 444-465.
36. Reno, W., McDaniel, O., Turner, W. & Williams, M. 2001. *Polymerase chain reaction for the detection of bacteremia*. The American Surgeon, 67.
37. Riedemann, N., Guo, R. & Ward, P. 2003. *The enigma of sepsis*. Journal of Clinical Investigation, 112, 460-467.
38. Rocio, M. y Mendoza, M. 2004. *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Enfermedades Infecciosas en Microbiología Clínica, 22(4), 238-245.
39. Sastre, J., Pérez, D., Roqués, V., Fernández, B., Coto, D., Krauel, X., Narbona, E., García, M., Sánchez, L., Belaustegui, A., Moro, M., Urbón, A., Iglesias, E., Coteró, A.,

- Martínez, E., & Jiménez, B. 2006. *Procalcitonin is not Sufficiently Reliable to be the Sole Marker of Neonatal Sepsis of Nosocomial Origin*. BMC Pediatrics, 6(16).
40. Smith, K., Diggle, A. & Clarke, S. 2003. *Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples*. Journal of Clinical Microbiology, 41(6), 2440-2443.
41. Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Heidenberg: Springer-Verlag Berlin.
42. Tanner, M., Goebel, M., Dojka, M. & Pace, N. 1998. *Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental setting correlate with experimental contaminants*. Applied and Environmental Microbiology, 64(8), 3110-3113.
43. Torres, R., Oletta, C. & Zlotnik, H. 1996. *A rapid and gentle method for isolation of genomic DNA from pathogenic Nocardia spp.* Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 3(5), 601–604.
44. Turenne, C., Witwicki, E., Hoban, D., Karlowsky, J. & Kabani, A. 2000. *Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene*. Journal of Clinical Microbiology, 38, 513-520.
45. Van Amersfoort, E., Van Berkel, T. & Kuiper, J. 2003. *Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock*. Clinical Microbiology Reviews, 16(3), 379–414.
46. Warwick, S., Wilks, M., Hennesy, E., Powell-Tuck, J., Small, M., Sharp, J. & Millar, M. 2003. *Use of quantitative 16S ribosomal DNA detection for diagnosis of central vascular catheter-associated bacterial infection*. Journal of Clinical Microbiology, 42, 1042-1408.
47. Weinstein, M., Towns, M., Quartey, S., Mirret, S., Reimer, L., Parmigiani, G. & Reller, L. 1997. *The clinical significance of positive blood cultures in the 1990's: a prospective*

*comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology and outcome of bacteremia and fungemia in adults.* Clinical Infectious Disease, 24, 584-602.

48. Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. & Lane, D. 1991. *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.* Journal of Bacteriology, 173(2), 697-703.
49. White, P., Archer, A. & Barnes, R. 2005. *Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive Candida infections.* Journal of Clinical Microbiology, 43(5), 2181-2187.
50. Wilson, K., Blichington, R. & Greene, R. 1990. *Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction.* Journal of Clinical Microbiology, 28(9), 1942-1946.



## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**16S rDNA:** Este es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nt codificado por el gen *rrs*. Las secuencias altamente conservadas pertenecientes a este gen, contribuyen al diseño de *primers* para un ensayo de PCR amplio espectro.

**Amplicón:** Fragmento de DNA sintético producto de un proceso de amplificación.

**Buffy coat:** O capa leuco-plaquetaria, es la fracción de sangre centrifugada que contiene la mayoría de linfocitos.

**Cebador:** Secuencia corta de nucleótidos no mayor a 20 unidades nucleotídicas.

**Centrifugación Diferencial:** Técnica de separación de componentes de una sustancia basada en el uso de la fuerza centrífuga.

**Denaturación de DNA:** Separación total o parcial de las hebras de un fragmento bicatenario de DNA como consecuencia del calentamiento o de la exposición a agentes químicos o enzimáticos determinados.

**DNA Genómico:** Todas las secuencias de DNA que componen el genoma de un organismo.

**DNA polimerasa:** Enzima que copia una hebra de DNA para formar una hebra complementaria que compone una nueva molécula bicatenaria de DNA. Todas las DNA polimerasa agregan desoxirribonucleótidos en dirección 5' → 3'.

**DNA:** Biopolímero cuyas unidades son desoxirribonucleótidos y que constituye el material genético de las células y contiene en su secuencia la información para la síntesis de proteínas.

**Electroforesis:** Técnica de separación de macromoléculas basada en la migración sobre un soporte físico sometido a un fuerte campo eléctrico.

**Enzimas:** Proteína que cataliza específicamente cada una de las reacciones bioquímicas del metabolismo.

**Fluorocromo:** Cualquiera de las moléculas capaces de producir fluorescencia como efecto de su excitación inducida por una longitud de onda luminosa o como producto secundario de una reacción química o cambio conformacional.

**Gen:** Secuencia de DNA que constituye la unidad funcional para la transmisión de los caracteres hereditarios.

**Hemocultivo:** Es un examen para determinar si microorganismos como bacterias u hongos están presentes en la sangre.

**PCR:** Reacción química en la cual se produce una síntesis bidimensional repetitiva de una secuencia específica de ácido nucleico en cantidades limitadas por acción de la DNA polimerasa.

**RNA:** Biopolímero cuyas unidades son ribonucleótidos. Según su función se dividen en mensajeros, ribosómicos y transferentes.

**Sepsis:** Afección generalizada producida por la presencia en la sangre de microorganismos patógenos o de sus toxinas.

**Termociclador:** Equipo empleado en biología molecular que permite aplicar ciclos rápidos y continuos de temperatura para el proceso de síntesis de DNA.

## ANEXO 1

### Cálculo de la Concentración de DNA medida en un fluorómetro Qubit™

Para calcular la concentración final de DNA de la muestra es necesario el empleo de la siguiente fórmula:

$$C = Qf \times \frac{200 \mu L}{x}$$

donde  $Qf$  es la lectura dada por el fluorómetro,  $x$  es el volumen en microlitros de muestra empleada y  $C$  es la concentración en ng/mL de DNA encontrado. Para obtener la respuesta en ng/ $\mu$ L el resultado fue dividido para 1000.