

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE  
AMPLIO ESPECTRO BASADO EN LA AMPLIFICACIÓN  
DE UN FRAGMENTO DEL GEN ADN RIBOSOMAL 16S  
MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA EN TIEMPO REAL PARA SU  
APLICACIÓN COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO E  
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR EN INFECCIONES  
BACTERIANAS LOCALES”**

**Previa a la obtención del Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**GABRIELA GEORGINA ZAPATA ERAZO**

**SANGOLQUÍ, NOVIEMBRE DEL 2011**

# HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

---

Gabriela Georgina Zapata Erazo

COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

---

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

**Lugar y fecha:** Sangolquí, 25 de noviembre 2011.

## CERTIFICACIÓN

Dr. Marcelo Grijalva

Ing. Paola Párraga

### **Certifican:**

Que el trabajo titulado “DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE AMPLIO ESPECTRO BASADO EN LA AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN ADN RIBOSOMAL 16S MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL PARA SU APLICACIÓN COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR EN INFECCIONES BACTERIANAS LOCALES”, realizado por GABRIELA GEORGINA ZAPATA ERAZO, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a la relevancia científica y académica del presente trabajo recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a GABRIELA GEORGINA ZAPATA ERAZO que lo entregue a ING. GRACE TATIANA PÁEZ BARRERA, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 25 de noviembre de 2011.

---

**Dr. Marcelo Grijalva**  
DIRECTOR

---

**Ing. Paola Párraga**  
CODIRECTORA

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Yo, Gabriela Georgina Zapata Erazo

### **Declaro que:**

El proyecto de grado denominado “DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE AMPLIO ESPECTRO BASADO EN LA AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN ADN RIBOSOMAL 16S MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL PARA SU APLICACIÓN COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR EN INFECCIONES BACTERIANAS LOCALES”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 25 de noviembre de 2011.

---

**Gabriela Georgina Zapata Erazo**

## **AUTORIZACIÓN**

Yo, Gabriela Georgina Zapata Erazo

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE AMPLIO ESPECTRO BASADO EN LA AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN ADN RIBOSOMAL 16S MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL PARA SU APLICACIÓN COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR EN INFECCIONES BACTERIANAS LOCALES”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 25 de noviembre de 2011.

---

**Gabriela Georgina Zapata Erazo**

## DEDICATORIA

*“Un hombre que no se alimenta de sus sueños, envejece pronto”.*

*William Shakespeare*

A mis padres, Georgina y Carlos, por sus constantes sacrificios de amor incondicional, la paciencia con la que han guiado mi camino, y el incomparable apoyo que me han brindado durante toda mi vida.

A mis hermanos, Carlos, Fabián y Bolívar, por el cariño que me manifestaron desde siempre, por ser el mejor ejemplo de vida ya que en ustedes veo personificados los más bellos valores del ser humano.

A mis sobrinos, por cambiar mi vida de una manera única, porque a través de ustedes la alegría y los sueños cobran vida cada día.

***Gabriela Georgina Zapata Erazo***

## **AGRADECIMIENTO**

A DIOS y la Virgen, por guiar cada paso que he dado, por iluminar mi camino poniendo en él oportunidades inigualables y gente de buen corazón, y por darme fortaleza y sabiduría en los momentos más difíciles.

A mi director de tesis, Dr. Marcelo Grijalva, por darme la oportunidad de ser parte de esta increíble experiencia de aprendizaje, por la paciencia y comprensión que supo brindarme durante esta etapa.

A mi codirectora, Ing. Paola Párraga, por toda su ayuda en la realización de este trabajo, por los consejos y los momentos compartidos.

Al Hospital Carlos Andrade Marín, por su colaboración en la recolección de las muestras clínicas para la realización de este trabajo.

A mis compañeras y amigas de laboratorio: Andrea, Ma. Elena, y Oderay, las recuerdo siempre con mucho cariño. Cris, gracias por enseñarme a ver las situaciones de la vida de manera distinta. Gaby, gracias por la magia que me transmitiste siempre y sobre todo gracias por tu valiosa amistad.

A todos los buenos amigos que encontré a lo largo de la carrera, por su compañía y las buenas experiencias que compartimos. Carito, Gaby y Gus, por ser más que amigos, por ser mis hermanos, y por caminar junto a mí en los momentos alegres y en los momentos difíciles.

Son muchas las personas a quienes debo agradecer ya que de una u otra forma han contribuido con mi formación personal y profesional. Todos ustedes ocupan un lugar muy especial en mi corazón. Sin importar en dónde estén, gracias por formar parte de mi vida.

***Gabriela Georgina Zapata Erazo***

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS .....	ii
CERTIFICACIÓN .....	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iv
AUTORIZACIÓN .....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO .....	vii
LISTADO DE TABLAS.....	x
LISTADO DE FIGURAS.....	xi
LISTADO DE ANEXOS.....	xiii
NOMENCLATURA.....	xiv
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Formulación del problema .....	1
1.2. Justificación del problema .....	2
1.3. Objetivos de la investigación .....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos .....	3
1.4. Marco teórico .....	4
1.4.1. Infecciones locales.....	4
1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación .....	27
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
2.1. Participantes .....	28
2.2. Zona de estudio .....	28
2.3. Periodo de tiempo de investigación.....	28
2.4. Diseño.....	29
2.5. Procedimientos .....	29
2.5.1. Preparación y mantenimiento de cultivos puros .....	29
2.5.2. Obtención de controles positivos.....	30
2.5.3. Ensayo de PCR en tiempo real ADNr 16S .....	34
2.5.4. Determinación del límite de detección del sistema de PCR.....	38



2.5.5. Procesamiento de muestras clínicas .....	42
2.6. Análisis de datos.....	42
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	44
3.1. Obtención de controles positivos.....	44
3.2. Ensayo de PCR en tiempo real ADNr 16S.....	45
3.2.1. Primer Ensayo – Detección de bacterias mediante sonda UNI ....	47
3.2.2. Segundo Ensayo – Discriminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante sondas OGP y OGN.....	49
3.2.3. Tercer Ensayo – Identificación bacteriana mediante sondas especie-específicas (SAU, SEP, SAG, SGN, ECO y NGH).....	52
3.3. Determinación del límite de detección por diluciones seriadas de ADN	55
3.4. Determinación del límite de detección por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) .....	57
3.5. Procesamiento de muestras clínicas.....	60
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....	66
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....	76
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	79
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXOS .....	88

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> Cebadores y sondas utilizados para la detección e identificación bacteriana de un fragmento del gen ADNr 16S.....	35
<b>Tabla 3.1</b> Concentración de ADN (ng/μL) de los controles positivos determinada mediante fluorometría.....	45
<b>Tabla 3.2</b> Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para el ensayo de PCR en tiempo real de detección de bacterias mediante la utilización de la sonda UNI. ....	46
<b>Tabla 3.3</b> Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para los ensayos de PCR en tiempo real de identificación de bacterias mediante la utilización de las sondas de discriminación de tipo Gram y sondas especie-específicas. ....	46
<b>Tabla 3.4</b> Programa del termociclador empleado para la amplificación de un fragmento de 161pb del gen ADNr 16S en bacterias por PCR en tiempo real. ....	47
<b>Tabla 3.5</b> Recuento de UFC y resultados del cálculo para la obtención de UFC/mL en diluciones sucesivas de cultivo puro de <i>S. aureus</i> en agar manitol. ....	58
<b>Tabla 3.6</b> Recuento de UFC y resultados del cálculo para la obtención de UFC/mL en diluciones sucesivas de cultivo puro de <i>S. aureus</i> en agar sangre. ....	59
<b>Tabla 3.7</b> Concentración de ADN (ng/μL) obtenido a partir de muestras clínicas medida por fluorometría.....	62
<b>Tabla 3.8</b> Comparación de resultados de muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección, por microbiología y ensayo de PCR en tiempo real. ...	63

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Curva de Amplificación en PCR en tiempo real. ....	19
<b>Figura 1.2</b> PCR en tiempo real con SYBR Green.....	23
<b>Figura 1.3</b> PCR en tiempo real con Sonda TaqMan.....	25
<b>Figura 2.1</b> Algoritmo utilizado para ensayo multisonda en PCR en tiempo real .....	37
<b>Figura 2.2</b> Esquema de la preparación de diluciones seriadas de ADN para ensayo de límite de detección a partir de una solución de ADN de concentración conocida .....	39
<b>Figura 2.3</b> Esquema de la preparación de diluciones seriadas a partir de un cultivo puro de <i>S. aureus</i> .....	41
<b>Figura 3.1</b> Controles Positivos. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con SYBR Safe (Invitrogen) de ADN genómico extraído mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) a partir de cultivos puros bacterianos. ....	44
<b>Figura 3.2</b> Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S de los controles positivos, obtenidos mediante PCR en tiempo real, utilizando la sonda UNI. ....	48
<b>Figura 3.3</b> Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S de los controles positivos, correspondientes al grupo de bacterias Gram positivas, obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas OGP y OGN. ....	50
<b>Figura 3.4</b> Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S de los controles positivos, correspondientes al grupo de bacterias Gram negativas, obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas OGP y OGN. ....	51
<b>Figura 3.5</b> Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> , obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas SAU y SEP. ....	52
<b>Figura 3.6</b> Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S de <i>S. agalactiae</i> y <i>S. pneumoniae</i> , obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas SAG y SPN.....	53
<b>Figura 3.7</b> Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S de <i>E. coli</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> , obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas ECO y NGH. ....	54

<b>Figura 3.8</b> Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S del ensayo de límite de detección del sistema de PCR en tiempo real mediante diluciones seriadas de ADN de <i>S. aureus</i> , utilizando la sonda UNI.....	56
<b>Figura 3.9</b> Curva de calibración a partir del ensayo de límite de detección del sistema de PCR en tiempo real mediante diluciones seriadas de ADN de <i>S. aureus</i> .....	57
<b>Figura 3.10</b> Resultados de la siembra por triplicado de las diluciones sucesivas de cultivo puro de <i>S. aureus</i> en agar manitol. ....	58
<b>Figura 3.11</b> Resultados de la siembra por triplicado de las diluciones sucesivas de cultivo puro de <i>S. aureus</i> en agar sangre.....	59
<b>Figura 3.12</b> Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S del ensayo de límite de detección del sistema de PCR en tiempo real a partir de diluciones seriadas de <i>S. aureus</i> , utilizando la sonda UNI. ....	60
<b>Figura 3.13</b> Muestras clínicas. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con SYBR Safe (Invitrogen) de ADN genómico extraído mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) a partir de muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección. ....	61

## LISTADO DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Descripción de las cepas utilizadas como controles positivos .....	88
<b>Anexo B.</b> Alineamiento múltiple de las secuencias del gen ADNr 16S de diversas cepas de las especies bacterianas utilizadas como controles positivos. Cebadores universales y sonda de detección UNI.....	89
<b>Anexo C.</b> Alineamiento múltiple de las secuencias del gen ADNr 16S de diversas cepas de las especies bacterianas Gram positivas utilizadas como controles positivos. Cebadores universales y sonda de clasificación Gram OGP. ....	90
<b>Anexo D.</b> Alineamiento múltiple de las secuencias del gen ADNr 16S de diversas cepas de las especies bacterianas Gram negativas utilizadas como controles positivos. Cebadores universales y sonda de clasificación Gram OGN. ....	91
<b>Anexo E.</b> Valores de <i>Ct</i> de los controles positivos utilizados en el presente estudio, obtenidos mediante la amplificación de un fragmento del gen ADNr 16S con la sonda UNI. ....	92
<b>Anexo F.</b> Valores de <i>Ct</i> de los controles positivos utilizados en el presente estudio, obtenidos mediante la amplificación de un fragmento del gen ADNr 16S con las sondas de clasificación Gram OGP y OGN.....	93

## NOMENCLATURA

<b>8-MOP:</b>	8 – Metoxipsoraleno
<b>A:</b>	Adenina
<b>ADN:</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNr:</b>	ADN Ribosomal
<b>ARN:</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATCC:</b>	American Type Culture Collection
<b>C:</b>	Citosina
<b>Ct:</b>	Threshold Cycle (Ciclo Umbral)
<b>dNTP:</b>	Deoxinucleótido Trifosfato
<b>FRET:</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>G:</b>	Guanina
<b>Kb:</b>	Kilo bases
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>PCR:</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>MGB:</b>	Minor Groove Binder
<b>NFQ:</b>	Nonfluorescent Quencher
<b>T:</b>	Timina
<b>TBE:</b>	Tris Borato EDTA
<b>Tm:</b>	Temperatura de Melting
<b>UFC:</b>	Unidad Formadora de Colonia
<b>UV:</b>	Luz Ultravioleta
<b>V:</b>	Voltio

## RESUMEN

Las infecciones son procesos dinámicos, generalizados o localizados, que implican la invasión del cuerpo por microorganismos patógenos y la reacción que estos y sus toxinas provocan en los tejidos, resultando perjudiciales para el funcionamiento normal y supervivencia del huésped.

En microbiología clínica, los métodos actuales para diagnosticar infecciones presentan grandes desventajas ya que se basan principalmente en la identificación de microorganismos patógenos mediante pruebas bacteriológicas convencionales, las mismas que presentan baja precisión y sensibilidad, dificultando la administración de tratamientos efectivos y adecuados al paciente.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y optimizar un sistema de detección e identificación bacteriana rápido y sensible, empleando técnicas de biología molecular, como complemento a las técnicas tradicionales de cultivo en caso de sospecha de infección. Con este fin, se amplificó un fragmento del gen ADNr 16S mediante un sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro basado en un diseño multisonda, el mismo que incluyó la utilización de un par de cebadores universales, una sonda universal para detección bacteriana, dos sondas para la discriminación Gram de bacterias y seis sondas específicas para la identificación de seis especies bacterianas de relevancia clínica.

El sistema de PCR en tiempo real propuesto presentó una alta sensibilidad analítica, demostró ser eficiente y reproducible en la detección de bacterias de relevancia clínica en controles positivos y en muestras clínicas en un ensayo de campo limitado. La evaluación posterior del sistema en muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección, apoya la utilidad del mismo para la detección de infecciones, sin embargo, puede presentar limitaciones en el rango de identificación de patógenos, debido al número de sondas usado. Es necesario realizar estudios a mayor escala para validar los resultados del presente trabajo.

## ABSTRACT

Infections are dynamic processes which involve the invasion of the body by pathogenic microorganisms and the reaction that they and their toxins cause in the tissues of the host, which have a detrimental effect on the normal functioning of the host.

In clinical microbiology, current methods to diagnose infections have major drawbacks, for they are based primarily on pathogen identification by conventional bacteriological tests. These tests may have low accuracy and sensitivity in a number of clinical scenarios, which hinders the administration of effective and targeted treatment.

The aim of this study was to develop and optimize a detection system for rapid and sensitive bacterial identification, using molecular biology techniques as a complement to traditional cultivation methods in cases of suspected infection. For this purpose, a 16S rDNA gene fragment was amplified using broad range real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on a multiprobe design, using a pair of universal primers, a universal probe for bacterial detection, two probes for Gram typing, and six probes for clinically relevant bacterial species characterization.

The real-time PCR system demonstrated high analytical sensitivity, efficiency and reproducibility for detection of bacteria of clinical importance from culture controls and clinical samples as well. This field test evaluation of the system on clinical samples obtained from patients with suspected infection supports further our notion that the method is useful in detecting pathogens genetic material in suspected cases of infection. The method however, has limitations regarding the spectrum of pathogens that could be detected. More and larger scale studies are necessary for clinical validation of the method.



# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1. Formulación del problema

En microbiología clínica, los métodos clásicos para identificar microorganismos se basan en la observación de la morfología macroscópica de sus colonias y de la morfología microscópica de sus células, la identificación de su tipo de metabolismo y la utilización de pruebas bioquímicas. El propósito del diagnóstico microbiológico en el área clínica humana es identificar de forma rápida y precisa a los patógenos causantes de una enfermedad con la intención de facilitar el diagnóstico médico y proveer un tratamiento efectivo al paciente (Farías, Medina y Chavarría, 2005; Petti, 2007; Reinhardt *et al.*, 2007; Sekiguchi *et al.*, 2007).

Sin embargo, los métodos de microbiología tradicional presentan varias desventajas, entre ellas, el proceso demanda mucho tiempo, desde la toma de la muestra hasta la identificación del patógeno. Además, pueden darse casos en los que existan microorganismos fastidiosos o de lento crecimiento que tengan requerimientos específicos en cuanto a medios de cultivo y condiciones de crecimiento, lo cual dificulta su análisis (Rodicio y Mendoza, 2003; Ciminska, 2006).

Las técnicas moleculares representan una alternativa para el diagnóstico e identificación de patógenos de forma rápida y eficiente, ya que no requieren de las mismas condiciones para la preparación y tratamiento de las muestras. Varias técnicas de biología molecular, como es el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se basan en la detección de material genético, permitiendo obtener resultados de manera rápida, sensible y específica, superando así los problemas que pueden presentar los métodos convencionales de diagnóstico en ciertas muestras clínicas.

## 1.2. Justificación del problema

Actualmente, el diagnóstico definitivo, en casos de sospecha de infecciones, requiere de la identificación del patógeno mediante cultivo microbiológico. Tradicionalmente, los microorganismos son clasificados de acuerdo a las similitudes y diferencias de sus características fenotípicas, sin embargo, estos métodos pueden resultar difíciles debido a las variaciones en dichas características.

Los métodos tradicionales de identificación bacteriana existentes poseen múltiples limitaciones, ya que presentan una baja sensibilidad y especificidad, así como bajo rendimiento cuando no se cuenta con un correcto manejo y procesamiento de las muestras, o cuando el microorganismo en estudio presenta requerimientos específicos de cultivo, lo que resta confiabilidad a la prueba al momento de diagnosticar con precisión determinadas patologías (Yang *et al.*, 2008).

La implementación de un ensayo diagnóstico específico y sensible, que permita la rápida y definitiva identificación de las especies bacterianas causantes de una infección es necesaria para lograr una intervención terapéutica directa y apropiada durante el manejo clínico oportuno del paciente afectado (Fenollar *et al.*, 2006).

La utilización de técnicas de biología molecular, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), basada en la aplicación de cebadores universales, ha permitido superar las limitantes que presenta el diagnóstico microbiológico tradicional. De manera más específica, la técnica conocida como PCR en tiempo real, una variante de la PCR, ha surgido como una herramienta de biología molecular muy utilizada en los últimos años en el diagnóstico de infecciones, debido a las grandes ventajas que presenta en relación a la PCR convencional.

El presente proyecto propone el desarrollo de un sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro basado en la amplificación de un fragmento del

gen ADNr 16S, con aplicación en el área de diagnóstico molecular, para la detección e identificación de patógenos a partir de muestras clínicas en pacientes con sospecha de infección.

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Diseñar y optimizar un sistema de amplio espectro basado en la amplificación de un fragmento del gen ADNr 16S mediante PCR en tiempo real, haciendo uso de un diseño multisonda para la detección e identificación de seis especies bacterianas de relevancia clínica, y evaluarlo como método de diagnóstico molecular en pacientes con sospecha de infección.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Diseñar y optimizar un sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro para la detección e identificación molecular de especies bacterianas asociadas a infecciones.
- Utilizar cebadores universales y una sonda tipo TaqMan, dirigidos a secuencias conservadas del gen ADN ribosomal 16S, que permitan amplificar un fragmento de este, para la detección de la presencia de patógenos en muestras clínicas mediante un sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro.
- Utilizar sondas tipo TaqMan para discriminar grupos de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y simultáneamente hacer uso de sondas específicas tipo TaqMan para la identificación bacteriana, en las muestras que resulten positivas del primer ensayo de detección de ácidos nucleicos de patógenos.

- Determinar la eficiencia del sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro mediante ensayos de límite de detección.
- Evaluar el sistema optimizado en muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección.

## **1.4. Marco teórico**

### **1.4.1. Infecciones locales**

Las infecciones son procesos dinámicos que abarcan la invasión del cuerpo por microorganismos patógenos y la reacción que éstos y sus toxinas provocan en los tejidos. Adicionalmente, esta interacción de microorganismos patógenos con los sistemas de defensa del huésped resultan perjudiciales para el funcionamiento normal y supervivencia de este último (Bender, 2007).

Existen varios factores que son determinantes para que se produzca una infección bacteriana, como por ejemplo, las rutas de acceso del patógeno a las diversas zonas del huésped, el tiempo de incubación del patógeno, la cantidad de microorganismos presentes inicialmente en el proceso infeccioso (inóculo), la patogenicidad, toxicidad, poder de invasión y virulencia intrínseca del microorganismo, el tipo de exposición o contacto que se tenga con el agente infeccioso, la asociación microbiana y el estado inmunológico del huésped que está siendo colonizado (Miller, 2004).

Las infecciones pueden ser generalizadas, que son aquellas que afectan a todo el organismo (denominadas también sistémicas), o localizadas, las cuales comprometen un solo órgano o sistema del cuerpo. Las infecciones más frecuentes son las infecciones locales y afectan diferentes órganos y sistemas, como es el caso del tracto respiratorio superior e inferior, el aparato digestivo, el sistema

reproductivo y urinario, entre otros. Las infecciones locales pueden resultar graves si no son adecuadamente tratadas ya que pueden afectar órganos vitales y diseminarse a través del torrente sanguíneo.

#### 1.4.1.1. Etiología

Son varios los microorganismos que pueden llegar a causar infecciones en el ser humano. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2011) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2008), las infecciones respiratorias agudas y las enfermedades diarreicas son las principales enfermedades infecciosas en la población ecuatoriana. Entre los agentes infecciosos más reportados en estos casos se encuentran bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, y bacterias del género *Enterococcus*.

En el caso de otros tipos de infecciones, como es el caso de artritis séptica, los microorganismos más comúnmente encontrados son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Neisseria gonorrhoeae* (Albán, 2010).

#### 1.4.1.2. Diagnóstico convencional de infecciones bacterianas locales

El diagnóstico de infecciones, de manera general, se basa en la realización de exámenes físicos y de laboratorio al paciente, así como, del análisis de su cuadro clínico. Según Baron, Peterson & Finegold (1994), la obtención de resultados reales en el diagnóstico de infecciones requiere de la cuidadosa consideración de todos los parámetros que permitan una correcta toma, manejo y procesamiento de las muestras.

#### *1.4.1.2.1. Pruebas de microbiología*

Los métodos tradicionales para el diagnóstico de agentes microbianos causantes de infecciones se basan, principalmente, en el cultivo del microorganismo a partir de muestras clínicas y su posterior identificación por pruebas bioquímicas o serológicas.

Los métodos clásicos de identificación bacteriana se basan en el análisis de las propiedades físicas y bioquímicas de los microorganismos encontrados en las muestras clínicas y la comparación de estas con las de aquellos pertenecientes a cepas conocidas, para su identificación. Esto se realiza mediante procedimientos como el cultivo bacteriano en medios selectivos, y la posterior identificación mediante pruebas bioquímicas y antibiogramas (Andrade, 2009).

Estos procedimientos presentan varias ventajas, como por ejemplo, que se encuentran implementados y validados en laboratorios clínicos, permiten la distinción de infecciones mono y polimicrobianas, y permiten la determinación de susceptibilidad de los microorganismos a determinados antibióticos para su posterior tratamiento (Treguerres, Martínez y Navas, 2003).

Sin embargo, existen también ciertas limitantes en cuanto a la utilización de estas técnicas. A pesar de mejoras en relación a control de calidad y automatización, existe el inconveniente de que su resultado puede demorar, en el mejor de los casos, de 24 a 72 horas, y en aquellos pacientes con tratamiento antimicrobiano previo, puede incluso resultar negativo (Arredondo, 2006).

Además, la identificación de los agentes causantes de infecciones se complica cuando ciertas bacterias presentan características no comunes, por lo que puede resultar subjetiva o no determinante (Petti, 2007).

#### 1.4.1.3. Diagnóstico molecular de infecciones bacterianas locales

En numerosas ocasiones las técnicas tradicionales de diagnóstico e identificación bacteriológica pueden resultar fallidas debido a la presencia de microorganismos fastidiosos y/o que requieren factores nutricionales especiales.

Debido a los inconvenientes y limitaciones que presentan los métodos tradicionales de diagnóstico, en los últimos años, la aplicación de técnicas moleculares, basadas en el análisis de ácidos nucleicos es cada vez más frecuente en los laboratorios clínicos como complemento a las técnicas convencionales en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas (Mackay, 2004; Alcaide, 2009).

Las técnicas de diagnóstico molecular, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han permitido el diagnóstico de infecciones bacterianas mediante la detección de su material genético. Este tipo de ensayos posee grandes ventajas, como rapidez y alta sensibilidad y especificidad, por lo que pueden proponerse como pruebas complementarias al cultivo tradicional en la identificación de microorganismos a partir de muestras clínicas con sospecha de infecciones (Fenollar *et al.*, 2006).

En los últimos años, los laboratorios clínicos han implementado técnicas basadas en PCR y la secuenciación de sus productos para caracterizar microorganismos a partir de cultivos, y en muchas ocasiones para detectar directamente patógenos a partir de muestras de pacientes. La secuenciación de genes determinados es un método reproducible y exacto para identificar microorganismos, e inclusive, se ha logrado identificar microorganismos inusuales o difíciles de cultivar mediante el uso de esta técnica (Petti, 2007).

Uno de los métodos que más interés ha provocado en los últimos años ha sido la amplificación del gen ADNr 16S el cual ha demostrado

ser una herramienta efectiva y sensible para la detección directa de bacterias. Esta técnica es aplicable en microbiología clínica en el caso de cepas cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, y para bacterias de crecimiento lento, que retrasan considerablemente la identificación convencional, superando de esta manera las limitaciones que presentan los métodos tradicionales (Clarridge, 2004).

El empleo de métodos moleculares para la detección e identificación bacteriana, basados en el análisis genotípico del agente infeccioso, comprende la obtención del material genético del microorganismo, a partir de una muestra apropiada y su posterior análisis mediante técnicas de amplificación e identificación molecular.

#### *1.4.1.3.1. Aislamiento de ADN*

El aislamiento del material genético es el primer paso para la identificación de microorganismos dentro del diagnóstico molecular de infecciones bacterianas, por lo que es imprescindible un método eficiente de extracción que permita la obtención de ADN de alta pureza, integridad y calidad. Estos parámetros afectarán directamente a los resultados de las pruebas realizadas a partir del mismo (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002).

El objetivo de las técnicas de obtención de ADN es la de separarlo de todos los componentes celulares para obtener una preparación homogénea que represente la información genética entera del organismo en estudio (Surzycki, 2000).

El rango de concentración de ADN que puede ser obtenido de patógenos a partir de muestras clínicas usualmente es bajo utilizando las técnicas de aislamiento de ácidos nucleicos actualmente



disponibles. Por ello, se requiere de procedimientos eficientes y reproducibles, y que además, faciliten el almacenamiento del ácido nucleico extraído a largo plazo (Coyne *et al.*, 2004).

En el proceso de aislamiento y obtención de ADN se pueden presentar además otros problemas, como sucede con la eficiencia en la obtención de ADN a partir de bacterias Gram positivas y Gram negativas, la cual es variable debido a las diferencias estructurales de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias (Hendolin, Paulin & Ylikoski, 2000).

Para superar estas limitaciones se han desarrollado una gran variedad de sistemas comerciales de aislamiento y purificación de ADN. Sin embargo, estos productos están frecuentemente diseñados para el aislamiento de ADN microbiano a partir de suspensiones celulares o cultivos puros, mas no para muestras clínicas, lo cual representa dificultad por los límites de detección determinados experimentalmente en relación a su aplicabilidad en muestras clínicas y diagnóstico de rutina (Rantakokko-Jalava & Jalava, 2002).

#### 1.4.1.3.1.1. Fases del Aislamiento de ADN

En general, los métodos para aislamiento y purificación de ADN comprenden cuatro pasos esenciales: ruptura celular, remoción de proteínas y ARN, concentración de ADN, y determinación de la pureza y cantidad del ADN, los cuales se detallan a continuación (Surzycki, 2000).

La ruptura celular es uno de los pasos más importantes para la obtención de ADN, ya que permite la liberación del ADN intracelular para su posterior purificación. Para lograr este fin, se utilizan métodos químicos, mecánicos y/o enzimáticos. En el caso

de las paredes celulares bacterianas, las cuales no pueden ser lisadas simplemente con la utilización de agentes químicos, es necesario un tratamiento enzimático previo, siendo la lisozima la enzima más comúnmente utilizada para este propósito.

La siguiente etapa es la remoción de proteínas y ARN, la cual comprende varios procesos que tienen como fin remover estos restos celulares no deseados. Para este propósito, los métodos utilizados se basan en las propiedades físicas y químicas de los ácidos nucleicos y las proteínas. El principio más utilizado es la diferencia de solubilidad de los ácidos nucleicos (predominantemente hidrofílicos) y las proteínas (que contienen varios residuos hidrofóbicos). Otras técnicas se fundamentan en el empleo de las propiedades de algunos compuestos o detergentes para formar complejos insolubles con proteínas o ADN, lo que facilita su remoción. Finalmente, se puede mencionar a enzimas específicas para la remoción de proteínas y enzimas tipo ribonucleasas para la remoción de ARN contaminante.

Posteriormente se realizan procesos de concentración de ADN, que tiene como propósito concentrar el ADN de alto peso molecular de las soluciones desproteinizadas y remover nucleótidos, aminoácidos e impurezas de bajo peso molecular remanentes en la solución luego de la ruptura celular. Los métodos más usados para este propósito en general se relacionan con precipitación de ADN con alcoholes.

Finalmente, la determinación de la concentración y pureza del ADN permite evaluar los resultados del proceso total, en términos de calidad y cantidad de ADN obtenido. Uno de los métodos más usados para este cometido es la espectrofotometría ultravioleta, la cual permite medir la cantidad de ADN. Esta molécula tiene su máxima absorbancia a 260nm, por lo que valores obtenidos en un rango entre 0,1 a 2 a 260nm

representarán concentraciones de 0,5 a 100µg/mL de ADN, respectivamente. Por otra parte, las proteínas, principales moléculas que pueden estar contaminando el ADN, presentan una máxima absorbancia a 280nm, por lo tanto la pureza puede ser medida mediante el ratio de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ . Un ratio de 2 corresponderá a ADN puro.

#### 1.4.1.3.2. *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular que fue desarrollada en 1986 por Kary Mullis, y cuyo fin es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular, partiendo de una mínima cantidad de este fragmento original, o molde (Bartlett & Stirling, 2003).

De acuerdo a Coleman & Tsongalis (2006), esta técnica se basa en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, empleando ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas. El proceso de PCR consiste en una serie de ciclos (20 a 45 ciclos) repetidos de temperatura y cada uno de estos consiste de 2 a 3 pasos, los cuales se detallan a continuación.

- La desnaturalización es la etapa en la cual se da la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN bicatenario mediante calentamiento a temperaturas que sobrepasan los 90°C, por períodos de tiempo de al menos un minuto, dando como resultado hebras de ADN monocatenarias útiles para el siguiente paso del proceso (Surzycki, 2000; Sambrook & Russel, 2001; Mackay, 2004).
- El alineamiento o hibridación consiste en la unión específica de los cebadores a secuencias del ADN molde a temperaturas que

oscilan entre los 50 y 60°C, las cuales dependen del contenido de guanina y citosina de los cebadores (Surzycki, 2000; Mackay, 2004).

- La extensión, o elongación de la cadena, es la etapa en la que la ADN polimerasa termoestable incorpora nucleótidos al extremo 3' del cebador para sintetizar las nuevas cadenas de ADN complementarias a la cadena molde. Este proceso se da a temperaturas que pueden oscilar entre los 70 y 78°C, siendo 72°C la temperatura escogida en la mayoría de casos, debido a que es aquella a la cual la polimerasa presenta su máxima actividad (Surzycki, 2000; Mackay, 2004; Kubista *et al.*, 2006).

La utilidad e importancia de la técnica de PCR radica en que tras la reacción de amplificación resulta mucho más fácil analizar el material genético del organismo en estudio. Es por esto que esta técnica se ha extendido mucho en el campo de la investigación y es indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones (Scott, Butler, Hansen & Frederic, 2007).

La PCR, en la práctica, puede fallar por varias razones por lo que se han desarrollado un gran número de técnicas y procesos para optimizarla. La optimización de una reacción de PCR se basa en el ajuste de las condiciones de amplificación (usualmente temperaturas y tiempos de desnaturalización, hibridación de cebadores, y el número de ciclos) junto a las concentraciones de los componentes de la reacción (ADN, Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, cebadores y otros aditivos) con el fin de obtener patrones nítidos y reproducibles de los productos de la PCR.

La PCR es una de las técnicas más comúnmente aplicadas para detectar patógenos a partir de muestras clínicas. Sin embargo, los métodos utilizados no son siempre reproducibles debido

principalmente a contaminación y baja sensibilidad de los ensayos (Petti, 2007).

#### 1.4.1.3.2.1. PCR de amplio espectro

La mayoría de ensayos moleculares son desarrollados para la detección de un organismo específico, lo cual puede presentar ciertas desventajas. Sin embargo, se han diseñado ensayos de amplio espectro basados en genes ribosomales (ADNr) para superar estas limitaciones (Harris & Hartley, 2003).

Dadas estas razones, la aplicación directa de la PCR de amplio espectro en muestras clínicas tiene un papel cada vez mayor en la detección e identificación de bacterias y su aplicabilidad crece cada vez más en el campo de la medicina clínica (Janda & Abbott, 2007).

Por estas características, la PCR es una herramienta complementaria al cultivo tradicional de gran utilidad, especialmente cuando las pruebas tradicionales no arrojan resultados satisfactorios (Yang *et al.*, 2002; Petti, 2007).

Al hablar de técnicas de biología molecular, es necesario determinar los parámetros para una correcta selección de los genes que serán objeto del estudio. En el caso de ensayos de amplio espectro basados en genes ribosomales (ADNr), se debe tomar en cuenta que estos genes deben ser constitutivos y tener, además, segmentos conservados, comunes para todas las bacterias los cuales deben estar flanqueados por regiones variables o altamente variables (Petti, 2007).

Las regiones conservadas son aquellas que le darán el carácter de “universal” al gen, mientras que las regiones variables servirán como “rúbrica” para cada especie diferente, lo que permitirá generar fragmentos nucleotídicos únicos, siendo de gran utilidad en la identificación de microorganismos (Petti, 2007).

#### 1.4.1.3.2.2. PCR ADN Ribosomal (ADNr) 16S

El gen más comúnmente escogido para la identificación bacteriana es el gen ADNr 16S, el cual tiene un tamaño de aproximadamente 1500 pares de bases y que codifica para una porción de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. A nivel de laboratorios clínicos se ha utilizado sólo una parte de este gen (aproximadamente 500 pb) para secuenciación, constituyendo un método preciso y rápido para la identificación de una gran variedad de bacterias aerobias y anaerobias (Yang *et al.*, 2002; Petti, 2007).

Este gen tiene varias características que lo hacen atractivo como herramienta para diagnóstico molecular. En primer lugar, el gen ADNr 16S es un componente común en todas las bacterias y su secuencia está conformada tanto por regiones altamente conservadas como por otras considerablemente variables. Además existen múltiples copias de este gen por célula, facilitando el desarrollo de ensayos de sensibilidad analítica (Boddinghaus *et al.*, 1990).

Debido a que las bacterias pueden tener una o varias copias de este gen, la interpretación puede complicarse cuando existen variantes de las copias (cambios en los pares de bases a lo largo de las copias). Por otro lado, estas múltiples copias pueden ser muy útiles para mejorar la sensibilidad de la

amplificación por PCR, especialmente cuando esta técnica es usada directamente en muestras clínicas (Petti, 2007).

Las secuencias del gen ADNr 16S han sido ampliamente utilizadas para el estudio filogenético y taxonómico de bacterias. Este gen constitutivo es uno de los marcadores moleculares más utilizado debido a que está presente en casi todas las bacterias. Su función a lo largo del tiempo no ha cambiado por lo que los cambios aleatorios que puedan presentarse en su secuencia pueden servir como marcador evolutivo, además de que el gen es lo suficientemente grande como para poder analizar su variabilidad de manera precisa (Janda & Abbott, 2007).

Es por todo esto que la información almacenada tanto en las secuencias conservadas como hipervariables de este gen, permite diseñar una plataforma capaz de detectar especies bacterianas e identificar patógenos específicos en un solo sistema. En la práctica no es necesario amplificar toda la secuencia del gen 16S para una identificación exitosa, pudiéndose amplificar fragmentos de menor tamaño (Mendoza y Rodicio, 2003).

Mediante el uso de cebadores, cuyo blanco sean regiones conservadas de ADNr 16S, es posible diseñar un sistema de PCR de amplio espectro capaz de detectar ADN de casi cualquier especie bacteriana. La identidad de la bacteria puede ser revelada mediante la secuenciación de los nucleótidos del producto de PCR seguido de la comparación de la secuencia con bases de datos especializadas.

Otra ventaja de este sistema es que casi todos los patógenos bacterianos encontrados han sido secuenciados y gracias al progreso de la bioinformática se puede acceder a la base de datos de estas secuencias, la cual constituye una de las

más amplias y en continuo crecimiento, haciendo la identificación de bacterias desconocidas cada vez más viable (Liu *et al.*, 2005).

GenBank, la mayor base de datos de secuencias de nucleótidos, tiene más de 20 millones de secuencias de las cuales cerca de 90,000 corresponden al gen ADNr 16S. Es decir, existen muchas secuencias con las cuales se puede comparar la secuencia de una bacteria no identificada (Clarridge, 2004).

Entre algunas desventajas de estos sistemas, sin embargo, se puede mencionar que casi todas las PCR de amplio espectro involucran una fase posterior, la cual resulta laboriosa y demanda tiempo, por lo que es necesario el aprovechamiento de las secuencias altamente conservadas e hipervariables del gen ARNr 16S para diseñar una plataforma capaz de detectar eubacterias e identificar patógenos específicos de manera rápida (Yang *et al.*, 2008).

Otra desventaja de la amplificación del gen ADNr 16S mediante la técnica de PCR, es que ésta es susceptible a contaminación. Esto se debe a que la PCR presenta gran sensibilidad y puede generar más de  $10^{12}$  copias/mL de ADN amplificado en una reacción típica (Kwok & Higuchi, 1989).

Esta contaminación puede provenir de varias fuentes. La primera es la contaminación con ADN amplificado previamente, es decir, repeticiones continuas de ensayos de PCR pueden dar lugar a la acumulación de amplicones que pueden contaminar las siguientes reacciones de amplificación (Niederhauser *et al.*, 1994).

La contaminación por reactivos obtenidos a partir de fuentes bacterianas, como la Taq ADN polimerasa, que es obtenida a partir de la bacteria *Thermus aquaticus* es otra importante fuente de contaminación (Corless *et al.*, 2000).



A pesar de todas las ventajas que pueda presentar esta técnica de biología molecular, su aplicación no ha sido del todo reproducible debido en gran parte a problemas de contaminación del sistema por factores extrínsecos y/o intrínsecos.

#### 1.4.1.3.3. *PCR en tiempo real*

##### 1.4.1.3.3.1. Generalidades

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional que permite la detección y medición del amplicón a medida que éste se acumula durante la reacción, a diferencia de la técnica tradicional, en la cual el producto de la amplificación es detectado mediante análisis posteriores al proceso. Esta técnica permite medir la cantidad de ADN sintetizado y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación, mediante la emisión de fluorescencia producida en la reacción, la cual es proporcional a la cantidad de producto formado (Lejona *et al.*, 2006).

Los termocicladores utilizados para una PCR en tiempo real poseen un lector de fluorescencia y un programa informático que registra y muestra el incremento de la fluorescencia emitida en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles analizados. Para esto es necesario incorporar en la reacción moléculas fluorescentes que reporten el incremento en la cantidad de ADN con un incremento proporcional de la señal fluorescente (Lejona *et al.*, 2006).

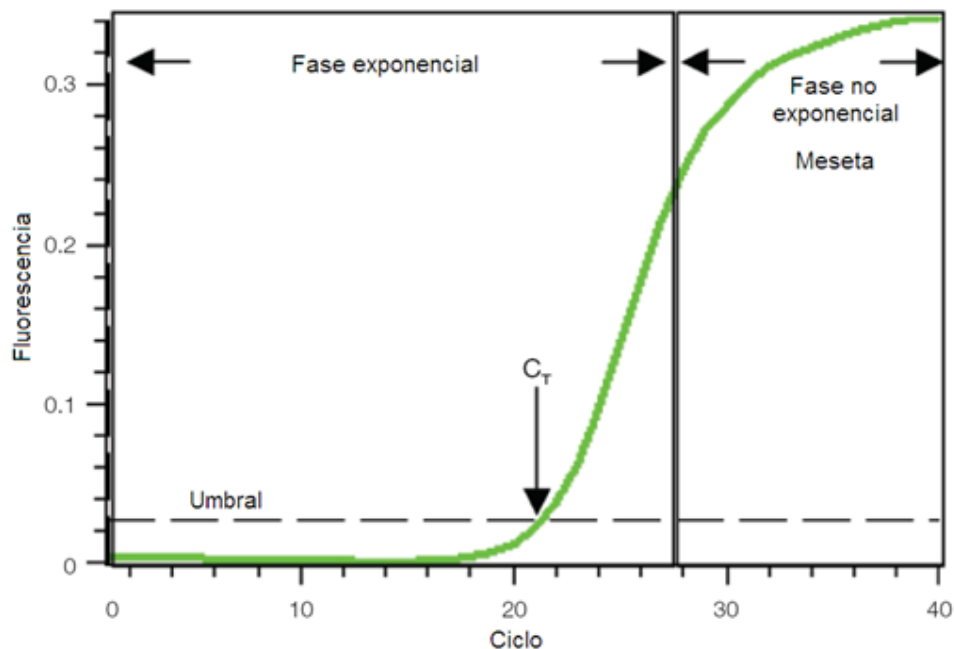
En la PCR en tiempo real las reacciones son descritas por el ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. De

esta manera, cuanto mayor sea el número de copias a partir del ácido nucleico diana, más temprano se observará un aumento significativo de la fluorescencia (Mackay, 2004).

En condiciones ideales, la cantidad de amplicones aumenta a un ritmo de un  $\log_{10}$  cada 3,32 ciclos. A medida que los reactivos se consumen la reacción se ralentiza, entrando en una fase de transición para finalmente, llegar a una fase de meseta, donde el incremento de la fluorescencia es mínimo o nulo (Mackay, 2004).

Según Mackay (2004) y Kubista *et al.* (2006), durante los primeros ciclos, la fluorescencia reportada es débil y se mantiene en niveles basales, por lo que el aumento de la fluorescencia no es detectable a pesar de que existe una acumulación exponencial de los productos. Esto sucede hasta que la cantidad de producto acumulado sea la suficiente como para producir una señal fluorescente detectable (Figura 1.1).

El ciclo en el cual la señal fluorescente es detectable se llama el ciclo umbral, o *Threshold cycle (Ct)*. El *Ct* se mide en la fase exponencial, cuando los reactivos no son limitantes, por lo que se utiliza para calcular de forma precisa la cantidad de templado inicial presente en la reacción (Figura 1.1). De esta manera, si una gran cantidad de templado está presente al inicio de la reacción, el número de ciclos de amplificación necesarios para dar una señal fluorescente detectable serán relativamente pocos, por lo que la reacción tendrá un *Ct* bajo o temprano. Por el contrario, si una pequeña cantidad de templado está presente al inicio de la reacción, se necesitarán más ciclos de amplificación para que la señal fluorescente sea detectada, por lo tanto, la reacción tendrá un *Ct* alto o tardío. Este principio constituye el fundamento de la PCR en tiempo real (Mackay, 2004; Kubista *et al.*, 2006).



**Figura 1.1 Curva de Amplificación en PCR en tiempo real.** Cinética de la reacción de amplificación mostrando las diferentes fases de la misma y el punto de corte de la curva con el umbral ( $C_t$ ). Tomado de: Bio-Rad Laboratories, 2006.

#### 1.4.1.3.3.2. PCR en Tiempo Real Múltiple

La PCR en tiempo real múltiple o multiplex se refiere a la utilización de múltiples oligonucleótidos fluorogénicos para la discriminación de los productos de la utilización de uno o varios pares de cebadores. El desarrollo de esta técnica ha resultado problemático debido al número limitado de fluoróforos disponibles en el mercado (Tyagi, Marras & Kramer, 2000; Mackay, 2004).

Sin embargo, esta limitación puede superarse al combinar la discriminación de los objetivos, mediante la temperatura, con el uso de múltiples fluoróforos. Esto permite identificar un número de amplicones significativamente mayor. Sin embargo, este enfoque combinado no se ha aplicado al diagnóstico de enfermedades

infecciosas en una escala significativa, posiblemente debido a la variación de las secuencias de los genes microbianos (Elenitoba *et al.*, 2001).

Los ensayos multiplex son más difíciles de diseñar ya que al acumularse los productos, las reacciones paralelas de PCR compiten por los reactivos. Además, el diseño de cebadores es más difícil, ya que se debe evitar la complementariedad entre todos ellos (Kubista *et al.*, 2006).

#### 1.4.1.3.3.3. Sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real

Según Mackay (2004), generalmente se utiliza el término 'fluoróforo' para describir a las moléculas fluorescentes, mientras que los oligonucleótidos que contienen estas moléculas se denominan 'oligonucleótidos fluorogénicos'. Los oligonucleótidos más utilizados en PCR en tiempo real se basan en la propiedad de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET, por sus siglas en inglés) entre las moléculas fluorogénicas o entre un fluoróforo y una molécula no fluorescente (Nonfluorescent quencher, NFQ).

El fenómeno de transferencia de energía FRET es un proceso espectroscópico, mediante el cual la energía se transmite entre las moléculas separadas por 10 a 100Å, cuyos espectros de emisión y absorción se superponen (Mackay, 2004).

Existe una amplia gama de productos químicos utilizados para PCR en tiempo real que pueden ser clasificadas como específicos o no específicos, incluyendo moléculas de unión al

ADN y cebadores o sondas de secuencia específica marcados fluorescentemente (Mackay, 2004; Kubista *et al.*, 2006).

#### 1.4.1.3.3.3.1. Agentes intercalantes o de unión al ADN:

Los agentes intercalantes o de unión al ADN son fluorocromos que aumentan significativamente la emisión de fluorescencia cuando se intercalan o se unen a ADN de doble hélice. Estas moléculas deben tener dos requisitos básicos. En primer lugar, deben provocar un notable incremento de la fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena. Además, no deben ser inhibidores de la reacción de PCR (Mackay, 2004; Kubista *et al.*, 2006; Applied Biosystems, 2009).

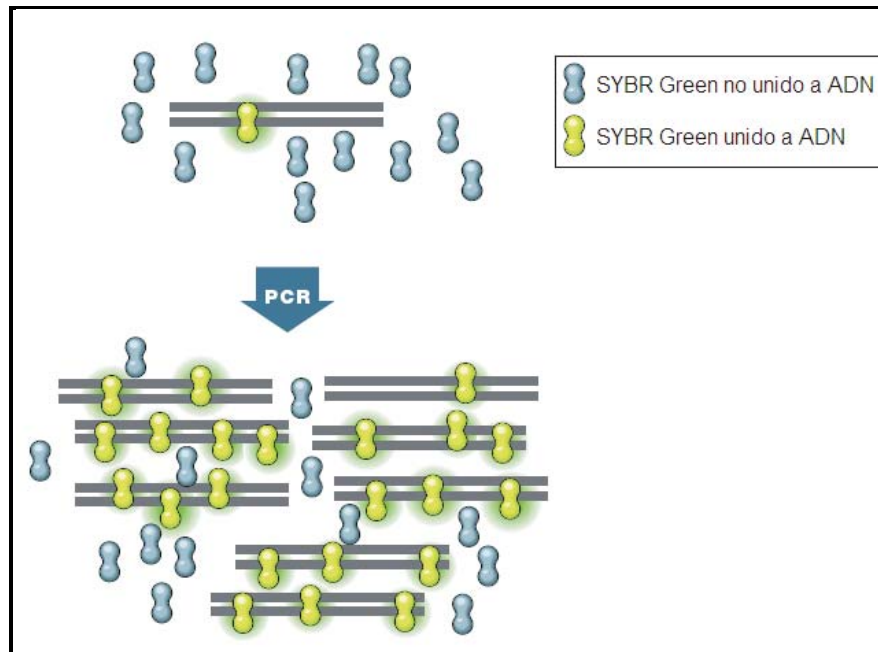
La ventaja de estos sistemas de detección radica en que la optimización de las condiciones de la reacción es muy sencilla, además de que puede ser utilizado para monitorear la amplificación de cualquier secuencia de ADN de doble cadena sin necesidad de utilizar sondas, lo que reduce costos (Mackay, 2004; Kubista *et al.*, 2006).

La principal limitación de estos sistemas es su baja especificidad, ya que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, lo cual puede generar falsos positivos, afectando por lo tanto la precisión de ensayos cuantitativos. Otra importante desventaja es que estos sistemas no permiten realizar ensayos multiplex debido a que las señales de fluorescencia de los diferentes amplicones no pueden distinguirse entre ellas (Bengtsson *et al.*, 2003; Zipper *et al.*, 2004).

A pesar de estas limitantes, la posibilidad de analizar las curvas de fusión o curvas de melting de este tipo de ensayos, pueden utilizarse para identificar los diferentes productos de la reacción, incluyendo los productos no específicos. Una vez finalizada la reacción de amplificación se genera una curva de fusión mediante el aumento de temperatura en pequeños incrementos en los cuales se registra la señal fluorescente en cada paso. De esta forma, a medida que el ADN de doble cadena se desnaturaliza la fluorescencia disminuye. Se representa, entonces, la primera derivada negativa del cambio en la fluorescencia en función de la temperatura, de manera que un pico característico en la temperatura de fusión del amplicón permitirá distinguirlo de otros productos, los cuales tendrán temperaturas de fusión distintas (Bio-Rad Laboratories, 2006).

El SYBR Green es la molécula de unión a ADN más empleada en PCR en tiempo real. Este muestra baja fluorescencia cuando está libre en solución, pero aumenta en más de 1000 veces al unirse inespecíficamente al surco menor del ADN de doble cadena (Applied Biosystems, 2009).

De acuerdo a Bengtsson *et al.* (2003), Zipper *et al.* (2004) y Kubista *et al.* (2006), cuando se añade SYBR Green a una muestra, éste se une inmediatamente a todo el ADN de doble cadena presente. Durante la PCR se generan los amplicones, por lo que el SYBR Green se une a cada nueva copia de ADN de doble cadena producida. A medida que la reacción avanza, se generan más productos de PCR y la fluorescencia emitida por el SYBR Green incrementará proporcionalmente a la cantidad de amplicones producidos (Figura 1.2).



**Figura 1.2 PCR en tiempo real con SYBR Green.** La fluorescencia del SYBR Green incrementa notablemente al unirse a ADN de doble cadena producto de la amplificación por PCR. Tomado de: Bio-Rad Laboratories, 2006.

#### 1.4.1.3.3.3.2. Sondas de hibridación específicas:

Las sondas de hibridación específicas son sondas marcadas usualmente con dos tipos de fluorocromos: un donador y un aceptor. El principio se basa en el fenómeno FRET entre las dos moléculas.

Las sondas o los cebadores pueden ser marcados con un fluoróforo reportero o, como sucede en la mayoría de los casos, el oligonucleótido está diseñado para que la fluorescencia se extinga cuando el objetivo de amplificación específico no está disponible. Esto se logra añadiendo una molécula extintora, o *quencher*, al oligonucleótido y creando un mecanismo para separar el reportero del *quencher* cuando el oligonucleótido se une a su objetivo específico (Mackay, 2004; Kubista *et al.*, 2006).

Los sistemas de detección basados en cebadores y sondas fluorescentes ofrecen ciertas ventajas sobre las moléculas que se unen al ADN. En primer lugar, detectan específicamente una secuencia, de manera que la presencia de productos inespecíficos no afecta la precisión de la cuantificación. Además, estos sistemas permiten diseñar reacciones multiplex ya que las sondas pueden ser marcadas con diferentes reporteros, por lo que es posible llevar a cabo la amplificación de dos o más secuencias distintas en una misma reacción (Mackay, 2004; Kubista *et al.*, 2006).

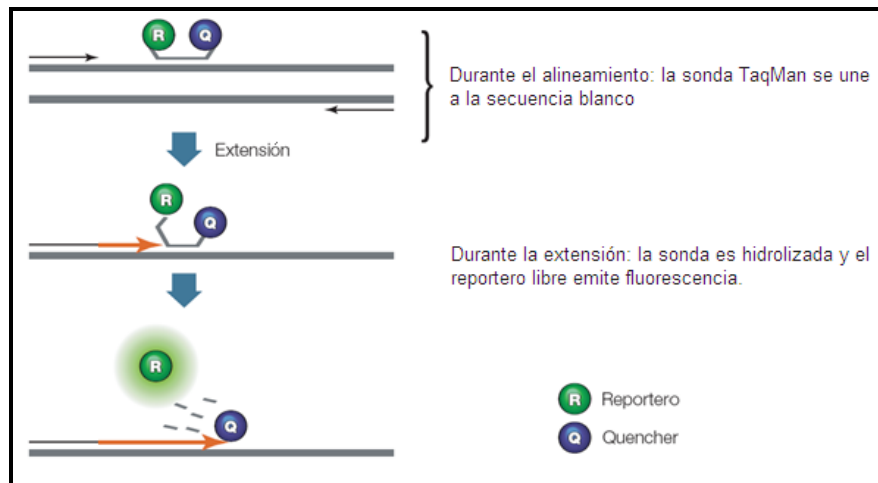
La principal desventaja de estos sistemas radica en que se requiere sintetizar diferentes sondas para cada una de las diferentes secuencias que se quieran analizar, por lo que el costo es más elevado y demanda un diseño bastante cuidadoso (Kubista *et al.*, 2006).

Las sondas más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las cuales son oligonucleótidos de unión específica al ADN blanco, marcadas con un fluorocromo donador (reportero), en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (quencher), en el extremo 3', el cual absorbe la fluorescencia liberada por el donador cuando éstos están espacialmente próximos. Esto sucede ya que el espectro de emisión del primero se solapa con el espectro de absorción del segundo (Mackay, 2004; Kubista *et al.*, 2006).

El principio de este sistema se basa en que al estar la sonda intacta la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Durante la reacción de amplificación, la polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, hidrolizando a su vez el extremo libre 5' de la sonda, debido a la actividad 5' exonucleasa que presentan ciertas polimerasas



termoestables, lo que producirá la liberación del fluorocromo donador. De esta manera, al estar el donador y aceptor espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero incrementa significativamente por lo que puede ser captada por lector del equipo (Figura 1.3).



**Figura 1.3 PCR en tiempo real con Sonda TaqMan.** La fluorescencia de la sonda es emitida durante la reacción de amplificación por PCR al ser hidrolizada por la enzima. Tomado de: Bio-Rad Laboratories, 2006.

Dentro de las sondas de hidrólisis tipo TaqMan se puede mencionar a las sondas TaqMan MGB las cuales contienen un *quencher* no fluorescente al extremo 3', el cual no emite señal fluorescente, lo que representa una gran ventaja debido a que los instrumentos de detección pueden medir las emisiones de fluorescencia del reportero de forma más precisa (Mackay, 2004).

Estas sondas poseen además una molécula denominada Minor Groove Binder (MGB) que estabiliza el complejo sonda-ADN blanco, al unirse al surco menor del ADN de doble cadena en el extremo 3'. Esta molécula incrementa la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de las sondas, lo que permite el diseño y uso de sondas más cortas, de hasta 12 a 17 nucleótidos (Lee, Connell & Bloch, 1993; Afonina *et al.*, 2002; Mackay, 2004).

#### 1.4.1.3.3.4. Ventajas de la PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una técnica que presenta varias ventajas sobre la PCR convencional. En primer lugar, la PCR en tiempo real toma menos tiempo en realizarse debido a que no requiere ningún proceso adicional de visualización o revelado. No requiere manipulación post-PCR por lo que se reducen los riesgos de contaminación por amplicones. Presenta una alta especificidad y sensibilidad, lo que disminuye el riesgo de falsos negativos. La toma de los datos en la fase exponencial del proceso asegura que ningún componente pueda estar limitando la reacción. Esto permite igualmente detectar más de un producto específico en una misma reacción al hacer uso de varios reporteros fluorescentes. Finalmente, permite cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en una muestra de manera sencilla, precisa, y en un rango mayor que en los procedimientos convencionales (Bustin, 2000; Mackay, 2004; Lejona *et al.*, 2006; Kubista *et al.*, 2006).

#### 1.4.1.3.3.5. Aplicaciones en microbiología clínica

En los últimos años, la PCR en tiempo real ha surgido como una técnica robusta y extensamente utilizada para la investigación biológica ya que permite identificar y cuantificar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos (ADN y ARN) de forma específica (Lejona *et al.*, 2006).

Los ensayos de PCR en tiempo real han sido muy útiles en el estudio de agentes microbianos patógenos. Esta técnica puede aplicarse en la detección de bacterias, ya que los resultados pueden proporcionar información sobre el diagnóstico de infección del paciente. Esto permite una aplicación más específica y

oportuna de antibióticos, además de que hace posible la rápida cuantificación y diferenciación de algunas bacterias patógenas que pueden resultar de difícil identificación y cultivo (Mackay, 2004).

### **1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación**

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real, permite detectar e identificar de manera rápida y precisa, con alta sensibilidad y especificidad clínicas, la presencia de bacterias en una muestra biológica.

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

### **2.1. Participantes**

El presente proyecto fue financiado por la Escuela Politécnica del Ejército en su propósito de apoyar al desarrollo científico y cumplir con su misión investigativa en el área biomédica. El mismo se llevó a cabo, bajo la dirección del Dr. Marcelo Grijalva y la codirección de la Ing. Paola Párraga, en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la ESPE.

Se contó además con la colaboración del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín, entidad que proveyó tres de los cultivos utilizados como controles positivos en el presente estudio, así como las muestras clínicas analizadas en el mismo.

### **2.2. Zona de estudio**

El desarrollo del presente proyecto se lo realizó en su totalidad en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicado en Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

Las muestras clínicas analizadas en el presente estudio consistieron en muestras de pacientes con sospecha de infección, procedentes del Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito, las mismas que comprendieron hisopados de tejido y secreciones de heridas.

### **2.3. Periodo de tiempo de investigación**

Esta investigación se desarrolló en un periodo de tiempo de 6 meses a partir del 2 de febrero del 2011, fecha en la cual dicho proyecto fue aprobado.

## **2.4. Diseño**

El presente proyecto de investigación se realizó en el marco de un diseño de tipo exploratorio-confirmatorio. Bajo este contexto, la fase exploratoria comprendió el diseño y optimización de un sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro basado en la secuencia del gen ADNr 16S, para la detección de eubacterias y la subsecuente identificación de seis especies bacterianas de relevancia clínica, mediante la evaluación de condiciones y parámetros óptimos del ensayo.

En cuanto a la fase confirmatoria, esta consistió en la evaluación del sistema optimizado como método de diagnóstico molecular de infecciones locales en muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección. Se compararon los resultados obtenidos por biología molecular versus los obtenidos a partir de las técnicas tradicionales de microbiología, información que fue provista por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín.

## **2.5. Procedimientos**

### **2.5.1. Preparación y mantenimiento de cultivos puros**

Se prepararon suspensiones celulares a partir de cultivos puros de cepas ATCC® y cepas nativas de especies bacterianas que han sido reportadas como agentes etiológicos de relevancia clínica en infecciones de diferente tipo. Las especies utilizadas comprenden tanto bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) como Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*). La descripción de las cepas utilizadas en el presente estudio se encuentra detallada en el Anexo A.

Las cepas fueron cultivadas en agar sangre y agar chocolate, a partir de los cuales se tomaron tres asas colmadas de cultivo puro, las mismas que se colocaron en 1,5mL de glicerol estéril al 15%, para su posterior conservación y almacenamiento a -20°C, durante el período que duró esta investigación.

### **2.5.2. Obtención de controles positivos**

Los controles positivos utilizados en el presente estudio consistieron en ADN genómico bacteriano extraído a partir de cultivos puros de las cepas antes mencionadas. Se prepararon medios de cultivo líquidos, excepto para el caso de la cepa de *Neisseria gonorrhoeae*, con la cual se trabajó únicamente a partir de cultivo sólido en agar chocolate. Para la preparación de medios líquidos se siguió el proceso descrito por Albán (2010), inoculando 100µL de suspensión celular directamente en 5mL de caldo cerebro-corazón, y se procedió a su incubación en agitación constante a 37°C por 18 horas.

Tras la siembra de las cepas se procedió a la extracción y purificación del material genético de las mismas, utilizando el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN, cuyo principio de separación y purificación se basa en el empleo de columnas de sílica. Posteriormente, el ADN obtenido se visualizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa, y finalmente se cuantificó su concentración.

#### *2.5.2.1. Extracción de ADN bacteriano usando el kit de extracción QIAGEN DNeasy Blood & Tissue*

El aislamiento de ADN genómico de los cultivos puros se realizó utilizando el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue empleando una

modificación al protocolo propuesto por el fabricante (QIAGEN, 2008). El procedimiento utilizado se detalla a continuación:

1. Se dispensaron 2mL de cultivo líquido bacteriano en microtubos para todas las cepas mencionadas, excepto para la cepa de *Neisseria gonorrhoeae*, en cuyo caso se tomaron tres asas colmadas de cultivo en agar chocolate, y se colocaron en un microtubo con 2mL de suero fisiológico.
2. Se procedió a centrifugar los microtubos por 10 minutos a 7500rpm, y se descartaron los sobrenadantes cuidando de no alterar los pellets.
3. Se adicionaron 128µL de buffer de lisis (preparada con 1,2% Tritón® X-100; 2mM EDTA; 20mM Tris.Cl, pH 8), 32µL de lisozima (15mg/mL), y 20µL de lisostafina (1.8mg/mL), ambas enzimas previamente descontaminadas con 8-MOP, de acuerdo al proceso descrito por Andrade (2009).
4. Se incubaron los microtubos en agitación constante por 90 minutos a 37°C.
5. Se añadieron 25µL de proteinasa K (20mg/mL) y 200µL de buffer AL (sin etanol), y se mezcló suavemente con vórtex para posteriormente incubar los microtubos en agitación constante por 60 minutos a 56°C.
6. Se adicionaron 200µL de etanol (96-100%) a la mezcla y se homogenizó con vórtex por 15 segundos.
7. Se colocaron cuidadosamente las mezclas en cada una de las columnas DNeasy Mini Spin las cuales se centrifugaron a 8000rpm por 1 minuto. Se descartaron los tubos colectores con el filtrado y se los reemplazó con unos nuevos.
8. Se añadieron 500µL de buffer AW1 y se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto. Se descartaron los tubos colectores con el filtrado y se los reemplazó con unos nuevos.
9. Se añadieron 500µL de buffer AW2 y los microtubos se centrifugaron a 14000rpm por 3 minutos. Se descartaron los tubos

colectores con el filtrado y se colocaron las columnas en microtubos estériles de 1,5mL.

10. Se adicionaron 50µL de buffer de elución AE y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto para luego centrifugar a 8000rpm por 1 minuto.
11. Se descartaron las columnas y el ADN se almacenó a -80°C.

#### 2.5.2.2. *Electroforesis en gel de agarosa*

Se procedió a verificar la integridad, el tamaño y la cantidad estimados del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa. La concentración a la cual es preparado el gel depende del tamaño de la molécula de ADN que será analizada en el mismo. En este caso, para la visualización de ADN genómico se preparó un gel de agarosa al 0,8%, como se describe a continuación:

1. Se pesó la cantidad de agarosa, grado biología molecular, necesaria para preparar el volumen deseado de gel al 0,8%.
2. Se disolvió la agarosa en buffer TBE 1X y se aforó al volumen final deseado.
3. Se hidrató la solución con agitación constante durante 10 minutos, para posteriormente calentarla por 1 minuto hasta su ebullición.
4. Se procedió a agitar nuevamente la solución por 5 minutos y se realizó un segundo calentamiento hasta la ebullición de la misma.
5. Se dejó enfriar la solución con agitación continua hasta que ésta alcanzara los 50 - 55°C, momento en el cual se añadió SYBR Safe (Invitrogen) para teñir el gel, en una relación 0,5µL del mismo por cada 10mL de buffer TBE 1X utilizado.
6. Se dispensó la mezcla en una cubeta para electroforesis con peineta y se dejó solidificar la misma a temperatura ambiente.



7. Se retiró la peineta y se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis horizontal sumergiéndolo en buffer TBE 1X hasta cubrirlo totalmente.

Una vez preparado el gel se procedió a cargar las muestras en cada uno de sus pocillos, adicionando 2 $\mu$ L de buffer de carga (*Blue Juice Loading Buffer 10X, Invitrogen*) para 10  $\mu$ L de muestra. Adicionalmente, se cargaron 5 $\mu$ L de marcador de peso molecular de 1Kb (*1 Kb Ladder DNA Marker, Axygen*), como referencia para estimar el tamaño del ADN a analizar. La migración electroforética se realizó por 1 hora a 100V y los resultados obtenidos se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV (*BioDoc- It, UVP*) a una longitud de onda de 365nm.

#### 2.5.2.3. Cuantificación de ADN por fluorometría

La concentración del ADN extraído fue determinada en un fluorómetro (*Qubit<sup>TM</sup>, Invitrogen*) mediante el kit comercial *Quant-iT dsDNA HS* de Invitrogen, que cuenta con los reactivos necesarios para la cuantificación (fluoróforo, buffer de dilución y estándares de calibración), y permite la detección de entre 0,01 y 100ng de ADN por microlitro. El protocolo utilizado fue el sugerido por el fabricante (Invitrogen, 2010), el mismo que se detalla a continuación:

1. Se preparó la solución de trabajo mezclando el fluoróforo con el buffer de dilución en una proporción de 1:200, considerando el volumen final por reacción de 200 $\mu$ L.
2. Se elaboraron las soluciones estándar mezclando 190 $\mu$ L de la solución de trabajo con 10 $\mu$ L de cada estándar de calibración. Las soluciones se mezclaron en un vórtex por 3 segundos.
3. En el caso de las muestras de ADN, éstas se prepararon mezclando la solución de trabajo con las muestras de ADN,

tomando en cuenta que puede añadirse de 1 a 10µL de muestra de ADN y se ajusta con la solución de trabajo a un volumen final por reacción de 200µL. Se mezcló en un vórtex por 3 segundos.

4. Se incubaron todos los tubos por 2 minutos a 37°C.
5. Se calibró el equipo con los dos estándares preparados anteriormente y se procedió a la lectura de cada una de las muestras por triplicado, para obtener valores más precisos.
6. Finalmente, se calculó la concentración de ADN mediante la siguiente fórmula:

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

Donde C es la concentración de ADN en ng/mL, Qf es la lectura obtenida por el fluorómetro y X es la cantidad de muestra analizada en microlitros.

Se realizaron diluciones de las muestras de ADN correspondientes a cada uno de los controles positivos, llevándolos a una concentración de 5ng/µL, para su posterior utilización en los ensayos de PCR en tiempo real.

### **2.5.3. Ensayo de PCR en tiempo real ADNr 16S**

#### *2.5.3.1. Cebadores y Sondas*

Las secuencias de los cebadores y sondas utilizados fueron tomadas de Yang *et al.* (2002) y Yang *et al.* (2008), las mismas que incluyen un par de cebadores dirigidos a secuencias conservadas que permiten la amplificación de un fragmento de 161pb, una sonda universal, dos sondas para la clasificación Gram de bacterias, y seis sondas para la identificación de patógenos específicos (*Tabla 2.1*).

**Tabla 2.1** Cebadores y sondas utilizados para la detección e identificación bacteriana de un fragmento del gen ADNr 16S. Secuencias tomadas de Yang *et al.* (2002) y Yang *et al.* (2008).

Nombre	Descripción	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)*	%GC
p891F	Cebador universal delantero	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA	54,7	40,9
p1033R	Cebador universal reverso	TGCGGGACTTAACCCAACA	56,8	52,6
UNI	Sonda Universal Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: VIC	CACGAGCTGACGACARCCATGCA	Min: 61,9 Media: 62,9 Máx: 63,9	58,7
OGP	Sonda para identificación de organismos Gram positivos Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: FAM	AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC	63,8	58,3
OGN	Sonda para identificación de organismos Gram negativos Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: VIC	ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT	67,6	59,3
SAU	Sonda para identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: FAM	CCTTTGACAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCC	60,7	48,4
SEP	Sonda para identificación de <i>Staphylococcus epidermidis</i> Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: VIC	AAAACCTCTATCTCTAGAGGGGCTAGAGGATGTCAAG	61,8	44,4
SAG	Sonda para identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: FAM	TGCTCCGAAGAGAAAGCCTATCTCTAGGCC	63,7	53,3
SPN	Sonda para identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: VIC	TCACCTCTGTCCCGAAGGAAAACCTCTATCTCTAGA	62,9	45,7
ECO	Sonda para identificación de <i>Escherichia coli</i> Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: FAM	ACATTCTCATCTCTGAAAACCTCCGTGGATGTC	61,1	42,4
NGH	Sonda para identificación de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Tipo TaqMan MGB Molécula Reportera: VIC	TCTCCGGAGGATTCCGCACATGTCAAAA	63,3	50

\*Temperatura de melting calculada con el programa IDT OLYGO ANALYZER versión 3.1.

Se realizó el alineamiento de secuencias para confirmar complementariedad con los oligonucleótidos y las secuencias blanco mediante la aplicación del programa bioinformático de alineamiento múltiple de secuencias, *ClustalX versión 2.0* (Anexos B, C y D). Los sitios de alineamiento seleccionados para los cebadores universales son

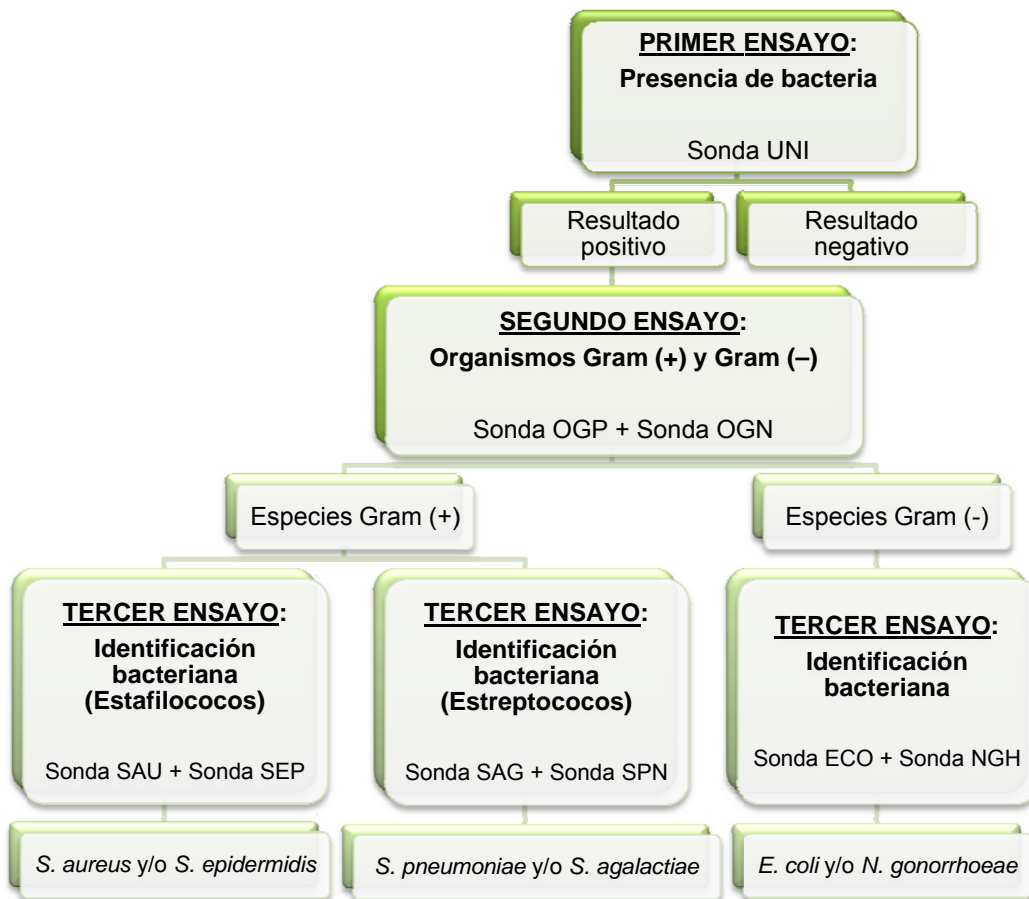
dos regiones altamente conservadas, las cuales a su vez están separadas por una región interna de secuencia altamente conservada, que sirvió como sitio de alineamiento para la sonda universal (UNI), y una región interna de secuencia altamente variable, que sirvió como sitio de alineamiento para las sondas de discriminación Gram y especie-específicas (OGP, OGN, SAU, SEP, SAG, SPN, ECO, y NGH). Es importante mencionar que la sonda universal (UNI) fue diseñada para hibridar a la cadena del ADN en dirección 3'-5'.

#### 2.5.3.2. *Protocolo de PCR en tiempo real de amplio espectro ADNr 16S*

Se evaluaron distintas concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación durante el proceso de optimización de la PCR en tiempo real, la misma que se llevó a cabo utilizando el kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), un par de cebadores universales (Invitrogen), y sondas de hidrólisis TaqMan MGB (Applied Biosystems), descritas previamente.

El kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* está provisto en una concentración 2X y contiene AmpliTaq Gold ADN Polimerasa, dNTPs, referencia pasiva (ROX), y componentes de buffer optimizados.

Las diversas sondas utilizadas permiten la detección simultánea de presencia de ADN bacteriano y la presencia de una o más especies en una sola reacción. Por esta razón, se utilizó un algoritmo de referencia para los ensayos de PCR. De esta manera, inicialmente se utilizó la sonda universal (UNI) en un primer ensayo para probar la presencia de eubacterias. Las muestras que resultaron positivas para esta prueba fueron luego analizadas en un segundo ensayo usando las sondas para discriminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Finalmente, se realizó un ensayo para la identificación de seis especies bacterianas mediante las sondas específicas (*Figura 2.1*).



**Figura 2.1** Algoritmo utilizado para ensayo multisonda en PCR en tiempo real (Autora).

El volumen final de cada reacción fue 50µL. Cada ensayo incluyó los controles positivos en tripletas, además de un control negativo de la extracción (CN<sub>1</sub>) y un control negativo de la PCR (CN<sub>2</sub>), ambos en dupletas. Las repeticiones por triplicado y duplicado se realizaron para verificar la consistencia de los ensayos y dar mayor precisión a los resultados. En todas las reacciones se añadieron 5µL de ADN de cada uno de los controles positivos analizados, mientras que en el caso de los controles negativos se añadió 5µL del control negativo obtenido en el proceso de extracción de ADN (CN<sub>1</sub>), y 5µL de agua estéril grado PCR (CN<sub>2</sub>).

Todos los ensayos se llevaron a cabo mediante una PCR bifásica, en un instrumento *ABI Prism 7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). El análisis de resultados se realizó empleando el programa informático *SDS Software v1.4* de Applied Biosystems.

#### **2.5.4. Determinación del límite de detección del sistema de PCR**

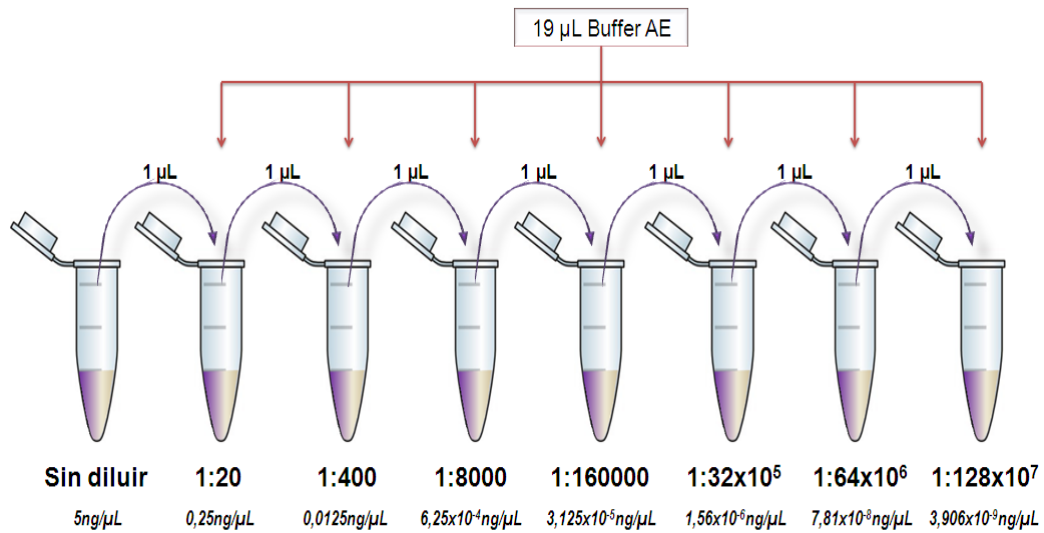
La sensibilidad analítica o límite de detección es la mínima cantidad de analito que es capaz de detectar el ensayo y puede ser expresado como número de copias del genoma, concentración de ADN, unidades formadoras de colonias (UFC), entre otros, del agente que puede ser detectado.

El límite de detección del sistema de PCR en tiempo real optimizado fue evaluado mediante pruebas de sensibilidad analítica, para lo cual se emplearon tanto diluciones seriadas del material genético como la técnica de conteo de UFC.

##### *2.5.4.1. Límite de detección por diluciones seriadas de ADN*

Se determinó la mínima concentración de ADN bacteriano detectable por el sistema optimizado de PCR en tiempo real mediante diluciones seriadas a partir de una mezcla de ADN de concentración conocida.

Para este estudio se tomó a *Staphylococcus aureus* como la bacteria de referencia para los controles positivos de todos los ensayos. De esta manera, se prepararon una serie de diluciones 1:20 a partir de una solución que contenía 5ng/μL de ADN de *S. aureus* (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Esquema de la preparación de diluciones seriadas de ADN para ensayo de límite de detección a partir de una solución de ADN de concentración conocida (Autora).

La solución inicial, así como cada una de las diluciones, fueron utilizadas como blanco de amplificación para el sistema optimizado de PCR en tiempo real de amplio espectro para detección de bacterias (sonda UNI). El ensayo se llevó a cabo por triplicado, y se incluyó además una dupleta para el control negativo de la extracción y una dupleta para el control negativo de la PCR. Los resultados fueron visualizados y analizados mediante el programa informático *SDS Software v1.4* de Applied Biosystems.

Se construyó una curva de calibración con los datos obtenidos de este ensayo, utilizando los valores de *Ct* en función del logaritmo de la concentración inicial de ADN, para cada dilución. A partir de esta gráfica se obtuvieron el coeficiente de correlación  $R^2$  y la ecuación de la recta, la misma que permitió obtener los datos necesarios para calcular la eficiencia del ensayo mediante la siguiente ecuación:

$$E = \left(10^{-1/m} - 1\right) \times 100$$

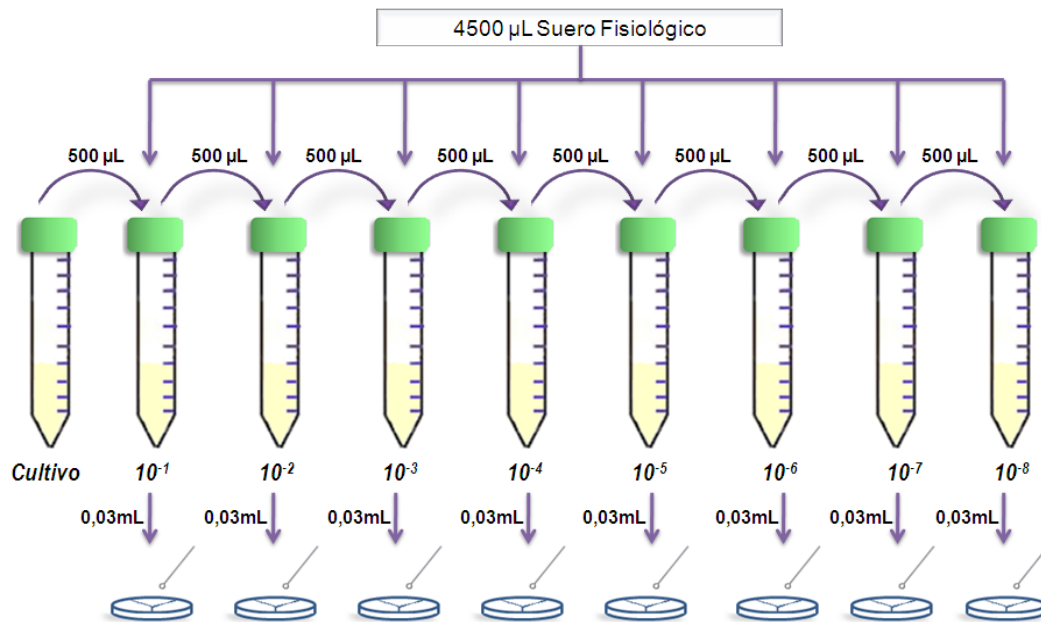
Donde  $E$  es la eficiencia del ensayo expresada en porcentaje, y  $m$  es la pendiente de la recta de la gráfica obtenida.

#### 2.5.4.2. Límite de detección por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Se determinó la mínima cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) detectable por el sistema optimizado de PCR en tiempo real mediante diluciones seriadas a partir de un cultivo puro de *S. aureus* en fase exponencial.

De esta manera, se inocularon 100 $\mu$ L de suspensión celular de *S. aureus* en 5mL de caldo cerebro-corazón, el mismo que se incubó por 18 horas a 37°C. A partir de este cultivo se realizaron diluciones sucesivas 1:10, llevando 500 $\mu$ L del mismo a 4500 $\mu$ L de suero fisiológico estéril, repitiendo este paso hasta llegar a la octava dilución. Una vez obtenidas cada una de estas diluciones, se procedió a sembrar por extensión cada una ellas con un asa calibrada de 0,03mL en agar manitol y en agar sangre (*Figura 2.3*).





**Figura 2.3** Esquema de la preparación de diluciones seriadas a partir de un cultivo puro de *S. aureus* (Autora).

Las diluciones se sembraron por triplicado en cada uno de los medios de cultivo, los cuales fueron incubados por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se procedió a contar el número de colonias presentes en cada uno de los platos y se realizó el cálculo respectivo de UFC/mL. Finalmente, se realizó la extracción de ADN genómico a partir de las diluciones, mediante el protocolo descrito en la sección 2.5.2.1. Las diluciones obtenidas se utilizaron como blanco de amplificación para el sistema optimizado de PCR en tiempo real de amplio espectro para detección de bacterias (sonda UNI).

El ensayo se llevó a cabo por triplicado, y se incluyó además una dupleta para el control negativo de la extracción y una dupleta para el control negativo de la PCR. Los resultados fueron visualizados y analizados mediante el programa informático *SDS Software v1.4* de Applied Biosystems.

### **2.5.5. Procesamiento de muestras clínicas**

El protocolo de biología molecular descrito fue evaluado como método de diagnóstico alternativo de infecciones locales, por lo que se procesaron muestras de pacientes con sospecha de infección, procedentes del Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito.

Las muestras analizadas comprendieron hisopados de tejido y secreciones de heridas, las mismas que fueron sometidas a una fase de enriquecimiento mediante su incubación en caldo cerebro-corazón por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se procedió a extraer el material genético de cada uno de los cultivos, mediante el protocolo descrito en la sección 2.5.2.1, y la posterior amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr 16S, como se indicó en la sección 2.5.3.2.

Para el análisis de muestras clínicas se llevaron a cabo dos ensayos de PCR en tiempo real. El primero para la detección de bacterias utilizando la sonda UNI y el segundo para la discriminación Gram de aquellas que resultaron positivas en el primer ensayo, utilizando las sondas OGP y OGN. En cada ensayo se incluyó un control positivo (ADN de *S. aureus* a 5ng/μL) por triplicado, y las respectivas dupletas de controles negativos (CN<sub>1</sub> y CN<sub>2</sub>).

Los resultados obtenidos por biología molecular se compararon con los reportados por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín, obtenidos por técnicas tradicionales de microbiología.

### **2.6. Análisis de datos**

Los datos y resultados obtenidos fueron analizados tanto cualitativa como cuantitativamente. En el primer caso, para la evaluación de los ensayos de PCR en tiempo real se tomó en cuenta el criterio de positividad para el

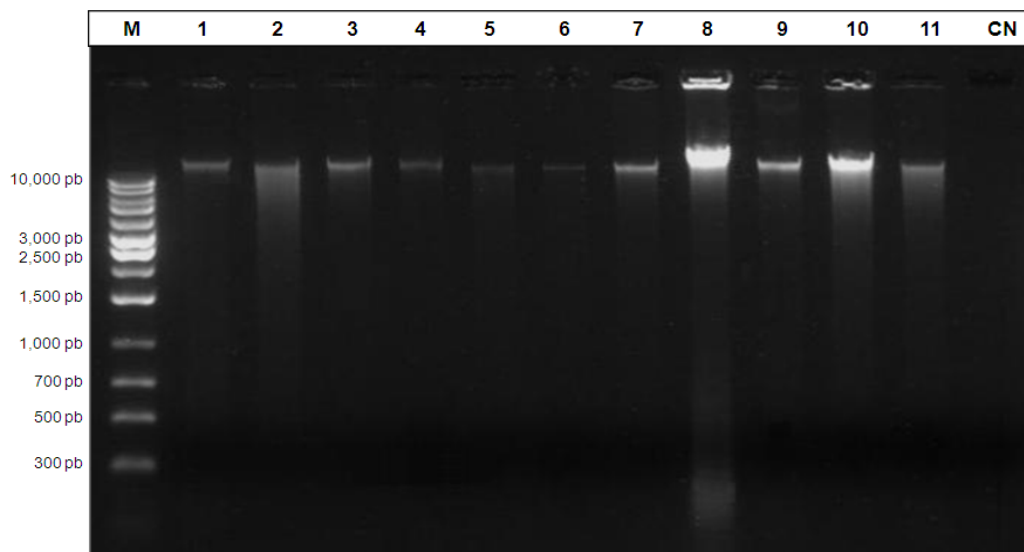
algoritmo considerado, donde el ensayo se reportó como positivo cuando hubo detección para las sondas con valores de  $C_t$  inferiores a los 30 ciclos, y como negativo a la ausencia de detección de fluorescencia o una detección que superara los 30 ciclos. En el segundo caso, el sistema optimizado de PCR en tiempo real para detección bacteriana (sonda UNI) fue valorado cuantitativamente mediante la determinación de su límite de detección en términos de cantidad de concentración de ADN y UFC/mL.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1. Obtención de controles positivos

Mediante el uso del protocolo de extracción y purificación de ADN, detallado en el capítulo anterior, se obtuvo el ADN genómico de las siguientes especies bacterianas: *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*.

El resultado obtenido luego de la electroforesis en gel de agarosa se muestra en la Figura 3.1, en donde se aprecia la presencia de ADN genómico íntegro y de alto peso molecular que no muestra indicios de degradación.



**Figura 3.1 Controles Positivos.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con SYBR Safe (Invitrogen) de ADN genómico extraído mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) a partir de cultivos puros bacterianos. M: marcador de peso molecular de 1Kb, 1: *E. coli*, 2: *N. gonorrhoeae*, 3: *S. aureus*, 4: *S. epidermidis*, 5: *S. agalactiae*, 6: *S. pneumoniae*, 7: *K. pneumoniae*, 8: *P. mirabilis*, 9: *P. aeruginosa*, 10: *E. faecalis*, 11: *E. faecium*, CN: Control negativo de la extracción.

Los resultados de la medición de la concentración del ADN obtenido de los controles positivos, mediante fluorimetría, se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Concentración de ADN (ng/μL) de los controles positivos determinada mediante fluorimetría.

Muestra	Concentración (ng/μL)
<i>E. coli</i>	15,53
<i>N. gonorrhoeae</i>	13,53
<i>S. aureus</i>	13,05
<i>S. epidermidis</i>	12,67
<i>S. agalactiae</i>	10,78
<i>S. pneumoniae</i>	8,71
<i>K. pneumoniae</i>	20,38
<i>P. mirabilis</i>	50,20
<i>P. aeruginosa</i>	21,41
<i>E. faecalis</i>	28,20
<i>E. faecium</i>	13,81

Las concentraciones del ADN genómico, obtenido de cada uno de los controles, presentan valores variables, siendo el menor de ellos 8,71ng/μL en el caso de *S. pneumoniae*.

### 3.2. Ensayo de PCR en tiempo real ADNr 16S

La optimización del sistema de PCR en tiempo real se llevó a cabo estableciendo las cantidades y concentraciones más adecuadas de cada uno de los reactivos utilizados, así como las condiciones óptimas de termociclado.

Las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados por reacción para cada uno de los ensayos se encuentran descritas en las Tablas 3.2 y 3.3.

**Tabla 3.2** Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para el ensayo de PCR en tiempo real de detección de bacterias mediante la utilización de la sonda UNI.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
<i>Cebador p891F</i>	100 pmol/μL	0,9 pmol/μL	0,45
<i>Cebador p1033R</i>	100 pmol/μL	0,9 pmol/μL	0,45
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i>	2X	1X	25
<i>Sonda UNI</i>	20 μM	200 nM	0,5
<i>Agua grado PCR</i>	-	-	18,6
<b>VOLUMEN TOTAL</b>			<b>45</b>

**Tabla 3.3** Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para los ensayos de PCR en tiempo real de identificación de bacterias mediante la utilización de las sondas de discriminación de tipo Gram y sondas especie-específicas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
<i>Cebador p891F</i>	100 pmol/μL	0,9 pmol/μL	0,45
<i>Cebador p1033R</i>	100 pmol/μL	0,9 pmol/μL	0,45
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i>	2X	1X	25
<i>Sonda 1*</i>	20 μM	200 nM	0,5
<i>Sonda 2*</i>	20 μM	200 nM	0,5
<i>Agua grado PCR</i>	-	-	18,1
<b>VOLUMEN TOTAL</b>			<b>45</b>

\*Corresponden a las sondas utilizadas para cada tipo de ensayo (OGP-OGN, SAU-SEP, SAG-SPN, y ECO-NGH)

Las condiciones de termociclado optimizadas y empleadas para la amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr 16S, se muestran en la Tabla 3.4. La temperatura de hibridación óptima para el ensayo de PCR en tiempo real de amplio espectro fue de 60°C, la misma que fue determinada partiendo de las temperaturas de melting calculadas para cada uno de los cebadores y sondas utilizados en este estudio.

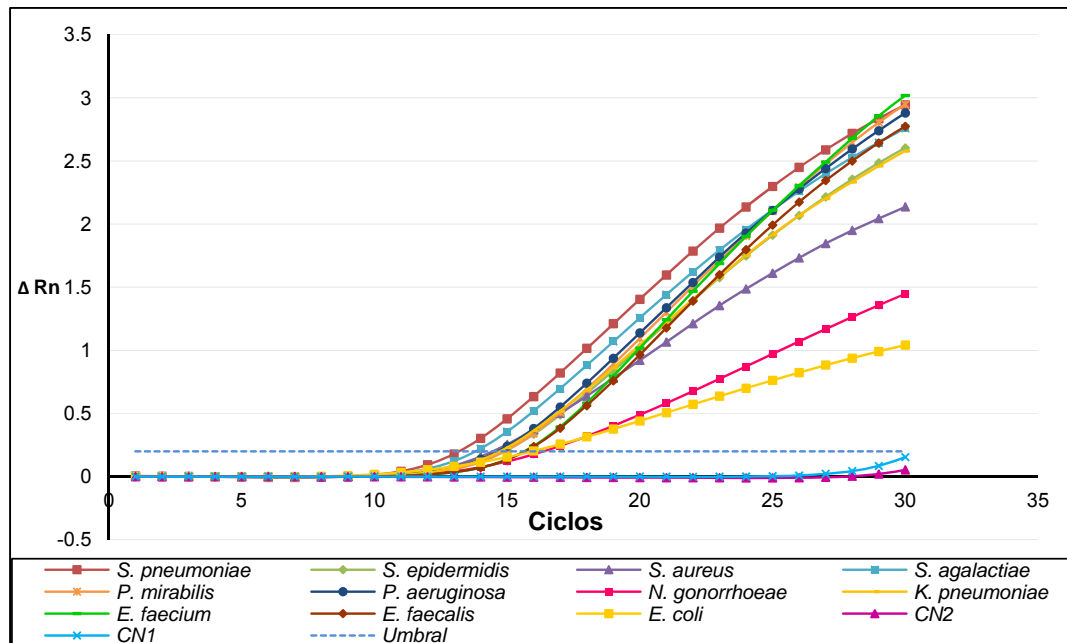
**Tabla 3.4** Programa del termociclador empleado para la amplificación de un fragmento de 161pb del gen ADNr 16S en bacterias por PCR en tiempo real.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
<i>Activación de la enzima</i>	50	2 min.	1
<i>Denaturación inicial</i>	95	10 min.	
<i>Denaturación</i>	95	10 seg.	30
<i>Hibridación-Extensión</i>	60	1 min	
<i>Extensión final</i>	72	2 min.	1

Los resultados obtenidos tras la amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr 16S, en los controles positivos, con el sistema optimizado de PCR en tiempo real de amplio espectro, se muestran a continuación.

### 3.2.1. Primer Ensayo – Detección de bacterias mediante sonda UNI

Los resultados de la amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr 16S, en los controles positivos con la sonda fluorescente UNI, se observan en la Figura 3.2. Aquí se muestran las curvas de amplificación obtenidas mediante el ensayo de PCR en tiempo real de amplio espectro, elaboradas con el promedio de cada una de las repeticiones empleadas para cada control.



**Figura 3.2** Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADN<sub>r</sub>16S de los controles positivos, obtenidos mediante PCR en tiempo real, utilizando la sonda UNI. Resultados graficados a partir de datos obtenidos mediante el programa SDS Software v1.4, en un instrumento ABI Prism 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems (2011).

Como se observa en la Figura 3.2, el sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro permite una amplificación eficiente de la región blanco para 11 especies bacterianas distintas.

Las curvas de amplificación del ensayo difieren para cada microorganismo, lo que se ve reflejado en los valores de  $C_t$ , los cuales son distintos para cada uno de ellos (Anexo E). Los valores de  $C_t$  fueron calculados en base a un valor de 0,2 para el umbral, el mismo que fue establecido automáticamente por el equipo utilizado.

Por otro lado, las curvas correspondientes a los controles negativos utilizados (CN<sub>1</sub> y CN<sub>2</sub>) demuestran que no existe contaminación durante los procesos de extracción de material genético ni en el ensamblaje de las reacciones.

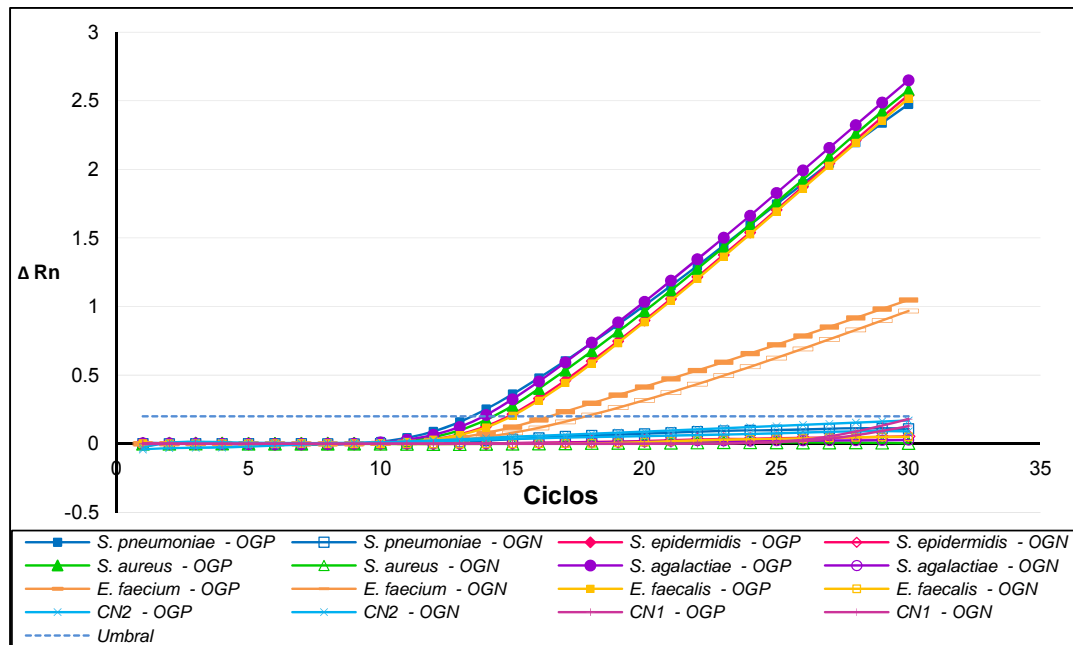


### **3.2.2. Segundo Ensayo – Discriminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante sondas OGP y OGN**

Los resultados obtenidos de la amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr 16S en los controles positivos con las sondas fluorescentes OGP y OGN se observan en las Figuras 3.3 y 3.4, para organismos Gram positivos y Gram negativos, respectivamente. Las curvas de amplificación obtenidas mediante el ensayo de PCR en tiempo real, fueron elaboradas con el promedio de cada una de las repeticiones empleadas para cada control.

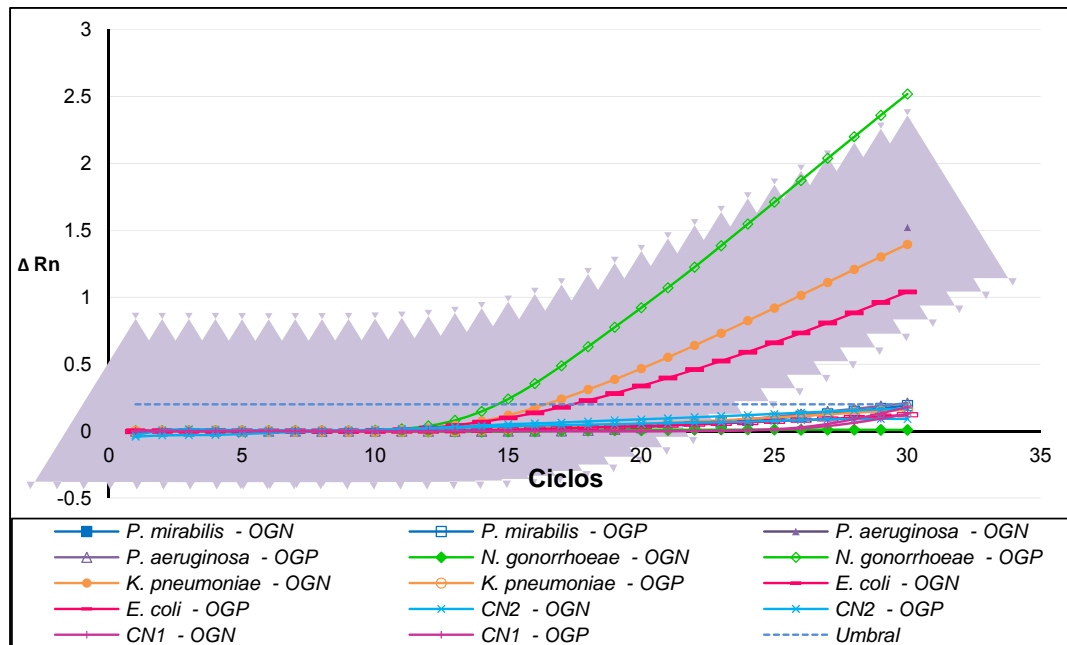
Las Figuras 3.3 y 3.4 muestran que el sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro permite una amplificación eficiente de la región blanco para las 6 especies bacterianas Gram positivas y las 5 especies bacterianas Gram negativas utilizadas como controles positivos para este estudio. Las curvas de amplificación presentan diferentes valores de  $C_t$  (Anexo F), los mismos que fueron calculados en base a un valor de 0,2 para el umbral, el mismo que fue establecido automáticamente por el equipo utilizado.

Por otro lado, se puede observar que las señales de fluorescencia emitidas por los controles negativos utilizados ( $CN_1$  y  $CN_2$ ) para cada uno de los respectivos ensayos no mostraron detección para ninguna de las sondas utilizadas, lo que demuestra que los procesos de extracción del material genético y el ensamblaje de las reacciones no se vieron afectados por contaminantes intrínsecos y/o extrínsecos.



**Figura 3.3** Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADN<sub>r</sub>16S de los controles positivos, correspondientes al grupo de bacterias Gram positivas, obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas OGP y OGN. Resultados graficados a partir de datos obtenidos mediante el programa SDS Software v1.4, en un instrumento ABI Prism 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems (2011).

La Figura 3.3 muestra detección positiva para la sonda OGP en las muestras de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *E. faecium* y *E. faecalis*, así como la ausencia de detección para la sonda OGN en todas las muestras, excepto para *E. faecium*. Debido a la inconsistencia del resultado para este control, se decidió analizar el cultivo inicial a partir del cual se realizó la extracción de ADN. La cepa fue evaluada mediante cultivo microbiológico por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín, el mismo que reportó la existencia de microorganismos contaminantes en el cultivo primario.

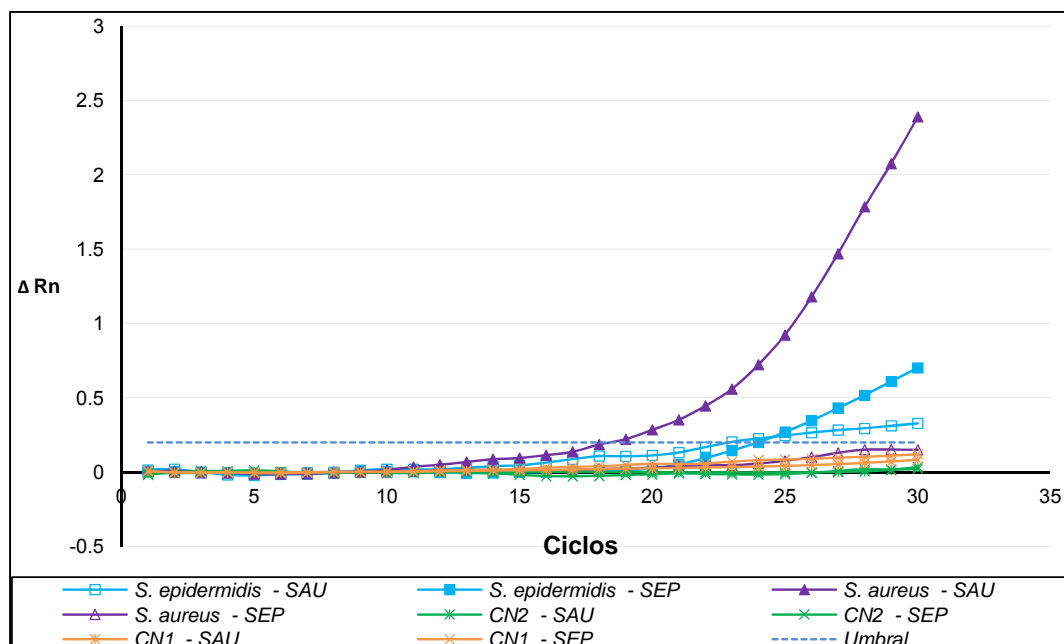


**Figura 3.4** Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S de los controles positivos, correspondientes al grupo de bacterias Gram negativas, obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas OGP y OGN. Resultados graficados a partir de datos obtenidos mediante el programa SDS Software v1.4, en un instrumento ABI Prism 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems (2011).

La Figura 3.4 muestra la detección para la sonda OGN en las muestras de *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, y la ausencia de detección para la sonda en OGP en las mismas. En el caso de *N. gonorrhoeae*, se observa la detección de la sonda OGP y la ausencia de la misma para la sonda OGN. Debido a la inconsistencia del resultado para este control, se decidió analizar el cultivo inicial a partir del cual se realizó la extracción de ADN. La cepa fue evaluada mediante cultivo microbiológico por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín, el mismo que reportó la existencia de microorganismos contaminantes y la ausencia del microorganismo *N. gonorrhoeae* en el cultivo primario.

### 3.2.3. Tercer Ensayo – Identificación bacteriana mediante sondas especie-específicas (SAU, SEP, SAG, SGN, ECO y NGH)

Los resultados obtenidos a partir de la amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr 16S, mediante el sistema optimizado para los controles positivos con las sondas fluorescentes especie-específicas, se observan en las Figuras 3.5, 3.6 y 3.7, para seis especies bacterianas de relevancia clínica: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *E.coli* y *N. gonorrhoeae*. Las curvas de amplificación obtenidas mediante el ensayo de PCR en tiempo real, fueron graficadas a partir del promedio de cada una de las repeticiones realizadas para cada control.

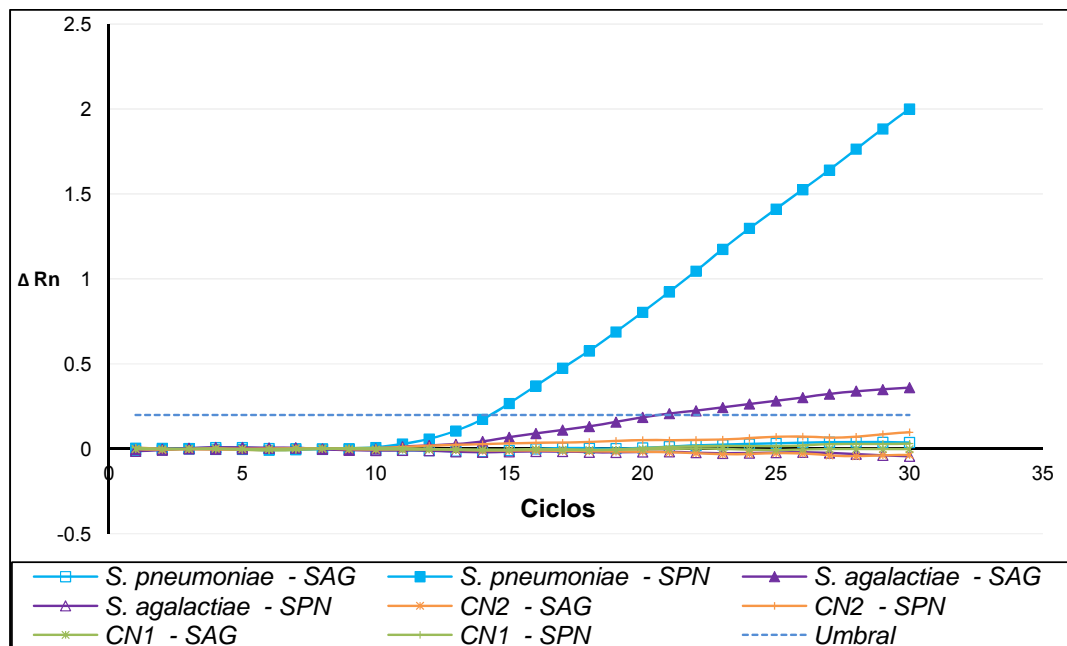


**Figura 3.5** Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S de *S. aureus* y *S. epidermidis*, obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas SAU y SEP. Resultados graficados a partir de datos obtenidos mediante el programa SDS Software v1.4, en un instrumento ABI Prism 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems (2011).

La Figura 3.5 muestra la amplificación eficiente del producto objetivo para las dos especies de estafilococo utilizadas como controles

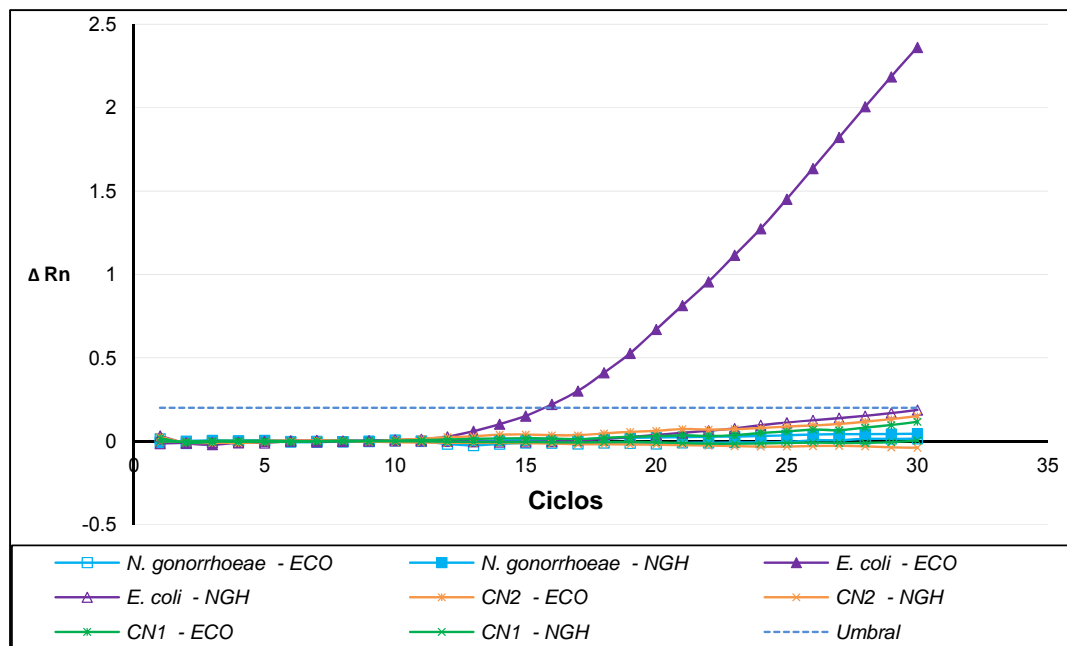
positivos. Las curvas de amplificación presentan diferentes valores de  $C_t$ , los mismos que fueron calculados en base a un valor de 0,2 para el umbral, el cual fue establecido automáticamente por el equipo utilizado. De esta manera, los valores de  $C_t$  calculados por el equipo para la detección de la sonda SAU fueron 18,45 y 23,02 para *S. aureus* y *S. epidermidis*, respectivamente. Para la sonda SEP este valor fue de 23,95 para *S. epidermidis*, e indeterminado para *S. aureus*, indicando la ausencia de detección para esa sonda.

Los resultados para este ensayo son inconsistentes debido a la detección por las dos sondas para *S. epidermidis*, lo cual puede indicar contaminación en este control o problemas de hibridación de la sonda SAU a la secuencia blanco.



**Figura 3.6** Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADN<sub>r</sub>16S de *S. agalactiae* y *S. pneumoniae*, obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas SAG y SPN. Resultados graficados a partir de datos obtenidos mediante el programa SDS Software v1.4, en un instrumento ABI Prism 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems (2011).

La Figura 3.6 muestra la amplificación del producto objetivo para las dos especies de estreptococos utilizadas como controles positivos. Las curvas de amplificación presentan diferentes valores de  $C_t$ , los mismos que fueron calculados en base a un valor de 0,2 para el umbral, el cual fue establecido automáticamente por el equipo utilizado. De esta manera, los valores de  $C_t$  calculados por el equipo para la detección de la sonda SAG fueron 20,79 para *S. agalactiae* e indeterminada para *S. pneumoniae*, indicando la ausencia de detección en este control. Para la sonda SPN el  $C_t$  fue 14,33 para *S. pneumoniae* e indeterminada para *S. agalactiae*, indicando la ausencia de detección en este control.



**Figura 3.7** Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADN<sub>r</sub>16S de *E. coli* y *N. gonorrhoeae*, obtenidas mediante PCR en tiempo real utilizando las sondas ECO y NGH. Resultados graficados a partir de datos obtenidos mediante el programa SDS Software v1.4, en un instrumento ABI Prism 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems (2011).

La Figura 3.7 muestra la curva de amplificación correspondiente al control positivo de *E. coli*, donde se observa la detección para la sonda ECO con un valor de  $C_t$  de 15,83, el cual fue calculado en base a un valor de 0,2 para el umbral, el mismo que fue establecido

automáticamente por el equipo utilizado. Se observa además la ausencia de detección para la sonda NGH en este control. En el caso de *N. gonorrhoeae* no se observa detección para ninguna de las dos sondas, indicando la ausencia de hibridación de las mismas en la secuencia blanco.

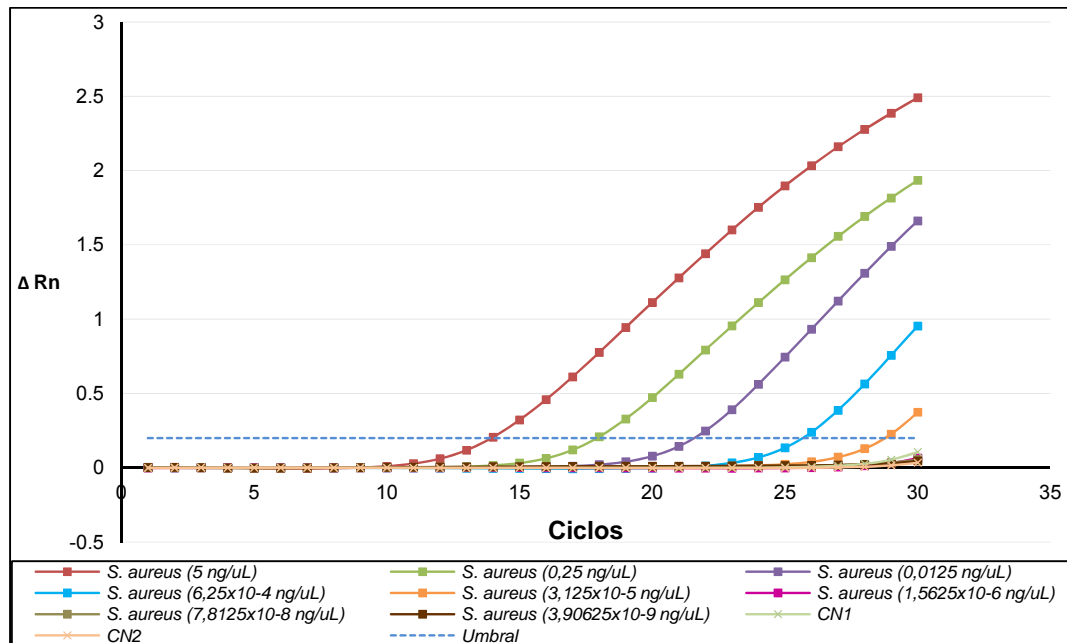
Los resultados para este ensayo son inconsistentes debido a la ausencia de detección de la sonda específica para *N. gonorrhoeae*, lo cual se puede explicar con los resultados reportados por el Laboratorio de Bacteriología del HCAM obtenidos a partir de cultivo microbiológico de la cepa inicial utilizada para la extracción de ADN, los mismos que indicaban la ausencia de este microorganismo en el cultivo inicial y la presencia de microorganismos contaminantes.

Adicionalmente, los controles negativos utilizados (CN<sub>1</sub> y CN<sub>2</sub>) para cada uno de los respectivos ensayos muestran ausencia de detección para todas las sondas utilizadas, lo que manifiesta que los procesos de extracción del material genético y el ensamblaje de las reacciones no se vieron afectados por contaminantes intrínsecos ni extrínsecos.

### **3.3. Determinación del límite de detección por diluciones seriadas de ADN**

Los resultados del ensayo utilizado para determinar el límite de detección del sistema, mediante diluciones seriadas de ADN de *S. aureus*, se presentan en la Figura 3.8. Se demuestra que el sistema de PCR de amplio espectro en tiempo real permite una amplificación eficiente y consistente de la región objetivo hasta la dilución 1:160000 a partir de una solución inicial de 5ng/μL de ADN de *S. aureus*. Esto permite establecer que el ensayo de PCR

en tiempo real es capaz de detectar una cantidad mínima de ADN igual a 31,25 fg/ $\mu$ L.

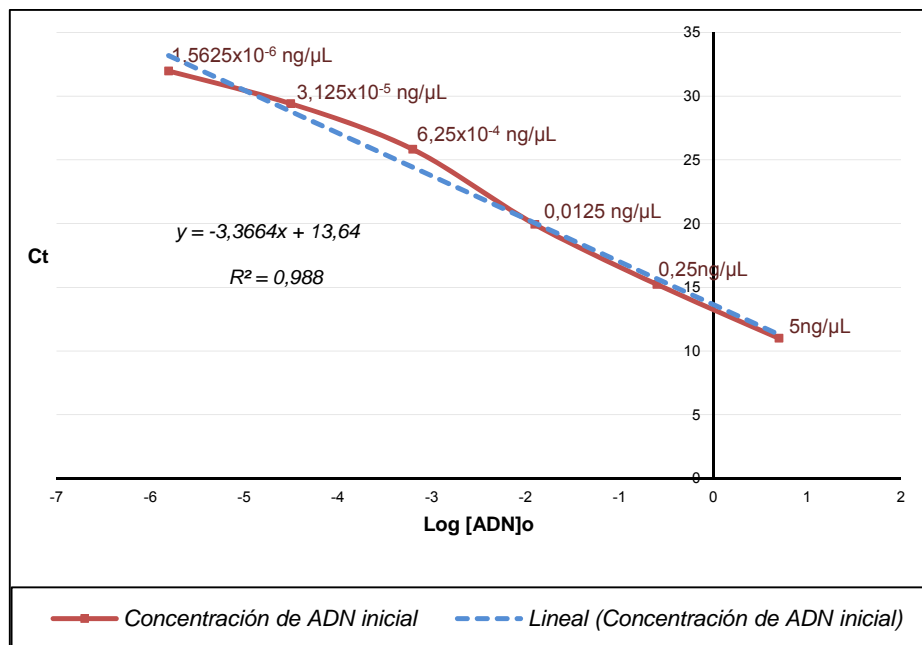


**Figura 3.8** Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S del ensayo de límite de detección del sistema de PCR en tiempo real mediante diluciones seriadas de ADN de *S. aureus*, utilizando la sonda UNI. Resultados graficados a partir de datos obtenidos mediante el programa SDS Software v1.4, en un instrumento ABI Prism 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems (2011).

Con los datos obtenidos de este ensayo, se graficó la curva de calibración con los valores de  $C_t$  en función del logaritmo de la concentración inicial de ADN, para cada dilución (Figura 3.9), tomando en cuenta los valores obtenidos hasta la quinta dilución ( $1,5625 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ L).

De esta manera, se obtuvieron el coeficiente de correlación  $R^2$  y la ecuación de la recta para calcular la eficiencia del ensayo. Como muestran los datos de la Figura 3.9, el coeficiente de correlación  $R^2$  presenta un valor de 0,988, y en base a los datos obtenidos de la ecuación de la recta se calculó la eficiencia del ensayo, la misma que fue del 98,18%.



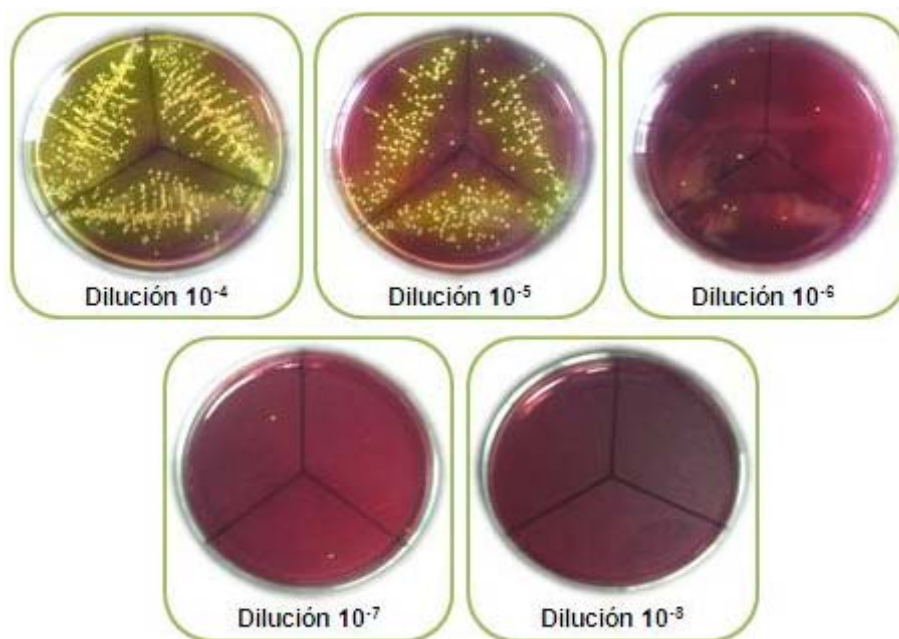


**Figura 3.9** Curva de calibración a partir del ensayo de límite de detección del sistema de PCR en tiempo real mediante diluciones seriadas de ADN de *S. aureus*.

### 3.4. Determinación del límite de detección por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)

Los resultados de la siembra en caja de las diluciones sucesivas realizadas de *S. aureus* en agar manitol y agar sangre se muestran en las Figuras 3.10 y 3.11 respectivamente.

A continuación se muestra el recuento de UFC y el respectivo cálculo de UFC/mL presentes en cada una de las diluciones para cada medio de cultivo (Tablas 3.5 y 3.6).

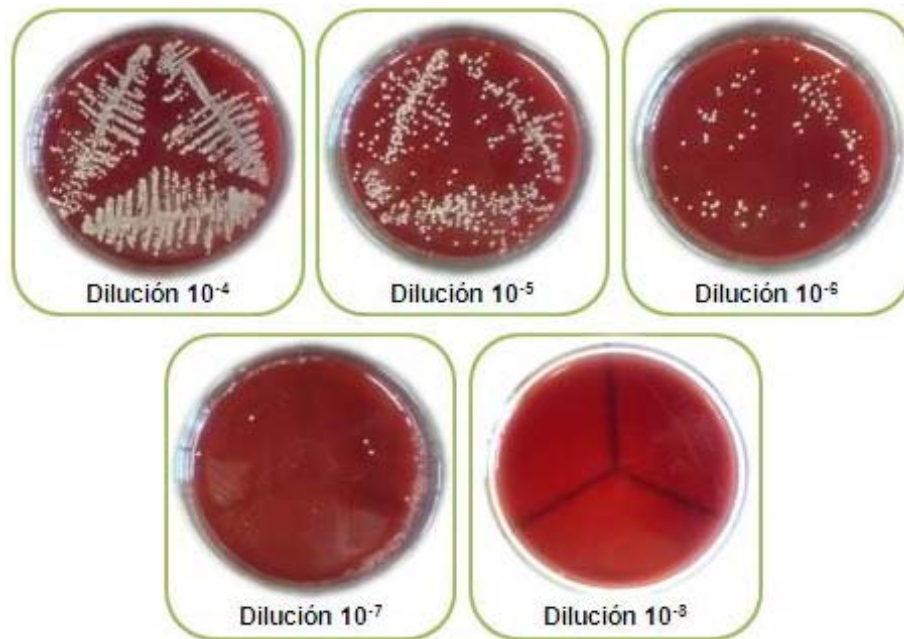


**Figura 3.10** Resultados de la siembra por triplicado de las diluciones sucesivas de cultivo puro de *S. aureus* en agar manitol.

**Tabla 3.5** Recuento de UFC y resultados del cálculo para la obtención de UFC/mL en diluciones sucesivas de cultivo puro de *S. aureus* en agar manitol.

Dilución	Recuento por triplicado			Promedio	UFC/mL
$10^{-4}$	NC	NC	NC	-	-
$10^{-5}$	129	114	133	125,33	4170
$10^{-6}$	5	3	1	3	100
$10^{-7}$	0	1	1	0,667	20
$10^{-8}$	0	0	0	0	0

**NC: No contable**



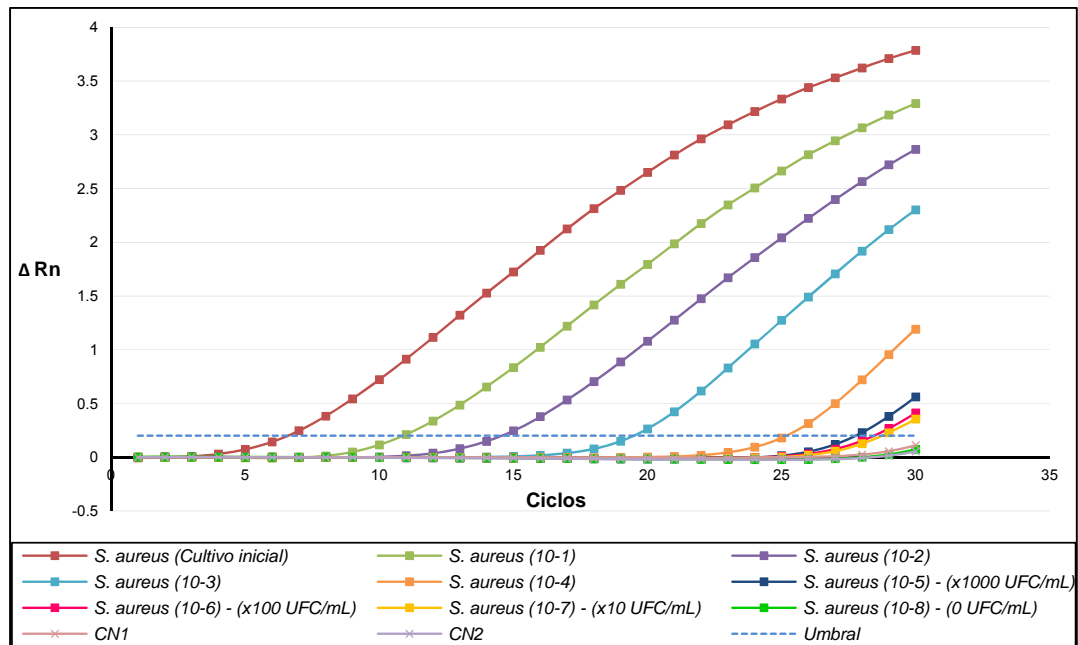
**Figura 3.11** Resultados de la siembra por triplicado de las diluciones sucesivas de cultivo puro de *S. aureus* en agar sangre.

**Tabla 3.6** Recuento de UFC y resultados del cálculo para la obtención de UFC/mL en diluciones sucesivas de cultivo puro de *S. aureus* en agar sangre.

Dilución	Recuento por triplicado			Promedio	UFC/mL
$10^{-4}$	NC	NC	NC	-	-
$10^{-5}$	220	210	186	205,33	6840
$10^{-6}$	32	26	23	27	900
$10^{-7}$	3	2	0	1,67	55
$10^{-8}$	0	0	0	0	0

NC: No contable

El ADN obtenido de cada una de las diluciones fue evaluado mediante el sistema optimizado de PCR en tiempo real y los resultados del ensayo se muestran en la Figura 3.12.



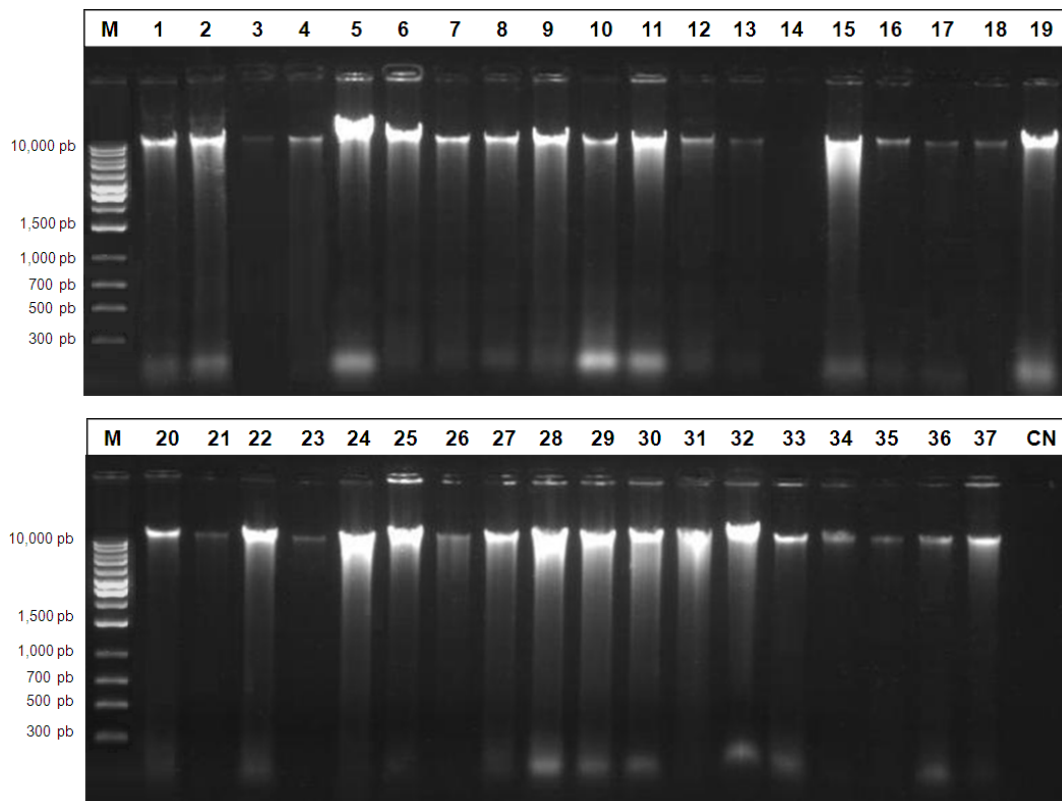
**Figura 3.12** Curvas de amplificación del fragmento de 161pb del gen ADNr16S del ensayo de límite de detección del sistema de PCR en tiempo real a partir de diluciones seriadas de *S. aureus*, utilizando la sonda UNI. Resultados graficados a partir de datos obtenidos mediante el programa SDS Software v1.4, en un instrumento ABI Prism 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems (2011).

La Figura 3.12 muestra que el sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro permite una amplificación eficiente y consistente de la región objetivo hasta la dilución  $10^{-7}$  de un cultivo puro inicial de *S. aureus*. De acuerdo al cálculo realizado, se establece que el ensayo de PCR en tiempo real es capaz de detectar una cantidad mínima de 20 UFC/mL, tomando en cuenta el recuento en medio agar manitol, y 55 UFC/mL, al tomar en cuenta el recuento en agar sangre, es decir, una cantidad en el orden de 10 UFC/mL.

### 3.5. Procesamiento de muestras clínicas

Se procesaron un total de 37 muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección. Los resultados obtenidos de la extracción de material genético de las mismas se observa en la Figura 3.13.

Durante la primera fase de aislamiento de material genético, no se pudo extraer ADN de la muestra clínica 3, por lo que se propuso una modificación del protocolo de extracción de ADN. La modificación fue aplicada únicamente a la muestra 3, añadiendo 20µL de lisostafina (1,8mg/mL) al coctel lítico en la fase de lisis celular. Partiendo de esta modificación, se logró obtener ADN de esta muestra clínica, y se lo corrió en un gel de agarosa junto con las demás muestras (Figura 3.13).



**Figura 3.13 Muestras clínicas.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con SYBR Safe (Invitrogen) de ADN genómico extraído mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) a partir de muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección. M: marcador de peso molecular de 1Kb, 1-37: Muestras clínicas, CN: Control negativo de la extracción.

Se puede observar en la Figura 3.13 la presencia de ADN de elevado peso molecular en todas las muestras analizadas excepto para la muestra 14, en donde no se observa la presencia de ninguna banda. Además, se observa en varias de las muestras la presencia de signos de degradación, evidenciado por un *smear* a lo largo del pocillo. Todas las muestras presentan variedad en

la intensidad de sus bandas lo que indica diferencias de concentración del material genético aislado. Las concentraciones medidas por fluorimetría de cada muestra se muestran en la Tabla 3.7.

**Tabla 3.7** Concentración de ADN (ng/μL) obtenido a partir de muestras clínicas medida por fluorimetría.

Muestra	Concentración ADN (ng/μL)
M1	15,53
M2	33,53
M3	9,05
M4	11,82
M5	> 120
M6	65,67
M7	13,81
M8	14,66
M9	50,2
M10	13,69
M11	61,4
M12	10,78
M13	8,71
M14	-
M15	85,46
M16	20,33
M17	9,53
M18	9,03
M19	21,41
M20	28,2
M21	9,29
M22	79,07
M23	9,46
M24	> 120
M25	> 120
M26	6,44
M27	24,11
M28	> 120
M29	> 120
M30	> 120
M31	> 120
M32	> 120
M33	9,17
M34	10,92
M35	7,83
M36	10,09
M37	13,46

La Tabla 3.7 muestra una gran diferencia de concentración para cada una de las muestras, siendo 6,44ng/μL la menor de ellas, correspondiente a la muestra 26, y >120 ng/μL, para varias de las muestras, el mismo que es el valor máximo detectado por el kit de cuantificación.

El ADN extraído de todas las muestras clínicas fue utilizado en la siguiente fase de detección e identificación bacteriana mediante PCR en tiempo real. Los resultados de los ensayos llevados a cabo tanto para la detección (sonda UNI) como para la identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas (sondas OGP y OGN) se detallan en la Tabla 3.8.

Las muestras clínicas fueron sometidas a dos ensayos de PCR en tiempo real, el primero para la detección de bacterias (sonda UNI) y el segundo para la discriminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas (OGP y OGN) de aquellas muestras que resultaron positivas en el primer ensayo. No se realizó un tercer ensayo, para identificación bacteriana debido a la inconsistencia de los resultados obtenidos con los controles positivos.

**Tabla 3.8** Comparación de resultados de muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección, por microbiología y ensayo de PCR en tiempo real.

Código	Muestra	Resultado Microbiología (HCAM)		Resultado Biología Molecular (PCR en tiempo real)	
		Microorganismo	Gram	Detección (UNI)	Identificación Gram (OGP/OGN)
M1	Herida de codo	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Positivo	+
M2	Herida	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Positivo	+
M3	Herida de rodilla	<i>Candida tropicalis</i>	NA	Negativo	NA
M4	Canal medular	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M5	Herida	<i>Enterobacter spp.</i>	-	Positivo	-
M6	Herida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M7	Secreción de muslo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M8	Secreción de muslo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M9	Fragmento óseo de fémur	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M10	Herida	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Positivo	-
M11	Herida de rodilla	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Positivo	-
M12	Herida	<i>Staphylococcus epidermidis</i> metilino resistente	+	Positivo	+

M13	Herida	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	+	Positivo	+
M14	Pulmón	SIN DESARROLLO	NA	Negativo	NA
M15	Secreción de muslo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M16	Canal medular	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M17	Pulmón	<i>Streptococcus viridans</i>	+	Positivo	+
M18	Herida	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Positivo	+
M19	Secreción de pierna	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	+	Positivo	+
M20	Secreción de muslo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	+, -
M21	Canal medular	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M22	Secreción de muslo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M23	Absceso en submaxilar	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Positivo	+
M24	Úlcera	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Positivo	+, -
M25	Secreción de ojo	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	+, -	Positivo	+, -
M26	Úlcera	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> meticilino resistente	+, -	Positivo	+, -
M27	Herida	<i>Staphylococcus epidermidis</i> meticilino resistente	+	Positivo	+, -
M28	Líquido de cavidad abdominal	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	+, -	Positivo	+, -
M29	Líquido de cavidad abdominal	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	+, -	Positivo	+, -
M30	Líquido peritoneal	<i>Escherichia coli</i> , cepa productora de BLEE	-	Positivo	-
M31	Herida de rodilla	<i>Staphylococcus epidermidis</i> meticilino resistente	+	Positivo	+
M32	Herida	<i>Staphylococcus epidermidis</i> meticilino resistente	+	Positivo	+, -
M33	Herida de rodilla	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Positivo	+, -
M34	Herida de rodilla	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	+, -
M35	Herida de rodilla	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo	-
M36	Secreción de ojo	<i>Streptococcus viridans</i>	+	Positivo	+, -
M37	Secreción de ojo	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> (cepa productora de BLEE)	-	Positivo	+, -

HCAM: Hospital Carlos Andrade Marín; NA: No aplica; +: Gram positivo; -: Gram negativo; +,-: Presencia de Gram positivos y Gram negativos.

La Tabla 3.8 muestra tanto los resultados reportados por el Laboratorio de Bacteriología del HCAM, como los obtenidos mediante el ensayo de PCR en tiempo real desarrollado en este estudio.

En el caso de las muestras 3 y 14, estas únicamente fueron evaluadas con el primer ensayo ya que resultaron negativas en este. Los resultados de estas muestras concuerdan con aquellos reportados por el HCAM, ya que la



muestra 3 corresponde a *C. tropicalis* (no detectable con el ensayo de PCR en tiempo real) y la muestra 14 resultó negativa en el cultivo microbiológico descartando la presencia de bacterias.

En cuanto a la discriminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas, 27 de las 35 muestras clínicas evaluadas en el segundo ensayo de PCR en tiempo real arrojaron resultados concordantes con aquellos reportados por el HCAM. En cuanto a las 8 muestras restantes, correspondientes a las muestras 20, 24, 27, 32, 33, 34, 36 y 37, estas mostraron detección tanto para la sonda OGP como para OGN, lo que indica la presencia de más de una especie bacteriana, a diferencia de los resultados reportados por el HCAM. De acuerdo a estos resultados, de un total de 37 muestras clínicas evaluadas por biología molecular, el 78,37% de las mismas mostraron los mismos resultados que aquellos reportados por cultivo microbiológico.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El empleo de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico de patógenos, en el área biomédica, se aplica principalmente en cepas cuya identificación por métodos tradicionales resulta imposible, difícil o requiere de mucho tiempo, como en los casos de bacterias no cultivables, fastidiosas, o de crecimiento lento. Por esta razón, la aplicación de la PCR de amplio espectro brinda una importante alternativa ante las técnicas tradicionales de cultivo, para la detección e identificación rápida de patógenos en muestras clínicas (Petti, 2007; Olson *et al.*, 2010).

El gen ADNr 16S es un blanco genético interesante debido a su presencia en todas las eubacterias. La existencia de múltiples copias en los genomas bacterianos y la existencia de regiones altamente conservadas, así como regiones hipervariables, han permitido el diseño y utilización de cebadores universales y la diferenciación entre especies bacterianas al mismo tiempo (Rodicio y Mendoza, 2003; Olson *et al.*, 2010).

Dentro de este contexto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar y optimizar un sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro, haciendo uso de un diseño multisonda para la detección e identificación de seis especies bacterianas de relevancia clínica, y posteriormente evaluarlo como método de diagnóstico molecular en pacientes con sospecha de infección.

En este estudio, el aislamiento del material genético fue el primer paso dentro de la identificación de microorganismos mediante técnicas moleculares, razón por la cual se procuró contar con un método eficiente para la obtención de ADN de alta pureza, integridad y calidad. El protocolo propuesto por el fabricante del kit utilizado en el presente trabajo para el aislamiento y purificación de ADN, fue modificado para obtener resultados igualmente eficientes tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Sin embargo, la cantidad de ADN obtenido a partir de los controles positivos resulta

bastante variable, lo cual puede deberse a la cantidad inicial de bacterias presentes en cada uno de los cultivos de los cuales se extrajo el ADN.

Los controles positivos utilizados en el presente trabajo incluyeron cepas bacterianas de especies comúnmente encontradas en infecciones de diferente tipo, incluyendo infecciones respiratorias agudas, infecciones en enfermedades diarreicas, e infecciones localizadas, como es el caso de artritis séptica.

El ADN de cada uno de los controles fue aislado mediante el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue (Figura 3.1) y llevado a una concentración final de 5ng/μL. Cinco microlitros (25ng) del ADN extraído se añadieron a cada una de las reacciones de amplificación. Para la determinación de este valor se requirió de un ensayo preliminar de variación de concentraciones iniciales de ADN (5ng/μL, 10ng/μL y 20ng/μL), tomando en cuenta el rango establecido para PCR en tiempo real, el mismo que oscila entre 10 a 100ng para 50μL de reacción (Applied Biosystems, 2010).

El sistema de PCR en tiempo real utilizado se basó en un ensayo de amplio espectro propuesto por Yang *et al.*, en el 2008, dirigido a la amplificación de un fragmento de la región hipervariable V6 comprendida en el gen ADNr 16S, la cual es la región más corta y más variable de dicha secuencia y que permite la máxima discriminación para la mayoría de especies bacterianas (Chakravorty *et al.*, 2007).

Para este ensayo, se utilizó un par de cebadores, dirigidos a secuencias conservadas que permiten la amplificación de un fragmento de 161pb, además se utilizó una sonda universal, dos sondas para la clasificación Gram de bacterias, y seis sondas para identificación de patógenos específicos (Tabla 2.1). Las sondas y cebadores fueron diseñados tomando en cuenta las referencias y parámetros necesarios para una amplificación eficiente (Yang *et al.*, 2002).

En el proceso de optimización del sistema de PCR se determinó inicialmente la temperatura de hibridación óptima de los cebadores delantero y

reverso, cuyas temperaturas de melting ( $T_m$ ) calculadas fueron de 54,7 y 56,8°C respectivamente, mediante un ensayo de gradiente de temperatura en PCR convencional. De acuerdo a lo descrito en la bibliografía consultada, la temperatura de hibridación debe encontrarse entre 5 a 10 grados por debajo de la  $T_m$  de los cebadores (Surzycki, 2000); sin embargo, se tomaron en cuenta temperaturas superiores a este rango debido a que se consideraron además las temperaturas de melting de cada una de las sondas que se utilizaron posteriormente en los ensayos de PCR en tiempo real. De esta manera, se determinó la temperatura óptima de hibridación de 60°C.

Un ensayo adicional en PCR convencional permitió determinar que es viable realizar una PCR bifásica, de manera que es posible que tanto el alineamiento de los cebadores así como la extensión de la cadena complementaria ocurran en un mismo paso. Esto puede realizarse cuando se trabaja a temperaturas entre 60 y 70°C (Hyndman & Mitsunashi, 2003).

La optimización de las condiciones del ensayo en PCR en tiempo real comprendió la variación de concentración de cebadores y de sondas, y la variación de concentración de templado inicial, tomando en cuenta las recomendaciones descritas en la literatura, las mismas que se encuentran dentro de los rangos establecidos para ensayos en PCR en tiempo real (Applied Biosystems, 2010).

En el primer caso, se consideraron diferentes combinaciones de concentraciones para el cebador delantero y el cebador reverso (50, 300 y 900nM). La concentración de 900nM (0,9pmol/ $\mu$ L) demostró ser la óptima para ambos cebadores, ya que estos valores permitieron obtener la mayor emisión de fluorescencia en el ensayo.

A continuación, se probaron diferentes concentraciones de sondas (50, 100, 150, 200 y 250nM), siendo 200nM la concentración óptima para el ensayo, al ser esta la mínima cantidad necesaria para obtener un  $C_t$  más temprano.

Finalmente, con el fin de obtener una amplificación eficiente y consistente se determinó la concentración de templado inicial necesaria mediante un ensayo de variación de concentración de ADN inicial como se describió previamente, siendo 5ng/μL la concentración elegida.

El ensayo del sistema de PCR en tiempo real, evaluado en los controles positivos utilizando la sonda UNI, mostró resultados consistentes y reflejó además diferentes valores de *Ct* para cada uno los controles (Anexo E), a pesar de haber partido de la misma concentración de ADN inicial. Esto se puede explicar basándose en el antecedente de que el número de copias del operón ribosómico por genoma bacteriano es considerablemente variable, de 1 a 15 copias por genoma aproximadamente (Rodicio y Mendoza, 2003).

La evaluación de las sondas de discriminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas, OGP y OGN, mostró los resultados esperados para 9 de las 11 especies analizadas. *E. faecium* y *N. gonorrhoeae* mostraron resultados inconsistentes (Figuras 3.3 y 3.4). En el caso de *E. faecium* se observó la detección para ambas sondas simultáneamente, mientras que *N. gonorrhoeae* fue erróneamente clasificada dentro del grupo de Gram positivos. Por esta razón, los cultivos iniciales, a partir de los cuales se realizó la extracción de ADN, fueron nuevamente caracterizados mediante cultivo microbiológico por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín. Los resultados obtenidos por microbiología demostraron la existencia de microorganismos contaminantes en ambos cultivos y la ausencia del microorganismo *N. gonorrhoeae* en el cultivo inicial del mismo.

A pesar de que los cultivos iniciales utilizados como controles positivos para estas dos especies partieron de cepas ATCC® y que fueron tratados de acuerdo a las indicaciones adecuadas de manejo establecidas, se presume que se contaminaron durante el proceso de siembra y/o reactivación de los pellets liofilizados de los cuales provinieron cada uno de los microorganismos.

Se realizó un tercer ensayo de identificación bacteriana mediante la utilización de sondas fluorescentes especie-específicas, con 6 de los 11

controles positivos (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *E. coli* y *N. gonorrhoeae*), los mismos que fueron clasificados en 3 grupos: estafilococos, estreptococos, y bacterias Gram negativas. Los resultados de estos ensayos fueron inconsistentes para dos de las seis bacterias utilizadas: *S. epidermidis* y *N. gonorrhoeae*, las cuales no fueron correctamente identificadas. Se presume la presencia de ADN contaminante en el control de *S. epidermidis*, razón por la cual ambas sondas son detectadas en el ensayo, o puede considerarse también posibles limitaciones en la capacidad de discriminación de la sonda SAU para las dos especies de estafilococos analizadas.. Por otro lado, la ausencia de detección de la sonda NGH utilizada para la identificación de *N. gonorrhoeae* confirma los resultados reportados por el Laboratorio de Bacteriología del HCAM obtenidos a partir de cultivo microbiológico de la cepa inicial utilizada para la extracción de ADN, al indicar que el cultivo no correspondía a este microorganismo.

El límite de detección del ensayo del sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro se determinó mediante la amplificación de diluciones seriadas de ADN y mediante conteo de UFC/mL.

Para determinar la concentración mínima de ADN que el sistema puede detectar, se aplicó la reacción de PCR en tiempo real con los cebadores universales y la sonda de detección UNI a múltiples diluciones seriadas de ADN de *S. aureus* (5 ng/μL – 3,9x10<sup>-3</sup> fg/μL). Los resultados demostraron que el sistema es capaz de detectar una cantidad de ADN de 31,25fg/μL (Figura 3.8), límite de detección que coincide con reportes en otros trabajos para esta técnica, la cual está en el orden de fentogramos. A partir de este valor, con cantidades menores de ADN inicial, la relación entre el *Ct* y la cantidad de templado inicial se vuelve no lineal.

La curva de calibración, graficada a partir de los datos obtenidos de este ensayo, demostró que a partir de la sexta dilución la relación se vuelve no lineal y los valores de *Ct* son similares a los de los controles negativos, por lo que se tomaron en cuenta los valores correspondientes hasta la quinta dilución (Figura 3.9).

Para obtener resultados consistentes y favorecer un proceso de reacción eficiente es necesario tomar en cuenta diferentes parámetros de diseño, los mismos que incluyen el contenido de GC de los cebadores y sondas, el cual debe ser de 30-80%, la  $T_m$  de las sondas, que debe ser aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  mayor a la  $T_m$  de los cebadores, y el tamaño del amplicón o producto de PCR, el mismo que debe estar en un rango de 50 a 150 pb (Applied Biosystems, 2009). En este caso, tanto el contenido de GC y  $T_m$  de los cebadores y sondas utilizados están considerados dentro de los rangos recomendados. En cuanto al tamaño del amplicón, el cual es de 161pb, a pesar de estar fuera del rango óptimo, permitió obtener resultados eficientes, y ya que el estudio no se enfocó en un análisis cuantitativo de las muestras analizadas, no fue necesario tomar en cuenta ninguna corrección matemática para el cálculo de los parámetros de la reacción de amplificación.

De acuerdo a los parámetros recomendados para ensayos en PCR en tiempo real (Bio-Rad Laboratories, 2006), se deben tomar en cuenta diferentes consideraciones para determinar si un ensayo está o no optimizado. En primer lugar, el coeficiente de correlación  $R^2$  obtenido a partir de la curva de calibración debe tener un valor igual o mayor a 0,98. Este valor representa qué tan bien se ajustan los datos a una recta, y al mismo tiempo la linealidad de los datos da una medida de la variabilidad entre las repeticiones de cada una de las muestras utilizadas en los ensayos y permite conocer si la eficiencia de la amplificación es la misma para diferentes cantidades de templado inicial. Se debe considerar además un valor de la eficiencia igual mayor al 90%, el mismo que se calcula a partir de la pendiente de la curva de calibración. Una eficiencia cercana al 100% es un buen indicador de la reproducibilidad y robustez del ensayo. Dentro de este contexto, se puede decir que el sistema de PCR en tiempo real desarrollado en este trabajo es altamente eficiente y reproducible, ya que presenta un valor de  $R^2$  igual a 0,988 y una eficiencia de 98,18%.

En cuanto a la determinación del límite de detección en función del número de UFC/mL, se estableció que la PCR en tiempo real es capaz de detectar de 20 a 55 UFC/mL, para agar manitol y agar sangre, respectivamente (Figura 3.12). Estos resultados son similares a aquellos obtenidos por Yang *et*

al. (2008), en donde se indica una alta sensibilidad analítica del sistema en el orden de  $10^1$  UFC/mL, demostrando que el sistema puede emplearse, bajo estas condiciones de optimización, para la evaluación de muestras clínicas, sometiénolas a una fase previa de enriquecimiento.

Uno de los mayores problemas que presentan los sistemas de PCR de amplio espectro es su susceptibilidad a la contaminación extrínseca e intrínseca (Millar, Xu & Moore, 2002). Por esta razón se incluyeron en todos los ensayos dos controles negativos, uno de la extracción y otro de la PCR, los mismos que permitieron verificar la ausencia de ADN contaminante tanto en el ADN extraído como en los reactivos de PCR, respectivamente.

En los diferentes ensayos preliminares para la optimización del sistema de PCR en tiempo real se observó que los controles negativos no son detectables sino hasta valores superiores a los 35 ciclos, por lo que no se requirió de un método adicional de descontaminación del sistema y se consideró reducir el número de ciclos durante la optimización del mismo. De la misma manera, en la evaluación de los ensayos de los controles positivos así como de las muestras clínicas, los valores de *Ct* de los controles negativos mostraron ausencia de contaminación.

Para la segunda fase de la investigación se probó el sistema optimizado en muestras clínicas. Se procesaron un total de 37 muestras de pacientes con sospecha de infección. Se consiguió la extracción de material genético de todas las muestras, excepto de la muestra 14, la misma que fue reportada como negativa para cultivo microbiológico, por el Laboratorio de Bacteriología del HCAM. A pesar de que la muestra 3 no correspondía a una eubacteria de acuerdo a los resultados de cultivo microbiológico, se consideró la extracción del material genético de la misma debido a que pudo ser utilizada como otro tipo de control negativo durante la fase de amplificación y evaluación del sistema de PCR en tiempo real. Esta muestra correspondía a *Candida tropicalis*, razón por la cual para la extracción de ADN se incorporó lisostafina al coctel lítico en la fase de lisis celular, para permitir la ruptura de la pared celular de esta levadura.



Todas las muestras clínicas presentaron gran diferencia de concentración del material genético aislado (Tabla 3.7); sin embargo, todas ellas se encontraron sobre el límite de detección del sistema de PCR en tiempo real, y sobre el valor de la concentración de ADN inicial con la que fue optimizado el mismo, por lo que pudieron ser evaluadas con el sistema de PCR en tiempo real propuesto.

En el ensayo de detección con la sonda UNI, se logró una amplificación exitosa para todas las muestras, con valores de *Ct* en el rango de 10,72 y 23,85, excepto para las muestras 3 y 14, correspondientes al control negativo de *Candida tropicalis* y la muestra reportada como negativa en el cultivo microbiológico, respectivamente. Estas muestras no fueron consideradas para el ensayo de discriminación de tipo Gram con las sondas OGP y OGN.

Con el segundo ensayo se determinó que 27 de los resultados de las 35 muestras evaluadas concordaron con aquellos reportados por el Laboratorio de Bacteriología del HCAM, mientras que los 8 resultados restantes mostraron la presencia de más de una especie bacteriana (Tabla 3.8). La discrepancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas puede explicarse debido a la presencia de microorganismos contaminantes durante la toma de las muestras, o debido al criterio de discriminación considerado para el análisis y reporte de resultados por parte de Laboratorio de Bacteriología del HCAM.

Durante la toma de las muestras para el diagnóstico de infecciones, ciertos microorganismos, propios de la microbiota normal de los pacientes pueden estar presentes en las muestras; sin embargo, estos son descartados como patógenos causantes de infección, en el reporte de resultados. Por esta razón, muchos de los microorganismos presentes en las muestras son normalmente descartados en el reporte de resultados por cultivo microbiológico, considerando la naturaleza de la muestra y la cantidad de las colonias que se desarrollan en un período de incubación. Sin embargo, al estar presentes en las muestras originales, las mismas que fueron sometidas a una fase de enriquecimiento previa, son detectadas mediante el ensayo de PCR en tiempo real, el cual demostró ser altamente sensible.

Finalmente, debido a la inconsistencia de los resultados obtenidos con los controles positivos para el tercer ensayo de identificación bacteriana para seis especies de microorganismos, no se probó este ensayo en las muestras clínicas. Así, se puede comprobar que el sistema de PCR en tiempo real propuesto muestra 100% de concordancia con los resultados reportados por microbiología en el ensayo de detección bacteriana, pero sólo un 78,37% de concordancia con respecto al ensayo de discriminación de tipo Gram, lo que demuestra que la detección microbiana mediante la amplificación de un fragmento del gen ADNr 16S bacteriano es viable, sin embargo, se pueden presentar dificultades para la interpretación de resultados en el ensayo de discriminación de tipo Gram en casos donde existe la presencia de más de un microorganismo.

Los métodos de diagnóstico molecular, como la PCR en tiempo real, generalmente utilizan sondas fluorescentes que se unen a amplicones de tamaños relativamente cortos, lo que limita el tamaño de la secuencia de ADN que puede ser utilizado para la identificación bacteriana (Chakravorty *et al.*, 2007). A pesar de utilizar como blanco una región corta con alta variabilidad, ideal para la identificación y diferenciación de bacterias, las secuencias entre especies filogenéticamente relacionadas pueden resultar muy similares dificultando el uso de este tipo de ensayos para ciertos casos.

Entre las limitantes más importantes de la PCR en tiempo real se pueden destacar el restringido número de fluoróforos comercialmente disponibles, y la reducida capacidad de detección de los equipos utilizados para este propósito. En la presente investigación se pudo realizar la diferenciación solamente de cuatro fluoróforos distintos en un mismo tubo. Por este motivo, y debido a que el diseño del sistema comprende ensayos de PCR multiplex, para la discriminación del tipo Gram y la identificación de bacterias, se utilizó el algoritmo de referencia presentado en la sección 2.5.3.2. También es importante resaltar que, al utilizar un sistema multisonda se reduce el riesgo de la posible competencia entre los cebadores, ya que este sistema comprende un solo par de cebadores y múltiples sondas dirigidas a diferentes secuencias dentro de una misma región (Yang *et al.*, 2008).

En los casos donde las muestras resultaran positivas para el ensayo de detección bacteriana mediante la sonda UNI, el cultivo microbiológico no debe descartarse para confirmar los resultados y para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Se requiere mayor investigación de estos métodos y técnicas, para su validación clínica y la evaluación de su potencial utilidad en términos de viabilidad, costo-beneficio, y tiempo de entrega de resultados.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la utilidad de un sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro como complemento, mas no como reemplazo, de los métodos tradicionales de diagnóstico de infecciones. Con la metodología propuesta en este estudio, el tiempo para la obtención de resultados se estima en 24 horas, el mismo que resulta más rápido que las técnicas de microbiología tradicional, las cuales pueden requerir un mínimo de 2 a 3 días, en el mejor de los casos. Por esta razón, es importante considerar un trabajo conjunto de los dos tipos de técnicas, de manera que se puedan superar las limitaciones y desventajas presentadas por cada una de ellas.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y optimizó un sistema de amplio espectro basado en la amplificación de un fragmento del gen ADNr 16S mediante PCR en tiempo real, haciendo uso de un diseño multisonda, para la detección molecular de infecciones locales bacterianas.
2. El protocolo optimizado en el presente estudio para la obtención de material genético, a partir de cultivos bacterianos, permitió la obtención de ADN de alta pureza, integridad y calidad, facilitando una amplificación favorable del fragmento del gen ADNr 16S, evaluado en este proyecto.
3. El sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro, optimizado en este estudio, permitió la adecuada amplificación de un fragmento de la región hipervariable V6 del gen ADNr 16S, y la detección rápida de bacterias en muestras biológicas con alta sensibilidad y especificidad clínica, mediante la utilización de un par de cebadores universales y una sonda tipo TaqMan universal.
4. El sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro optimizado, que emplea las sondas OGP y OGN, para la discriminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas, mostró alta eficiencia y consistencia de amplificación; sin embargo, presenta dificultad al evaluar e interpretar resultados en muestras clínicas directamente.

5. El sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro optimizado, que emplea las sondas específicas SAU, SEP, SAG, SPN, ECO y NGH, para la identificación bacteriana, mostró resultados inconsistentes con los controles positivos, razón por la cual este ensayo no fue considerado para la evaluación de muestras clínicas.
6. El límite de detección del ensayo de detección bacteriana, evaluado por el método de diluciones seriadas de ADN mediante el sistema optimizado de PCR en tiempo real de amplio espectro con la sonda UNI fue igual a 31,25fg/ $\mu$ L.
7. El sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro para la detección bacteriana, que empleó la sonda UNI, presentó una alta sensibilidad analítica, en el orden de  $10^1$  UFC/mL, demostrando que el mismo puede emplearse para la evaluación de muestras clínicas.
8. El sistema optimizado de PCR en tiempo real de amplio espectro propuesto es altamente eficiente y reproducible, presentando una eficiencia del 98,18%.
9. Se procesó un total de 37 muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección, de las cuales 35 fueron identificadas como positivas en el ensayo de detección, y 27 de estas últimas mostraron resultados concordantes con aquellos reportados por cultivo microbiológico para el ensayo de discriminación de tipo Gram.

10. Los resultados obtenidos mediante el sistema optimizado de PCR en tiempo real de amplio espectro presentan una concordancia del 100% con las técnicas de microbiología tradicional para la detección de bacterias y una concordancia del 78,37% para la discriminación de tipo Gram en muestras clínicas.
  
11. El empleo de controles negativos en cada una de las etapas de procesamiento de las muestras evidenció la ausencia de contaminación con ADN exógeno, por lo que no se consideró la utilización de un método adicional de descontaminación del sistema.
  
12. El sistema propuesto en este estudio puede ser llevado a cabo en 24 horas, siendo un método rápido a comparación de las técnicas de microbiología tradicional usadas para la detección de infecciones.
  
13. La técnica de PCR en tiempo real de amplio espectro demuestra ser una herramienta válida dentro del diagnóstico molecular de infecciones bacterianas locales, por lo que puede ser considerada como complemento de los métodos tradicionales de diagnóstico, sin embargo, se requiere de mayor investigación para su validación clínica y la evaluación de su potencial utilidad en rutinas de laboratorio.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

1. Debido a que el ensayo de discriminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas dio resultados inconsistentes para *E. faecium* y para *N. gonorrhoeae*, utilizados como controles positivos, se recomienda evaluar nuevamente el ensayo en estas cepas partiendo de cultivos puros procurando un manejo adecuado y minucioso de los mismos, para evitar la posible contaminación de las mismas.
2. Es necesario determinar las razones por las que las sondas de identificación bacteriana SEP y NGH para *S. epidermidis* y *N. gonorrhoeae*, respectivamente, arrojaron resultados inconsistentes.
3. Se recomienda para futuras investigaciones considerar otras especies bacterianas de relevancia clínica.
4. A pesar de que el empleo de controles negativos en los ensayos evidenció que no existe presencia de contaminación, es muy importante tomar todas las medidas necesarias para evitar la presencia de ADN exógeno, siguiendo todas las normas básicas de bioseguridad para el manejo de muestras y reactivos, así como tomar todas las precauciones pertinentes para el trabajo en el laboratorio.
5. Debido a que el sistema optimizado de PCR en tiempo real de amplio espectro propuesto es altamente eficiente, se puede considerar su empleo

para la evaluación de un mayor número de muestras clínicas, de manera que se pueda validar la técnica en un número significativo de pacientes.

6. A pesar de que no se presentaron problemas de inhibición en las reacciones de amplificación, sería oportuno incorporar un control interno para evaluar posibles procesos inhibitorios de la PCR en tiempo real, en especial al analizar muestras clínicas que no hayan sido sometidas a una fase de enriquecimiento previa.
7. Para futuras investigaciones, se recomienda evaluar cuantitativamente al sistema de PCR en tiempo real de amplio espectro propuesto en este estudio, con lo que se esperaría obtener resultados que permitan establecer criterios de evaluación más amplios.
8. Se propone un trabajo conjunto entre los hospitales y la ESPE para facilitar la cooperación activa en futuras investigaciones en el área del diagnóstico molecular de patógenos.



## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Afonina, I.A., Reed, M.W., Lusby, E., Shishkina, I.G. & Belousov, Y.S. (2002). Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered Fluorescence. Biotechniques; 32: 940–949.
2. Albán, C. (2010). Diseño y Optimización de un Sistema de Amplio Espectro para el Diagnóstico Molecular de Artritis Séptica basado en la Amplificación del Gen ADN Ribosomal 16S Íntegro mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Tesis. Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
3. Alcaide, F. (2009). ¿Qué aporta la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis? Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica; 27(9): 493–495.
4. Andrade, O. (2009). Diagnóstico Rápido de Infecciones Quirúrgicas por Biología Molecular mediante un Ensayo de Amplio Espectro PCR 16S rDNA. Escuela Politécnica del Ejército. Tesis. Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
5. Applied Biosystems. (2009). Real-Time PCR Systems. Applied Biosystems Chemistry Guide.
6. Applied Biosystems. (2010). TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol Guide.
7. Arredondo, P. (2006). Cultivo e Identificación de Agentes Infecciosos. Instituto Politécnico Nacional, México. [Disponible en línea], [www.pathmicro.med.sc.edu/spanish/bact-span.htm](http://www.pathmicro.med.sc.edu/spanish/bact-span.htm).

8. Baron, E., Peterson, L. & Finegold, S. (1994). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. USA: Mosby. 9<sup>th</sup> Edition.
9. Bartlett & Stirling. (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. Methods in Molecular Biology, vol. 226: 3-6.
10. Bender, L. (2007). Resúmenes de temas de cirugía, Cátedra de Cirugía II U.H.C No. 4, Hospital San Roque, Universidad Nacional de Córdoba. [Disponible en línea], [www.eco.unc.edu.ar/docentes/bender/index.htm](http://www.eco.unc.edu.ar/docentes/bender/index.htm).
11. Bengtsson, M., Karlsson, J.H., Westman, G. & Kubista, M. (2003). A New Minor Groove Binding Asymmetric Cyanine Reporter Dye for Real-time PCR. Nucleic Acids Research, vol. 31(8), 45.
12. Bio-Rad Laboratories. (2006). Real-Time PCR Applications Guide.
13. Boddinhaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H. & Bottgeri, E. (1990). Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of rRNA, Journal of Clinical Microbiology, p. 1751-1759.
14. Bustin, S.A. (2000). Absolute Quantification of mRNA using Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. Journal of Molecular Endocrinology, vol. 25 (2): 169–193.
15. Clarridge, J. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria. Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical Microbiology Review, 17(4), 840-862.
16. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A Detailed Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Segments for the Diagnosis of Pathogenic Bacteria. Journal of Microbiology, Methods; 69(2): 30–339.
17. Ciminska, G. (2006). Developing Nucleic Acid-based Electrical Detection Systems. BioMed Central Microbial Cell Factories, 5:9.

18. Coleman, W. & Tsongalis, G. (2006). Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian. Humana Press. p. 47-56 y 65-74. ISBN 1-58829-356-4.
19. Corless, C., Guiver, M., Borrow, R., Edwards, V., Kaczmarek, E. & Fox, A. (2000). Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. Journal of Clinical Microbiology, vol. 38, N° 5: 1747–1752.
20. 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, vol. 42(10): 4859-4862.
21. Elenitoba, K., Bohling, S., Wittwer, C. & King, T. (2001). Multiplex PCR by Multicolor Fluorimetry and Fluorescence Melting Curve Analysis. Nature Medical, vol. 7: 249–253.
22. Farías, E., Medina, R. & Chavarría, J. (2005). Neumonía Nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa*. Medicina Interna de México, vol 21, N° 5: 368-379.
23. Fenollar, F., Roux, V., Stein, A., Drancourt, M. & Raoult, D. (2006). Analysis of 525 Samples to Determine the Usefulness of PCR Amplification and Sequencing of the 16S rRNA Gene for Diagnosis of Bone and Joint Infections. Journal of Clinical Microbiology, vol. 44(3): 1018-1028.
24. Harris, K. A. & Hartley, J. C. (2003). Development of Broad-range 16S rDNA PCR for Use in the Routine Diagnostic Clinical Microbiology Service. Journal of Medical Microbiology, vol 52: 685–691.
25. Hendolin, P., Paulin, L. & Ylikoski, J. (2000). Clinically Applicable Multiplex PCR for Four Middle Ear Pathogens. Journal of Clinical Microbiology, vol. 38: 125-132.

26. Hyndman, D. & Mitsuhashi, M. (2003). PCR Primer Design. En J. Bartlett & D. Stirling (Eds.), Methods in Molecular Biology, vol. 226; PCR Protocols. Totawa, NJ: Human Press Inc. 2da Edición. 81-88.
27. Invitrogen. (2010). Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit.
28. Janda, J. M. & Abbott, S. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. Journal of Clinical Microbiology, vol. 45, N° 9: 2761–2764.
29. Kwok, S. & Higuchi, R. (1989). Avoiding False Positives with PCR. Nature, vol. 339: 237-238.
30. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, M., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. & Zoric, N. (2006). The Real-time Polymerase Chain Reaction. Molecular Aspects of Medicine, vol. 27: 95–125.
31. Lee, L.G., Connell, C.R. & Bloch, W. (1993). Allelic Discrimination by Nick-Translation PCR with Fluorogenic Probes. Nucleic Acids Research, vol. 21: 3761–3766.
32. Lejona, S., Benetti, M. S., Fay, F., Fay, O. (2006). Avances en el Diagnóstico Molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. Anuario Fundación Dr. J.R. Villavicencio, N° XIV, 033–037.
33. Liu, Y., Han, J., Huang, H. & Zhu, B. (2005). Development and Evaluation of 16S rDNA Microarray for Detecting Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid. Experimental Biology and Medicine, N° 230: 587-591.
34. Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the Microbiology Laboratory. Clinical Microbiology Infections 2004, vol. 10: 190–212.

35. Rodicio, M., y Mendoza, M. (2003). Identificación Bacteriana Mediante Secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, Metodología y Aplicaciones en Microbiología Clínica. Enfermedades Infecciosas, Microbiología Clínica, 22 (4): 238-45.
36. Millar, B. C., Xu, J. & Moore, J. (2002). Risk Assessment Models and Contamination Management: Implications for Broad-range Ribosomal DNA PCR as a Diagnostic Tool in Medical Microbiology. Journal Clinical Microbiology, 40: 1575–1580.
37. Miller, K. (2004). Biología. Massachusetts: Prentice Hall. pp. 480. ISBN 0-13-115538-5.
38. Niederhauser, C., Hofelein, C., Wegmiuller, B., Liuthy, J. & Candrian, U. (1994). Reliability of PCR Decontamination Systems, PCR Methods. Appl. 4: 117-123.
39. Olson, A. B., Sibley, C. D., Schmidt, L., Wilcox, M. A., Surette, M. G., & Corbett, C. R. (2010). Development of Real-Time PCR Assays for Detection of the *Streptococcus milleri* Group from Cystic Fibrosis Clinical Specimens by Targeting the cpn60 and 16S rRNA Genes. Journal of Clinical Microbiology, vol. 48, N° 4: 1150–1160.
40. Organización Mundial de la Salud. Estadísticas Sanitarias Mundiales 2011. ISBN 978 92 4 356419 7.
41. Organización Panamericana de la Salud - OPS, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Informe del Ministerio de Salud Pública del Ecuador: Indicadores básicos de Salud, Ecuador 2008. [En línea], <http://new.paho.org/ecu/>

42. Petti, C. (2007). Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. Medical Microbiology, 1108, 7: 44.
43. QIAGEN. (2008). DNeasy Blood & Tissue Kit Handbook.
44. 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.
45. Reinhardt, A., Kihler, T., Wood, P., Rohner, P., Dumas, J., Ricou, B. & Van Delden, C. (2007). Development and Persistence of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a Longitudinal Observation in Mechanically Ventilated Patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 51, N° 4: 1341-1350.
46. Sambrook, J. & Russel, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, New York: CSHL PRESS.
47. Scott, L., Butler, M., Hansen & Frederic D. (2007). A Quantitative Assay for HIV DNA Integration *in vivo*. Nature Medicine (7): 631-634.
48. Sekiguchi, J., Asagi, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kasai, A., Mizuguchi, Y., Araake, M., Fujino, T., Kikuchi, H., Sasaki, S., Watari, H., Kojima, T., Miki, H., Kanemitsu, K., Kunishima, H., Kikuchi, Y., Kaku, M., Yoshikura, H., Kuratsuji, T. & Kirikae, T. (2007). Outbreaks of Multidrug – Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Community Hospitals in Japan. Journal of Clinical Microbiology, vol. 45, N° 3: 979-989.
49. Surzycki, S. (2000). Basic Techniques in Molecular Biology. Berlin: Springer-Verlag.
50. Treguerres, J., Martínez, V. y Navas, V. (2003). Biotechnología Aplicada a la Medicina. Madrid: Editorial Díaz de Santos.

51. Tyagi, S., Marras, S. & Kramer, F. (2000). Wavelength-shifting Molecular Beacons. Nat Biotechnology; 18: 1191–1196.
52. Yang, S., Lin, S., Kelen, G., Quinn, T., Dick, J., Gaydos, C. & Rothman, R. (2002). Quantitative Multiprobe PCR Assay for Simultaneous Detection and Identification to Species Level of Bacterial Pathogens. Journal of Clinical Microbiology, vol. 40, N° 9: 3449–3454.
53. Yang, S., Ramachandran, P., Hardick, A., Hsieh, Y., Quianzon, C. & Kuroki, M. (2008). Rapid PCR-Based Diagnosis of Septic Arthritis by Early Gram-Type Classification and Pathogen Identification. Journal of Clinical Microbiology, 46(4): 1386-1390.
54. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA Intercalation and Surface Binding by SYBR Green I, its Structure Determination and Methodological Implications. Nucleic Acids Research, 32 (12), 103.