

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE INFECCIÓN QUIRÚRGICA
POR BIOLOGÍA MOLECULAR MEDIANTE UN ENSAYO
DE AMPLIO ESPECTRO PCR 16S rDNA”

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ODERAY DEL CARMEN ANDRADE ELJURI

SANGOLQUÍ, 10 de septiembre de 2009

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Srta. Oderay del Carmen Andrade Eljuri

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vinicio Zabala

Sangolquí, 10 de septiembre de 2009

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ODERAY DEL CARMEN ANDRADE ELJURI como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

10 de septiembre de 2009

Fecha

Dr. Marcelo Grijalva, M.D., Ph. D.

Dra. Patricia Jiménez

DEDICATORIA

“Si el presente es de lucha, el futuro es nuestro.”

Che Guevara.

A Dios, por brindarme el don de una vida libre para pensar, cuestionar y decidir.

A mis queridos padres, Marcelo y Oderay, por el ejemplo de vida y el apoyo que se refleja en las palabras de amor y cariño, las cuales diariamente me recuerdan el lazo irrompible que une a nuestra familia.

A mi abuelita Pola[†], por todas sus enseñanzas que llevare en mi mente y corazón por siempre.

A mi esposo Matias, por ser mi Tú, mi Ser, mi Víspera y mi Te-amó.

Oderay Andrade Eljuri

AGRADECIMIENTO

A mi director de tesis, Dr. Marcelo Grijalva, por ser el mentor de este trabajo de investigación, pero sobre todo por guiarme durante este camino e inspirar en mi gratitud y admiración.

A mi codirectora, Dra. Patricia Jiménez, por asesorarme y brindarme su ayuda oportuna en todo momento.

Al Hospital de Niños Baca Ortiz, en especial a la Dra. Yolanda Gálvez, gracias a la cual se pudo culminar este trabajo satisfactoriamente.

A todas mis amigas del laboratorio, en especial a Paola, Andrea y Cristina, por brindarme su valiosa amistad y por haber estado presentes con sus conocimientos, consejos y ánimos durante todo este tiempo.

A mis familiares y amigos, en especial mi hermano Marcelo, mi querida tía Betty, y mi mejor amiga Diana, por dejarme ser parte de sus vidas y estar conmigo incondicionalmente.

A todas aquellas personas, que de una u otra manera contribuyeron con mi formación tanto espiritual como profesional. Infinitas gracias por ayudarme a ser una persona mejor cada día.

Oderay Andrade Eljuri

INDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE CUADROS	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.....	3
1.4.1 Infecciones nosocomiales.....	3
1.4.2 Infecciones quirúrgicas (IQ) o de sitio operatorio (ISO)	4
1.4.3 Métodos convencionales para el diagnóstico de IQ.....	7
1.4.4 Métodos moleculares para el diagnóstico de IQ	9
1.4.5 PCR Universal o de amplio espectro	14
1.4.6 Contaminación en la PCR Universal de amplio espectro 16S rDNA18	
1.4.7 Descontaminación de la PCR 16S rDNA	19
1.4.8 Sistema de Hipótesis o Pregunta de Investigación	22
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 Participantes.....	23
2.2 Zona de Estudio	23
2.3 Período de tiempo de Investigación	23
2.4 Diseño	23
2.5 Procedimientos.....	24

2.5.1	Obtención de controles positivos.....	24
2.5.2	Extracción de ADN genómico bacteriano	24
2.5.3	Método de cuantificación por fluorometría.....	26
2.5.4	Electroforesis horizontal en geles de agarosa	27
2.5.5	PCR 16S rDNA.....	28
2.5.6	Descontaminación mediante 8- methoxypsoralen.....	29
2.5.7	Métodos para determinación de la sensibilidad analítica	30
2.5.8	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción	33
2.6	Análisis de datos	34
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		36
3.1	Obtención de controles positivos.....	36
3.2	Pruebas preliminares PCR 16s rDNA.....	37
3.3	Pruebas preliminares RFLP	38
3.4	Optimización de la PCR 16S rDNA	39
3.5	Descontaminación de la PCR.....	40
3.5.1	Optimización del tiempo de exposición UV	40
3.5.2	Evaluación del efecto del tratamiento 8-MOP+ UV sobre el ADN contaminante	43
3.6	Determinación de la sensibilidad analítica.....	44
3.6.1	Sensibilidad analítica medida en UFC/mL para Gram negativas ..	44
3.6.2	Sensibilidad analítica medida en UFC/mL para bacterias Gram positivas	46
3.6.3	Sensibilidad analítica por concentración de ADN para bacterias Gram negativas.....	47
3.6.4	Sensibilidad analítica por concentración de ADN para bacterias tipo Gram positivas	48
3.7	Descontaminación de enzimas líticas	50
3.8	Pruebas del sistema PCR 16S rDNA - RFLPs optimizado	50
3.9	Procesamiento de muestras clínicas provenientes del Hospital de Niños Baca Ortiz.....	52
3.9.1	Muestras clínicas.....	52
3.9.2	Extracción de ADN y cuantificación de muestras clínicas	53
3.9.3	PCR 16S rDNA de las muestras clínicas	54
3.9.4	Análisis de RFLPs de las muestras clínicas	56

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	60
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	71
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	74
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	81

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Especificación de los primers utilizados para la amplificación de un fragmento de 467 pb del gen 16S rDNA.	28
---	----

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Principales bacterias causantes de infecciones quirúrgicas.....	6
Cuadro 2.1 Preparación del Master Mix necesario para la PCR 16S rDNA	28
Cuadro 2.2. Condiciones para la amplificación del gen 16S rDNA	29
Cuadro 2.3 Protocolo para la digestión con enzimas de restricción.....	33
Cuadro 2.4. Enzimas de restricción para identificación bacteriana.....	34
Cuadro 3.1 Cuantificación por fluorimetría de ADN genómico bacteriano	36
Cuadro 3.2 Cálculo de UFC/ml a partir del recuento de colonias de <i>E.coli</i>	44
Cuadro 3.2 Cálculo de la UFC/ml a partir del recuento de colonias de <i>S. aureus</i>	46
Cuadro 3.3 Cuantificación de ADN de las diluciones seriadas de <i>E.coli</i>	47
Cuadro 3.4 Cuantificación de ADN de las diluciones seriadas de <i>S.aureus</i>	48
Cuadro 3.5 Datos correspondientes a las muestras clínicas	52
Cuadro 3.6 Cuantificación de ADN de las muestras clínicas por fluorimetría .	54
Cuadro 3.7 Resultados del diagnóstico molecular mediante PCR-RFLPs de muestras con sospecha de infección quirúrgica vs. el resultado microbiológico	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Reacción en cadena de la polimerasa	12
Figura 1.2. Operón ribosómico rrn	16
Figura 1.3. Representación esquemática del gen ARN ribosomal 16S.....	17
Figura 1.4 (A). Estructura del 8-methoxypsoraleno. (B). Espectro de absorción del 8-MOP	20
Figura 1.5. Esquema de la interacción ADN-psoraleno	21
Figura 2.1 Esquema del procedimiento para el conteo en placa de UFC/ml ...	31
Figura 2.2 Conteo y cálculo de UFCs	32
Figura 2.3 Diluciones seriadas de una muestra de ADN de concentración conocida.....	33
Figura 3.1 Purificación de ADN genómico bacteriano de cepas puras mediante QiAamp DNA MiniKit de Qiagen® a partir de suspensiones bacterianas	36
Figura 3.2 Primera prueba preliminar de la PCR 16S rDNA	37
Figura 3.3. Segunda prueba preliminar de la PCR 16S rDNA	37
Figura 3.4 Ensayo preliminar de RFLP	38
Figura 3.5 Ensayo de gradiente de temperatura	39
Figura 3.6 Ensayo con adyuvantes	39
Figura 3.7 Amplificación de controles positivos con las condiciones para la PCR 16S rDNA optimizadas	40
Figura 3.8 Efecto del tratamiento de UV a 256nm a diferentes tiempos de exposición para bacterias Gram negativas	41
Figura 3.9 Efecto del tratamiento de UV (256nm) a diferentes tiempos de exposición para bacterias Gram positivas.....	42
Figura 3.10 Determinación de la cantidad de ADN contaminante eliminado con 8-MOP + UV 3 min.....	43
Figura 3.11 Determinación de la cantidad de ADN contaminante eliminado solo con UV 3 min.....	43
Figura 3.12 Recuento en placa de UFC para Gram negativas	44
Figura 3.13 Sensibilidad analítica medida en UFC/mL del sistema sin tratamiento de 8-MOP para Gram negativas	45
Figura 3.14 Efecto del tratamiento combinado 8-MOP + UV 3 min en la sensibilidad analítica del sistema medido en UFC/ml para Gram negativas. ...	45

Figura 3.15. Recuento en placa de UFC para bacterias Gram positivas	46
Figura 3.16 Efecto del tratamiento combinado 8-MOP + UV 3 min en la sensibilidad analítica del sistema medido en UFC/ml para Gram positivas.	46
Figura 3.17 Sensibilidad analítica por concentración de ADN para bacterias Gram negativas.....	47
Figura 3.18 Efecto del tratamiento solo con UV 3 min en la sensibilidad analítica medida en concentración de ADN para bacterias Gram negativas.....	48
Figura 3.19 Sensibilidad analítica medida en concentración de ADN para bacterias Gram positivas.....	49
Figura 3.20 Descontaminación enzimas líticas.	50
Figura 3.21 Extracción de ADN genómico bacteriano con enzimas líticas tratadas con 8-MOP+ UV 30min.	51
Figura 3.22 PCR descontaminada con 8-MOP + UV 3 min de ADN bacteriano extraído con enzimas líticas tratadas.	51
Figura 3.23 Ensayo RFLPs optimizado.....	51
Figura 3.24 Extracción de ADN genómico a partir de muestras clínicas.....	53
Figura 3.25 Aplicación clínica del sistema PCR 16S rDNA.....	55
Figura 3.26 RFLPs a partir del producto de PCR de las muestras clínicas.....	57

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Medios de cultivo bacteriano	76
Anexo B. Protocolo para el aislamiento de ADN genómico bacteriano mediante QiAamp DNA Mini Kit de Qiagen®	77
Anexo C. Cuantificación de la concentración de ADN por fluorimetría mediante el Kit quant iT dsDNA de Invitrogen	78
Anexo D. Formulario para recepción de muestras clínicas	79
Anexo E. Hoja para reporte de resultados	80

NOMENCLATURA

[c]	: Concentración
16S rDNA	: ADN ribosomal 16S
8-MOP	: 8-methoxypsoraleno
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
BrEt	: Bromuro de Etidio
BSA	: Suero de Albúmina Bovina
dNTPs	: Dinucleótidos trifosfatados
IN	: Infección nosocomial
IQ	: Infección quirúrgica
ISO	: Infección de sitio operatorio
Kb	: Kilobase
Nf	: Primer forward para la PCR 16S rDNA
Nr	: Primer reverse para la PCR 16S rDNA
nm	: Nanómetros
pb	: Pares de bases
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
RFLPs	: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rpm	: Revoluciones por minuto
UFC	: Unidad formadora de colonia
UV	: Luz Ultravioleta

RESUMEN

Se desarrolló un sistema de diagnóstico molecular basado en las técnicas de PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) y RFLP, (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) el cual permite una rápida detección e identificación de patógenos bacterianos presentes en muestras clínicas con sospecha de infección quirúrgica.

El ensayo de PCR amplifica un fragmento de 467 pb mediante un par de primers universales, los cuales hibridan en una región conservada del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. El producto de PCR es analizado mediante un ensayo RFLP utilizando las enzimas de restricción *AccIII*, *Csp451*, *KpnI* y *HaeIII*, que producen diferentes patrones de digestión para distintos grupos y géneros bacterianos.

El principal inconveniente del sistema es la generación de resultados falsos positivos debido a la amplificación de ADN contaminante presente en los reactivos utilizados en el ensayo y sintetizados a partir de fuentes bacterianas. Para descontaminar la PCR se evaluó un tratamiento con 8-MOP (8-methoxypsoralen, 25ug/mL) fotoactivado con luz UVC a 256nm. Se determinó que el tiempo de irradiación necesario para que el psoralen sea efectivo es de 3 minutos.

La sensibilidad analítica del sistema expuesto al tratamiento disminuyó 10 veces en comparación con el sistema sin 8-MOP., siendo el límite de detección de la PCR descontaminada 100 UFC/ml.

Para determinar la utilidad del ensayo, se procesaron 17 muestras clínicas recolectadas de pacientes con sospecha de infección quirúrgica. De ellas, siete se compararon con los respectivos resultados microbiológicos, manifestando una concordancia entre las técnicas del 86% para la PCR y 14% para RFLP. Los resultados sugieren que el ensayo es útil en la detección de infecciones quirúrgicas pero puede presentar limitaciones en la identificación del género bacteriano.

ABSTRACT

A PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) assay was developed for the accurate detection and identification of bacterial pathogens in clinical samples from suspected surgical infection. The PCR amplifies a fragment of 467bp with a set of universal primers which targets a conserved region of the gene coding for the 16S rDNA. The amplicons were digested with the enzymes *AccIII*, *Csp451*, *KpnI* and *HaeIII* generating different restriction patterns for bacterial groups or genera.

Nevertheless, the implementation of the assay is hindered by problems of DNA bacterial contamination that arise from reagents purified from bacterial sources. This is a well-known cause of false-positive results.

In an attempt to overcome this problem, we tested the effect of combined 8-methoxypsoralen-UVC light treatment on our broad range PCR. Elimination of contaminating DNA was possible by treatment with 8-MOP at a concentration of 25ug/mL followed by irradiation with UV at 256nm for 3 minutes.

However, the analytical sensitivity of the decontaminated PCR was found to be approximately 100 UFC/mL, which resulted in a 10-fold reduction compared to the decontaminated assay.

To determine the usefulness of the procedure, the universal PCR assay was tested on seventeen clinical samples from patients with suspected surgical infection. Obtained results were then compared to those obtained by culture-based methods. We observed a correlation of 86% for the universal PCR and a correlation of 14% for the RFLPs technique. The present diagnostic approach suggests that the developed assay could be helpful in the detection of surgical bacterial infections, but presents a significant limitation in the efficient identification of bacterial genera.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

En los últimos años, la aplicación de técnicas basadas en biología molecular ha surgido como alternativa de ayuda para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Entre estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada por ser considerado un método sencillo, rápido y eficaz.

La mayoría de ensayos de PCR desarrollados para este fin, son diseñados específicamente para permitir la amplificación de un solo tipo de ADN microbiano. Sin embargo, para el diagnóstico de infecciones quirúrgicas, se hace necesario el diseño de un ensayo de amplio espectro que permita la detección de varios patógenos bacterianos, potenciales agentes etiológicos de infecciones quirúrgicas.

Con este propósito, la amplificación de un blanco genético como el gen 16S rDNA se convierte en la técnica de elección al ser un componente común para todas las eubacterias y altamente conservado en el genoma de ellas. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, su aplicación no es del todo reproducible debido a problemas de contaminación del sistema que pueden dar lugar a resultados falsos positivos.

La presente tesis propone el diseño de un sistema de detección e identificación bacteriana basado en la amplificación del gen 16S rDNA a partir de ADN genómico bacteriano mediante PCR y RFLPs. El ensayo será modificado químicamente para eliminar cualquier problema de contaminación y su funcionamiento será evaluado aplicándolo a muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección quirúrgica, provenientes de un hospital pediátrico de referencia de la ciudad de Quito-Ecuador.

1.2 Justificación del problema

En la actualidad, los sistemas de salud tanto públicos como privados enfrentan el reto de alcanzar un correcto manejo de infecciones nosocomiales, en especial con aquellas denominadas infecciones quirúrgicas o de sitio operatorio. Según estadísticas de la OMS, el 8,7% de los pacientes de un hospital presentan infecciones nosocomiales y de éstas el 25% constituyen infecciones quirúrgicas.

Cuando se presenta una infección quirúrgica es importante identificar de forma rápida y precisa al agente causal. Esto facilita el diagnóstico médico permite la provisión de un tratamiento efectivo y oportuno al paciente.

Sin embargo esto no siempre es posible. Por lo general, en los laboratorios clínicos se utilizan técnicas microbiológicas cuya principal limitación es el tiempo requerido para la generación de resultados. Estas técnicas son dependientes del cultivo bacteriano, por lo que la identificación puede tardar días o incluso semanas. Además pueden complicarse cuando se enfrenta a microorganismos de lento crecimiento o que han generado resistencia antibiótica.

En estas circunstancias, el desarrollo de técnicas innovadoras como aquellas basadas en la Biología Molecular, pueden contribuir a una disminución de las tasas de morbi-mortalidad, ya que permiten una rápida, sensible y específica detección e identificación bacteriana a partir del análisis de los ácidos nucleicos. Entre estas técnicas, la amplificación del gen 16S rDNA mediante PCR, supone un importante avance en el área del diagnóstico molecular.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Detectar e identificar patógenos en muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección quirúrgica en un hospital pediátrico de Quito, mediante la aplicación de un ensayo molecular basado en PCR de amplio espectro y RFLPs.

1.3.2 Objetivos específicos

- Diseñar y optimizar un sistema de detección molecular de amplio espectro de bacterias basado en PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa).
- Descontaminar el sistema de detección mediante métodos químicos y ensayos de sensibilidad analítica.
- Implementar un sistema de referencia para entrega de resultados a los pacientes del Hospital.
- Informar y educar a la comunidad médica en relación a técnicas de diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas por Biología Molecular.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Infecciones nosocomiales

1.4.1.1 Generalidades

Las infecciones se definen como procesos dinámicos que involucran la invasión del cuerpo por microorganismos patógenos y la reacción que estos y sus toxinas provocan en el organismo (Arias, 2001).

Si estas infecciones son contraídas por un paciente como consecuencia de su estancia en un centro hospitalario se las conoce como infecciones nosocomiales (IN) (Romero, 2004).

En la actualidad, las infecciones nosocomiales representan un grave problema de salud pública debido a su alta prevalencia. Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (2003), el 8,7% de pacientes que ingresan a un hospital contraen una infección nosocomial.

En estas condiciones, dichas infecciones no solo provocan un aumento considerable en la morbilidad y mortalidad, sino que representan un mayor gasto tanto para el paciente como para las instituciones de salud debido a que prolongan la estancia postoperatoria (OMS, 2003).

Las infecciones nosocomiales más frecuentes son las de heridas quirúrgicas, vías urinarias y vías respiratorias inferiores. Entre éstas, las infecciones quirúrgicas constituyen el 25% del total (Fajardo, Gordillo & Schmalbach, 2005).

1.4.2 Infecciones quirúrgicas (IQ) o de sitio operatorio (ISO)

1.4.2.1 Generalidades

Las infecciones de sitio operatorio se definen como aquellas que aparecen como complicación de una intervención quirúrgica (Gonzales, 2004). Es uno de los problemas más comunes durante la práctica clínica y se ha convertido en un parámetro universalmente aceptado para medir la calidad de un servicio quirúrgico (Anderson, Haliberto, Morán, Moreno y Vera, 2008). Por esta razón, en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de su etiología y clasificación.

1.4.2.2 Etiología

Los factores que influyen en la manifestación de las infecciones quirúrgicas son: el agente microbiano, la vulnerabilidad del huésped y el procedimiento quirúrgico.

1.4.2.2.1 *Agente microbiano*

Según Arias (2001), cualquier microorganismo puede ser causante de infección dentro de un hospital, aunque algunos de ellos se asocian preferentemente con las infecciones quirúrgicas (Cuadro 1.1). Esto varía según el tipo y el sitio de la intervención además de ciertas características del germen como resistencia a antimicrobianos, virulencia y cantidad de inóculo (OMS, 2003).

La gran mayoría de microorganismos son parte de la flora natural del paciente en especial de la flora cutánea, de las mucosas del tracto digestivo, y del sistema genitourinario (Guirao, Alonso y Arias, 2006). Estos microorganismos oportunistas carecen relativamente de riesgo para las personas sanas, pero que si son transmitidas durante un procedimiento quirúrgico, pueden ser de alta patogenicidad (Bender, 2007)

Hasta hace algunos años las infecciones quirúrgicas eran producidas en su mayoría por bacterias Gram positivas (Alemán y Guanche, 2004). Sin embargo en la actualidad también se han reportado otros agentes infecciosos como bacterias Gram negativas, hongos y virus. Entre éstos los más reportados son *S. aureus* (20%), *E. coli* (12%), enterococo (12%) y otras bacterias entéricas Gram negativas (15%) (Anderson *et.al*, 2008).

1.4.2.2.2 *Huésped*

Los pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos por lo general ven alterada su función inmune, lo que aumenta su vulnerabilidad frente a microorganismos patógenos u oportunistas. Conjuntamente, se consideran factores de riesgo a la edad, hábitos de fumar, desnutrición, obesidad y enfermedades crónicas. Además, los pacientes quirúrgicos son mayormente sometidos a intervenciones y métodos de diagnóstico invasivos lo que aumenta la posibilidad de contraer una infección (Anderson *et.al*, 2008).

1.4.2.2.3 Procedimiento Quirúrgico

Son factores relacionados con la operación que incluyen la duración del procedimiento, técnica quirúrgica, antibióticos profilácticos, técnica utilizada para antisepsia de la piel, presencia de cuerpos extraños y tiempo de estancia postoperatoria (Anderson et.al, 2008).

La infección suele contraerse durante la propia operación, ya sea en forma exógena (es decir del aire, el equipo médico, los cirujanos y otro personal médico), endógena (de la flora de la piel o del sitio de la operación) o, en raras ocasiones, o derivados de sangre empleados en la intervención quirúrgica (OMS, 2003).

Cuadro 1.1 Principales bacterias causantes de infecciones quirúrgicas.

	Bacterias Aerobias y Facultativas	Bacterias Anaerobias
Cocos Gram Negativos	“Neisserias” <i>Neisseria: N.gonorrhoeae, N. catarrhalis, N. meningitidis</i>	“Neisserias anaerobias” <i>Veillonella: V. parvula</i>
Cocos Gram Positivos	“Estreptococos” <i>Streptococcus: S.pneumoniae, S. pyogenes, S. viridans</i> “Enterococos” <i>Enterococcus: E.faecalis, E.faecium</i> “Estafilococos” <i>Staphylococcus: S. aureus, S. epidermidis,</i>	“Estreptococos anaerobios” <i>Peptostreptococcus sp.</i> <i>Peptococcus sp.</i>
Bacilos Gram Negativos	“Enterobacterias” <i>Enterobacteriaceae: Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Proteus sp., Salmonella, Shigella</i> “No Fermentadores” <i>Pseudomona aeruginosa</i> “ Haemophilus” <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Haemophilus ducreyi</i>	“Bacteroides” <i>Bacteroides fragilis</i>
Bacilos Gram Positivos	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	“Clostridios” <i>Clostridium: C.tetani, C.difficile, C. perfringens</i>

Fuente: Arias, 2001

1.4.2.2.4 Clasificación de las infecciones quirúrgicas

Las infecciones quirúrgicas por lo general se identifican por cualquier secreción purulenta o absceso alrededor de una herida quirúrgica que presente signos de inflamación del tejido en el mes siguiente a la operación (Nandi, Raja, Mak, Chan & So, 1999). Sin embargo, con la finalidad de clasificarlas, se agrupó a estas infecciones según el sitio anatómico en (Nandi *et.al*, 1999):

- a) *Infección superficial de la incisión*: cuando el proceso infeccioso sólo comprende la piel y tejido celular subcutáneo.
- b) *Infección profunda de la incisión*: cuando abarca capas más profundas como las fascias y los músculos.
- c) *Infección órgano espacio*: cuando afecta cualquier parte de la anatomía abierta o manipulada durante el procedimiento operatorio.

1.4.3 Métodos convencionales para el diagnóstico de IQ

El diagnóstico de infecciones quirúrgicas es, en general, un diagnóstico clínico y no microbiológico. Sin embargo la combinación de ambas se ha convertido en el método de referencia o “gold standard” (Burillo, Moreno y Salas, 2006).

El diagnóstico clínico incluye un estudio de los antecedentes del paciente, además del análisis del cuadro clínico mediante un examen físico. Generalmente, cualquier secreción purulenta, absceso o celulitis difusa en el sitio de la intervención quirúrgica acompañado de fiebre, dolor e inflamación es indicativo de infección quirúrgica (Adrianzén, 1999).

El diagnóstico microbiológico se practica para los casos en los que se precisa conocer la etiología de la infección, bien porque sean de particular gravedad, se sospeche la presencia de microorganismos menos frecuentes, exista mala respuesta a tratamientos antimicrobianos previos, o porque son heridas que no cicatrizan dentro de un periodo de tiempo razonable (Burillo *et al.*, 2006).

En estos casos, el diagnóstico consiste en identificar la presencia del microorganismo causante de la infección mediante un análisis fenotípico de las características del mismo. Esto se logra mediante técnicas como el cultivo bacteriano en medios selectivos a partir de muestras clínicas, seguido de la identificación por medio de pruebas bioquímicas y pruebas de sensibilidad y resistencia a antibióticos.

1.4.3.1 Ventajas y desventajas de los métodos convencionales

Ventajas

- Se encuentran implementados y validados en todos los laboratorios clínicos.
- Los cultivos permiten precisar el predominio del tipo de flora presente (Treguerres, Martínez y Navas, 2003).
- Se puede distinguir si la infección es mono o polimicrobiana (Treguerres *et.al*, 2003).
- Permite determinar la susceptibilidad de los microorganismos a una amplia gama de antibióticos (García, 2006).

Desventajas

- Los resultados pueden demorar más de 48h e incluso varias semanas.
- Requerimientos específicos en cuanto a medios de cultivo y tiempos de incubación
- Para microorganismos fastidiosos o de lento crecimiento, la identificación necesita mucho tiempo, resulta difícil o incluso, imposible (Mendoza et al., 2003).
- En pacientes con tratamiento antimicrobiano previo, puede resultar negativo (Arredondo, P, 2006).

1.4.4 Métodos moleculares para el diagnóstico de IQ

Las técnicas moleculares en el diagnóstico clínico de las infecciones quirúrgicas se basan en el análisis genotípico del agente infeccioso. Consiste en la extracción de ADN del microorganismo y su posterior análisis mediante técnicas de amplificación e identificación molecular. Para la amplificación del ADN en estudio la técnica más utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mientras para la identificación bacteriana se puede aplicar el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) o la secuenciación automática.

1.4.4.1 Extracción de ADN bacteriano

El aislamiento y purificación del ADN es el primer paso para cualquier análisis molecular. El propósito de la extracción es el separar el ADN de todos los componentes celulares como son proteínas, RNA, lípidos, iones inorgánicos, aminoácidos entre otros, sin afectar física ni químicamente al ADN (Surzycki, 2000).

Con ello se busca la obtención de un ADN de alto peso molecular de buena calidad, es decir íntegro, puro y concentrado que sirva para la PCR y otros análisis posteriores. Existen diferentes metodologías que permiten alcanzar estos resultados. Incluso están a la disposición kits comerciales que facilitan la extracción. Cualquiera sea el método utilizado, existen cuatro pasos fundamentales que son:

- a) **Rompimiento celular:** Es uno de los pasos más importantes en el aislamiento. Se utiliza una buffer de lisis que permite mantener la estructura del ADN, produce la lisis celular, la denaturación proteica, la inhibición de DNAsas y prevención de modificaciones químicas. La lisis celular se logra mediante el uso de detergentes químicos que solubilicen los lípidos de las membranas. Sin embargo en el caso de bacterias es importante la aplicación adicional de enzimas líticas

(lisozima, lisostafina, liticasa) que degraden la pared celular bacteriana y expongan la membrana al tratamiento químico (Surzycki, 2000).

- b) Remoción de proteínas y RNA: Existen varias formas de remoción de proteínas. Una de las más comunes se basa en diferencias de solubilidad entre el ADN y las proteínas para lo cual se utiliza solventes orgánicos como fenol, cloroformo, alcohol isoamílico. También se puede utilizar detergentes como CTAB que inducen a la formación de complejos insolubles. La remoción enzimática mediante proteasa y proteinasa K es otra opción frecuente ya que éstas digieren proteínas (Surzycki, 2000).
- c) Concentración del ADN: Este paso tiene dos propósitos, separar el ADN de alto peso molecular de las soluciones desproteinizadas y remover otras impurezas de bajo peso molecular. Para ello se precipita el ADN con alcoholes como etanol e isopropanol. Finalmente se resuspende el ADN en una buffer a pH apropiado que permita el almacenamiento a temperaturas de congelación sin dar lugar a una posible degradación (Surzycki, 2000).
- d) Determinación de la concentración y pureza: Estos parámetros se miden mediante espectrofotometría UV. Se mide la absorbancia a 260nm y 280nm. La concentración se calcula mediante la relación entre la absorbancia de 260nm y el coeficiente de extinción del ADN. La pureza se mide mediante la relación entre la absorbancia a 260nm y 280nm (Surzycki, 2000).

1.4.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, que permite la síntesis in vitro de ADN (Barrera y Rodríguez, 2004). Esto se consigue mediante la repetición cíclica de reacciones enzimáticas a diferentes temperaturas.

Estas reacciones permiten la replicación exponencial del ADN gracias a enzimas como la ADN polimerasa (Treguerres *et.al*, 2003). Una PCR estándar consiste de tres pasos (Figura 1.1):

- a) *Desnaturalización*: consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para así separarlo en dos cadenas sencillas que servirán como molde para la amplificación. Para ello se incubaba a temperaturas entre 92 y 95°C (Barrera y Rodríguez, 2004).
- b) *Hibridación*: dos tipos de moléculas cebadoras cuyas secuencias son complementarias a los extremos de la secuencia a amplificar en el ADN, hibridan específicamente con las secuencia del ADN molde, a una temperatura que facilite el apareamiento de bases. Esta temperatura de hibridación depende del contenido de GC de los cebadores y generalmente oscila entre 50 y 60°C (Treguerres *et.al*, 2003).
- c) *Extensión*: una ADN polimerasa termoresistente sintetiza una cadena complementaria a cada una de las cadenas molde, adicionando nucleótidos al extremo 3' del cebador hibridado. Este paso se efectúa a 72°C cuando se usa Taq polimerasa regular. Al final del proceso de extensión se generan dos nuevas moléculas de ADN de cadena doble idénticas a la secuencia original (Surzycki, 2000).

El número de ciclos en una PCR estándar varía entre 20 y 45 resultando en una acumulación del fragmento de ADN. En teoría después de 30 ciclos de amplificación se obtendrían 1.000 millones de copias, cantidad suficiente para ser visualizada por electroforesis y cuantificado por espectrofotometría. En la actualidad, las reacciones de PCR se encuentran totalmente automatizadas mediante aparatos llamados termocicladores (Treguerres *et.al*, 2003).

La metodología de PCR es una herramienta poderosa para el diagnóstico rápido y preciso de una serie de enfermedades infecciosas. Esto gracias a que es una técnica altamente específica, rápida, sensible y versátil.

Es así que si en una muestra clínica hay un microorganismo que está presente aunque sea en una cantidad muy escasa, la PCR amplificará la secuencia específica hasta que aparece una señal detectable (Keith & Westran, 2005). (Figura 1.1).

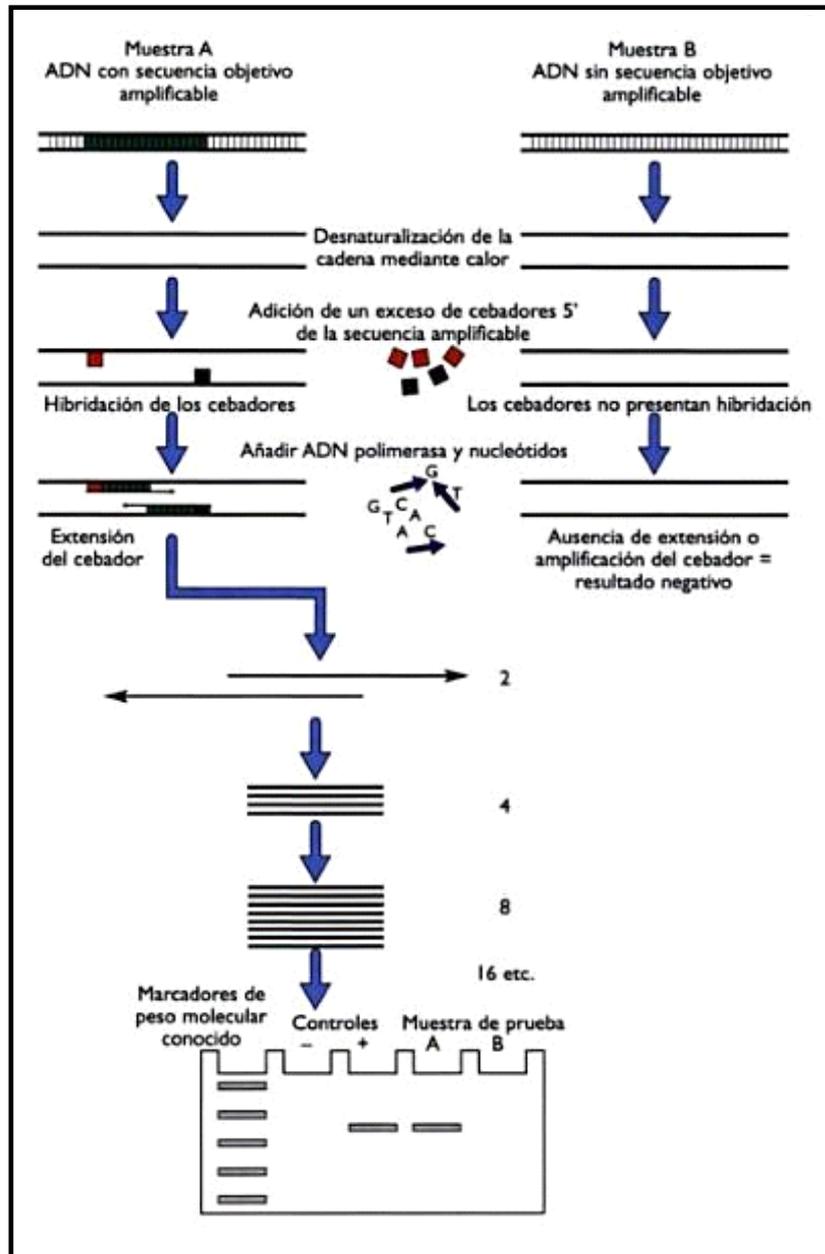


Figura 1.1 Reacción en cadena de la polimerasa. Los ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación del cebador y síntesis del ADN dan lugar a la producción exponencial del ADN objetivo, que puede identificarse mediante electroforesis en gel. La muestra A es positiva y la muestra B es negativa Tomado de: Keith & Westran, 2005

1.4.4.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)

Es una técnica de biología molecular por la cual los organismos pueden ser diferenciados mediante un análisis de patrones derivados del reconocimiento y corte de su ADN mediante enzimas de restricción (Hill, 2002).

Estas enzimas pueden reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortarlo en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción y que depende de la enzima. Esto produce fragmentos de diferentes longitudes que pueden ser visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa (Lodish, 2003). En el caso de bacterias, estos fragmentos evidencian la variabilidad entre secuencias permitiendo la identificación a nivel de género y especie (Pavia, Calderón y Puerta, 2005).

1.4.4.4 Ventajas y Desventajas de los métodos moleculares

Ventajas

- Se puede aplicar directamente a la muestra clínica sin necesidad de cultivo microbiológico (Petti, 2007).
- No requiere de microorganismos viables para la detección.
- Reduce el tiempo de diagnóstico.
- Tecnología altamente específica, sensible y versátil.
- Puede ser llevada a cabo con mínimas cantidades de muestra (Petti, 2007).

Desventajas

- La implementación inicial del laboratorio es costosa y solo pocos laboratorios cuentan con los recursos necesarios (Jill, 2004).
- Dificultad al distinguir colonización vs. infección en un resultado positivo (García, 2006).

- Dificultad del análisis ante la presencia de infecciones polimicrobianas.
- La sensibilidad puede disminuir ante la presencia de inhibidores de la PCR o ADN humano (Petty, 2007)
- Elevada posibilidad de resultados falsos positivos debido a contaminación en la PCR (Kwok & Higuchi, 1989).

1.4.5 PCR Universal o de amplio espectro

Una de las técnicas de PCR de amplio espectro bacteriano es la amplificación mediante primers universales que reconocen secuencias conservadas del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S rDNA (Nikkari, Lopez, Lepp, Cieslak, Wilson, Passaro, Danila & Relman, 2002). El 16S rDNA forma parte del ribosoma bacteriano y es codificado por el operon *rrn*. Su aplicación fue propuesta por Carl Woese en los años 70, quien lo consideró como un importante cronómetro molecular para estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Esta denominación fue mundialmente aceptada debido a que es una molécula evolutivamente muy antigua y que se encuentra presente en todas las bacterias (Mendoza y Rodicio, 2003).

Actualmente, se considera que el análisis del ARN ribosomal 16S puede ser de gran utilidad para la identificación rápida y correcta de patógenos en muestras clínicas.

1.4.5.1 Ribosoma bacteriano

Los ribosomas son orgánulos presentes en eucariotas y procariotas. En bacterias, se encuentran libres en el citoplasma pudiendo existir miles de ellos, por ej., más de 15.000 en *E.coli* (Luque y Herráez, 2001). Son de vital importancia para la función celular ya que constituyen el lugar físico donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas durante el proceso de traducción (Luque y Herráez, 2001). Para esto, interactúan con un gran número de moléculas que incluyen al RNA mensajero (mRNA) y al RNA de transferencia (tRNA).

El ribosoma proporciona el entorno necesario para que se una el codón del mRNA y el anticodón del tRNA. Además cataliza la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos de la proteína en crecimiento (Lizcano, 2005).

Estructuralmente, los ribosomas bacterianos se componen de proteínas (35%) y rRNAs (65%) que constituyen dos subunidades desiguales en tamaño. Cada una presenta un valor de sedimentación medida en Svedbergs correspondiente a 30S y 50S (Herrera, 2008). La subunidad 30S contiene el rRNA 16S y 21 proteínas diferentes. La subunidad grande 50S se constituye de los rRNA 5S, 23S y 34 proteínas (Mendoza y Rodicio, 2003).

1.4.5.2 Operón ribosómico *rrn*

Se denomina operón a un grupo de genes situados juntos en la misma unidad de transcripción y que cumplen funciones relacionadas. En bacterias, el operón *rrn* incluye los genes que codifican para los ARN ribosomales, 16S (*rrs*), 23S (*rrl*) y 5S (*rrf*) (Mendoza y Rodicio, 2003). Además consta de regiones espaciadoras de 400-500 pb que contienen genes que codifican para uno o más ARNt así como secuencias diana para ARNasa y ADN no codificante (Lewin, 2004).

Durante la transcripción, cada operón *rrn* produce un solo ARN precursor a partir del cual se liberan todas las moléculas maduras (ARNr, ARNt) mediante cortes con enzimas ARNsalll (Lewin, 2004). (Figura 1.2)

El número de copias del operón *rrn* por genoma bacteriano puede variar entre 1 a 15. Por ejemplo *Escherichia coli* presenta 7 copias/genoma mientras *Mycobacterium tuberculosis* presenta solo 1 copia. Según Condon *et.al*, esta variación permite regular la tasa de crecimiento así como la adaptación rápida a diferentes condiciones ambientales (Klappenbach, Dunbar, & Schmidt, 2000).

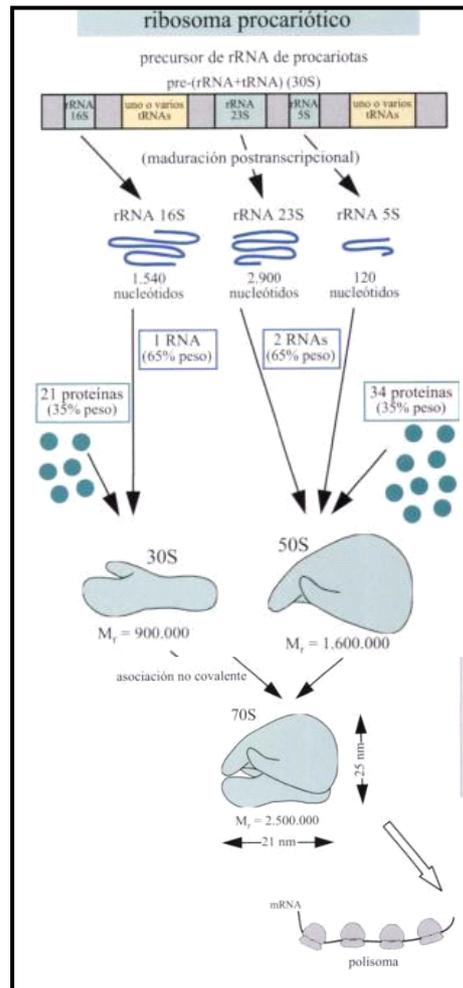


Figura 1.2. Operón ribosómico *rrn*. Los operones *rrn* contienen los genes para el ARNr y de ARNt. El ribosoma se compone de los ARNr y otras proteínas sintetizadas. Una vez conformados, los ribosomas bacterianos se agrupan en polisomas para dar lugar a la traducción del mRNA. Tomado de Lewin, 2004

1.4.5.3 *Gen rrs*

El gen *rrs*, que codifica para el ADNr 16S, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pb. Este gen tiene características que lo hacen atractivo como herramienta para diagnóstico molecular (Mendoza y Rodicio, 2003).

Entre sus principales ventajas destacan que es un componente común en todas las bacterias y su secuencia está conformada tanto por regiones altamente conservadas como por otras considerablemente variables (Figura 1.3), (Boddinghaus, Rogall, Flohr, Blocker & Bottgeri, 1990).

Las regiones conservadas pueden ser utilizadas para la detección mediante PCR, amplificando el gen a través de primers universales de aproximadamente 20 pb. Las regiones variables permiten la identificación bacteriana a nivel de género y especie mediante comparaciones taxonómicas de las secuencias. (Jill, 2004).

Se ha demostrado que la amplificación de todo el gen no es siempre necesaria. Si el objetivo es la identificación de una especie ya conocida, se pueden diseñar primers que amplifiquen fragmentos de menor tamaño, preferentemente 500pb. Para la identificación de nuevas especies, se suele amplificar el gen completo de 1500pb (Mendoza y Rodicio, 2003).

Casi todos los genes rrs de patógenos bacterianos han sido secuenciados y gracias al progreso de la bioinformática se puede acceder a estas bases de datos (Liu, Han, Huang & Zhu 2005). GenBank, la mayor base de datos de secuencias de nucleótidos, tiene mas de 20 millones de secuencias de las cuales cerca de 90,000 corresponden al gen 16S rRNA (Jill, 2004).

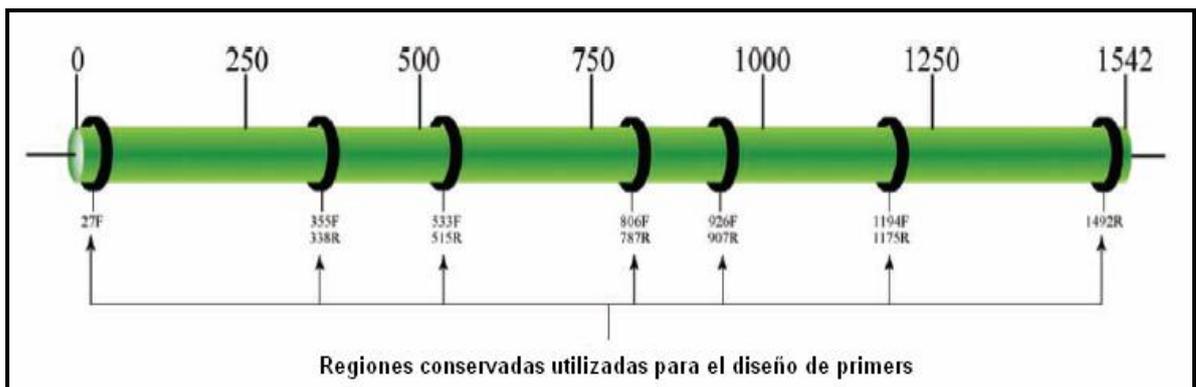


Figura 1.3. Representación esquemática del gen ARN ribosomal 16S. Los círculos representan las regiones conservadas que sirven como blanco para la amplificación por PCR. Tomado de Petti, 2007.

1.4.6 Contaminación en la PCR Universal de amplio espectro 16S rDNA

Uno de los principales problemas de la aplicación de la PCR al diagnóstico clínico es la contaminación. La PCR es capaz de detectar mínimas cantidades de ADN molde debido a su gran sensibilidad. Además puede amplificar 10^6 - 10^7 veces una sola copia de ADN molde (Corless, Guiver, Borrow, Edwards, Kaczmarek & Fox, 2000). Sin embargo cuando estas moléculas provienen de fuentes diferentes a la muestra, puede confundirse los resultados y conducir a diagnósticos falsos positivos (Kwok & Higuchi, 1989).

En el caso de la PCR Universal 16S rDNA, este problema puede ser aún más limitante. Debido a que el gen *rrs* está presente en múltiples copias, la posibilidad de detectar pequeñas cantidades de ADN bacteriano es mayor comparado con otros ensayos que detectan una sola copia del gen en estudio. En estas condiciones, la sensibilidad de PCR 16S rDNA puede ser su principal ventaja, o su mayor inconveniente (Corless et al., 2000).

1.4.6.1 Fuentes de contaminación

Las principales fuentes de contaminación que deben considerarse para evitar falsos positivos en la PCR 16S rDNA son: 1) contaminación cruzada; 2) contaminación por acumulación de amplicones; 3) contaminación de reactivos.

La contaminación cruzada se debe a la transferencia de ADN desde una muestra hacia otra. Puede ocurrir en cualquier paso del proceso, desde la recolección y procesamiento de muestras hasta la amplificación final. Incluso la contaminación en las superficies de trabajo, materiales de laboratorio, o en la piel del laboratorista, puede dar lugar a falsos positivos (Longo, Berninger & Hartley, 1990).

La acumulación de amplicones intactos o degradados generados por una repetición continua de ensayos de PCR, es una de las fuentes más reportadas de contaminación (Niederhauser, Hofelein, Wegmiller, LiJthy &

Candrian, 1994), debido a su relativa abundancia y su ideal estructura para re-amplificarse (Longo et. al., 1990).

En la PCR 16S rDNA, la contaminación de reactivos que son obtenidos a partir de fuentes bacterianas representa otro serio problema. Durante la producción de algunos reactivos, en especial enzimas, pueden ser copurificados ácidos nucleicos incluyendo secuencias de ARN ribosomal. El caso más reportado de este problema es la Taq ADN polimerasa. Esta enzima es obtenida en su forma nativa a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*, u obtenida como proteína recombinante en *E.coli*. En cualquier caso, se puede presentar contaminación debido a una purificación incompleta (Corless et al., 2000).

1.4.7 Descontaminación de la PCR 16S rDNA

Determinar la fuente de la contaminación puede ser muy difícil y tomar mucho tiempo, por lo que se prefiere controlar todo el proceso de PCR utilizando varias estrategias físicas, químicas y/o enzimáticas (Corless et al., 2000).

Las estrategias físicas deben ser consideradas de rutina en todos los laboratorios donde se llevan a cabo ensayos de PCR, ya que permiten prevenir la contaminación cruzada. Entre las principales recomendaciones se sugiere trabajar utilizando cámaras de bioseguridad que posean lámparas germicidas de UV, utilizar material estéril y no transferirlo entre áreas de trabajo. Los reactivos de PCR deben ser divididos en alícuotas y almacenados en áreas libres de amplicones. Siempre se debe incluir en el ensayo controles positivos y negativos que permitan un seguimiento de todas las reacciones llevadas a cabo (Kwok & Higuchi, 1989).

Adicional a las barreras físicas, se puede evitar la contaminación mediante tratamientos químicos y/o enzimáticos. Entre los más utilizados se pueden mencionar la radiación UV, el tratamiento con 8-methoxypsoraleno (MOP) y la digestión con uracil-DNA-glicosilasa (UDG). Otros tratamientos

descritos son la utilización de exonucleasa III, DNasa I, hidrocloreuro de hidroxilamina y la radiación (Niederhauser et al., 1994).

1.4.7.1 8-methoxypsoraleno (MOP)

Las furocumarinas son compuestos heterocíclicos que consisten de un anillo furano fusionado con una cumarina benzo-alfa pirona (Figura 1.4 A). En la naturaleza son biosintetizadas por algunas plantas y existen en dos formas: lineal, conocida como psoraleno y angular, conocida como angelicina (Serra & Tribó,1999).

El 8-methoxyopsoraleno es un psoraleno que fue aislado por primera vez a partir de semillas de *Ammi majus* en 1948 (Dall, Vedaldi & Rodighiero, 1979). Es un agente químico fotoactivo capaz de formar fotoaductos en presencia de radiación ultravioleta a longitudes de onda entre 200 y 400 nm aproximadamente (Figura 1.4 B). Los psoralenos son inertes antes de la exposición a la radiación y se activan de forma transitoria hasta un estado excitado después de la irradiación (Edelson y Gasparro, 2002).

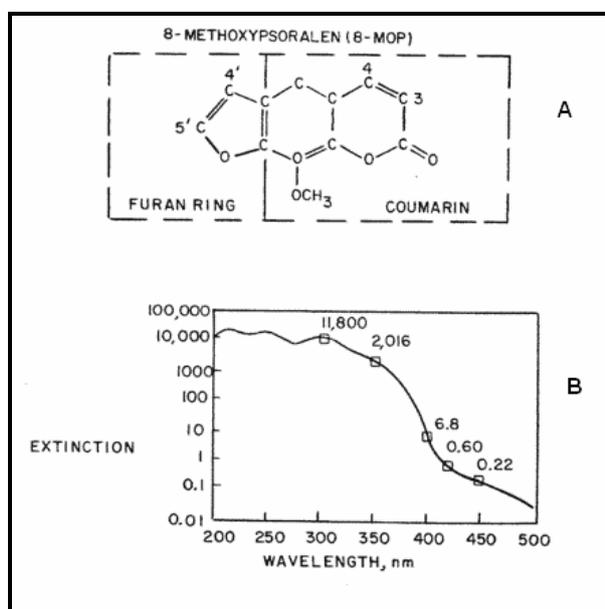


Figura 1.4 (A). Estructura del 8-methoxypsoraleno. (B). Espectro de absorción del 8-MOP. Tomado de Edelson y Gasparro, 2002.

Los fotoaductos son complejos que se forman por el acoplamiento covalente entre los grupos reactivos de una molécula biológica con grupos de un compuesto químico. En el caso de la interacción entre el ADN y el 8-MOP, el enlace covalente se da entre las bases de pirimidina del ADN y un anillo de furano o pirona del psoraleno (Edelson y Gasparro, 2002).

Existen tres tipos de fotoaductos de psoraleno-ADN: los monoadductos de anillo de furano-ADN, los monoadductos de anillo de pirona-ADN y los entrecruzamientos o diaductos de psoraleno-ADN (Figura 5). En los monoadductos, una base de pirimidina de ADN se une covalentemente a un anillo de furano o de pirona. En los entrecruzamientos, dos bases de pirimidina colocadas en cadenas diferentes de la doble hélice de ADN se acoplan covalentemente a través del anillo de furano y de pirona. Como resultado del entrecruzamiento se evita la replicación del ADN (Edelson y Gasparro, 2002).

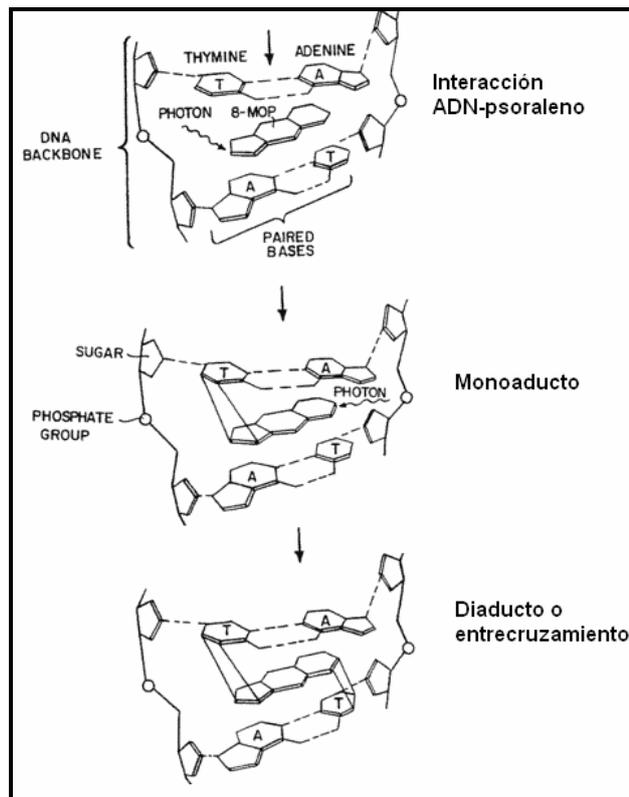


Figura 1.5. Esquema de la interacción ADN-psoraleno. Se observa la formación de monoadductos y entrecruzamientos de psoraleno tras la absorción de dos fotones de radiación. Tomado de Edelson y Gasparro, 2002.

In vitro, la formación de fotoaductos se ve afectada por varios parámetros como son la intensidad y longitud de onda de radiación UV, la concentración de psoraleno, cantidad de ADN presente y duración de la exposición UV (Mifflin, 2007). En el caso de la longitud de onda, ésta puede afectar la proporción en que se forman mono o diaductos. También puede inducir la fotodegradación del 8-MOP (Edelson y Gasparro, 2002).

Estudios han revelado que las longitudes de onda corta de radiación UV degradan el 8-MOP dependiendo del tiempo de exposición y concentración de psoraleno. Por ejemplo una exposición a UVA (320-400nm) durante 30 minutos produce 22% de degradación de 8-MOP. En cambio, longitudes de onda larga cercanas a la luz visible (400-700nm), permiten la acumulación de monoaductos sin formación de entrecruzamientos (Edelson y Gasparro, 2002)

Considerando estas características de las furocumarinas, en varias investigaciones se ha propuesto al 8-MOP como tratamiento para inactivar el ADN contaminante presente en los reactivos utilizados en la PCR (Meier, Persing, Finken & Bottgerl, 1993). La eliminación de este ADN facilitaría la detección bacteriana mediante la amplificación universal de amplio espectro 16S rDNA, sin embargo es necesario optimizar cada parámetro dependiendo de las necesidades y resultados que se desean obtener.

1.4.8 Sistema de Hipótesis o Pregunta de Investigación

El sistema de diagnóstico basado en la amplificación del gen 16S rDNA mediante la técnica de PCR-RFLP detecta la presencia de patógenos en muestras biológicas de pacientes con sospecha de infección quirúrgica en población pediátrica de forma más rápida y eficiente que los métodos de microbiología convencional.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente tesis fue financiada por la Escuela Politécnica del Ejército a través del Vicerrectorado de Investigación como parte de los proyectos de extensión 2007. Se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Marcelo Grijalva y la codirección de la Dra. Patricia Jiménez.

Además, el Hospital de Niños “Baca Ortiz” de la Ciudad de Quito, ubicado en la Av. 6 de Diciembre y Av. Colón, proporcionó las muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección quirúrgica y la contraparte microbiológica de los resultados.

2.2 Zona de Estudio

La investigación fue llevada a cabo en los Laboratorios de Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército ubicados en la ciudad de Sangolquí, provincia de Pichincha, Av. Progreso S/N. El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Humana.

2.3 Período de tiempo de Investigación

La investigación tuvo un período de duración de un año transcurrido entre los meses de Agosto 2008- Agosto 2009

2.4 Diseño

La investigación se enmarcó en un diseño de tipo exploratorio-confirmatorio (Hinkelman & Kempthorne, 1994 citado por Mendoza, 2005). En la primera fase exploratoria se diseñó un sistema de diagnóstico molecular mediante la variación de distintos parámetros inherentes al ensayo que permitieron obtener un sistema optimizado.

En la fase confirmatoria, se procesaron muestras clínicas obtenidas a partir de pacientes con sospecha de infección quirúrgica y se compararon los resultados obtenidos mediante el sistema optimizado versus los obtenidos con la metodología estándar.

Además se diseñó un sistema de referencia consistente en formularios y hojas de reporte de resultados que sirvieron como medio estandarizado para transmitir los datos desde el hospital hacia el laboratorio y viceversa.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Obtención de controles positivos

Los controles positivos correspondieron a ADN genómico bacteriano obtenido a partir de cepas puras de microorganismos de relevancia clínica que sirvieron como referencia para optimizar y controlar la eficiencia de los sistemas. Las cepas fueron mantenidas viables en sub-cultivos en agar manitol, sangre y EMB dependiendo de los requerimientos de cada cepa y se almacenaron en glicerol a -20°C hasta su utilización (Anexo A).

Para la obtención del ADN se sometieron las cepas a un proceso de extracción y purificación de ADN genómico bacteriano ya sea por métodos manuales o por medio de kits. Posteriormente se cuantificó la concentración de ADN y se visualizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa.

2.5.2 Extracción de ADN genómico bacteriano

2.5.2.1 Protocolo de extracción manual a partir de suspensiones bacterianas

La extracción manual se basó en una modificación al método de Marmur, 1961 propuestas por Yáñez, 2006. Para ello primero se siembra la bacteria en caldo cerebro-corazón (Anexo A) y se incuba en agitación 18h a 37°C. Se dispensa 2ml de suspensión en un tubo eppendorf y se centrifuga 10

min a 14000 rpm. Se desecha el sobrenadante y se adiciona 1 ml de buffer de lisis (1M Tris pH 8, 0.5 M EDTA) además de un coctel lítico (20µl de lisozima 15mg/mL, 20µl de lisostafina 1.8 mg/mL y 20µl de liticasa 5U/mL). Se agita e incuba de 1 a 3 horas a 37°C.

Una vez que la lisis se ha completado, se procede a la desproteinización. Se añade 76µl de solución B (10% SDS, proteinasa K 10 mg/mL), se agita intensamente e incuba 10 min a 65°C. Se adiciona 100 µL de NaCl 5M y 80µl de solución CTAB/NaCl, se agita vigorosamente e incuba a 65°C por 10 min. Posteriormente se añade 700µl de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcla en el vórtex 15 segundos y centrifuga 5 min a 14000 rpm. Con cuidado se remueve la fase superior y se coloca en un nuevo tubo de 1.5ml

Para la precipitación del ADN se completa el volumen con isopropanol. Se mezcla por inversión y se incuba al menos 30 min a -20°C. Se procede a centrifugar a 14000 rpm por 30 min. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con 1ml de etanol frío al 70% (v/v).

La recolección del ADN se da mediante centrifugación a 14000 rpm por 15 min. Se descarta el sobrenadante con cuidado y se deja reposar los tubos abiertos para evaporar el etanol. Finalmente se disuelve el pellet en 100µl de buffer TE pH 8 y se almacena a -80°C.

2.5.2.2 Protocolo modificado de extracción mediante QiAamp DNA MiniKit de Qiagen® a partir de suspensiones bacterianas

La purificación del ADN utilizando el kit de Qiagen se da mediante la aplicación de columnas que contienen membranas de silica. Se utilizan buffers de lisis que permiten ajustar las condiciones de sales y pH adecuadas para que el ADN presente en la muestra se una a la membrana. Posteriormente se utilizan buffers de lavado que remueven residuos contaminantes. Finalmente se utiliza una buffer de elusión que permite recuperar el ADN unido a la columna.

Para la extracción a partir de suspensiones bacterianas se requiere sembrar la bacteria en caldo cerebro-corazón e incubar en agitación de 12 a 18 h a 37 °C. Los posteriores pasos para la extracción se siguen de acuerdo al fabricante (Anexo B). Sin embargo, adicional a la buffer de lisis ATL se añade un coctel lítico (20uL lizosima, 20uL lisostafina y 20uL de liticasa) y se incuba a 1 hora a 37°C, lo que permite una apropiada lisis bacteriana.

2.5.2.3 Protocolo modificado de extracción mediante QiAamp DNA MiniKit de Qiagen® a partir de tejidos y secreciones.

Para la extracción de ADN genómico bacteriano a partir de tejidos, se corta aprox. 25 mg del tejido en pequeños pedazos y se ubica en un tubo eppendorf. Para secreciones se dispensa 200uL de muestra en un tubo eppendorf. Para cantidades menores de 200ul se puede añadir la cantidad apropiada de buffer PBS 1X pH 7.4 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) o de solución salina. Si la muestra es un hisopado, se remueve el palo con unas tijeras y se pone el algodón en un tubo eppendorf, después se adiciona 200uL de PBS o solución salina.

Una vez dispensada la muestra, ya sea ésta tejido, secreción o hisopado, se adiciona buffer ATL y el coctel de enzimas líticas. Se incuba a 37°C por 1 hora. Posteriormente se siguen las instrucciones de acuerdo al fabricante (Anexo B). Finalmente se eluye el ADN en 50 uL de buffer AE para obtener una mayor concentración de ADN bacteriano.

2.5.3 Método de cuantificación por fluorometría

Para cuantificar ADN por fluorometría se utiliza el fluorómetro Qubit de Invitrogen mediante el Kit Quant iT dsDNA. Este consta de un fluoróforo, un buffer de dilución, y dos estándares de calibración. Para la utilización del kit se sigue el procedimiento propuesto por el fabricante. Los resultados se multiplican por un factor de dilución para determinar la concentración original de la muestra en ng/uL (Anexo C).

2.5.4 Electroforesis horizontal en geles de agarosa

Una vez extraído el ADN se procedió a visualizarlo mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó un voltaje de 120v por 1 hora.

Para la preparación del gel se pesa una cantidad apropiada de agarosa dependiendo de la concentración requerida y se disuelve en buffer TAE ó TBE. Se agita la solución por 10 minutos en un stir hot plate para permitir que la agarosa se hidrate. Luego se lleva la solución a ebullición por 1 min y se deja homogenizar. Se repite este paso dos veces. Posteriormente se deja enfriar hasta que alcance los 55°C y se añade 0.5 ul de bromuro de etidio (10mg/mL) por cada 10 ml de solución. Finalmente se vierte en un molde plástico previamente armado que conste de una peineta con pocillos de tamaño adecuado.

Una vez solidificado el gel, se sumerge en un tanque de electroforesis horizontal lleno con el mismo buffer utilizado en la preparación. En general se pueden usar diferentes buffers, pero los más frecuentes son:

- Tris acetato EDTA buffer (TAE): 40mM tris base, 20mM ácido acético, 1mM EDTA.
- Tris borato EDTA buffer (TBE): 89mM tris base, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA. Este buffer tiene mayor capacidad amortiguadora que TAE y se usa para fragmentos menores de 1,000pb (Surzycky, 2000)

Posteriormente se procede a cargar las muestras en los pocillos del gel para lo cual se homogeniza 10ul de ADN con 2 ul de buffer de carga (Blue Juice 10X) el cual tiene tres funciones principales: detener reacciones enzimáticas, proveer densidad y dar color a las muestras (Surzycky, 2000).

Paralelo a la corrida de las muestras, es necesario cargar en el gel un marcador de peso molecular conocido, para poder determinar el tamaño de las

bandas. Para visualizar los resultados se utilizó un fotodocumentador UVP BioDoc It con cámara digital CCD que emite radiación UV a una longitud de onda de 365 nm al cual el bromuro de etidio emite fluorescencia.

2.5.5 PCR 16S rDNA

2.5.5.1 Oligonucleótidos o primers

Se amplificó una región conservada del gen 16S rRNA de 467 pb. Para ello se utilizó un par de oligonucleótidos de aproximadamente 20 pb, descritos por Warwick et.al, 2003 (Tabla 2.1). Los primers fueron producidos por Invitrogen.

Tabla 2.1 Especificación de los primers utilizados para la amplificación de un fragmento de 467 pb del gen 16S rDNA.

Primer	Secuencia 5´ - 3´	Posición gen <i>rrs</i> <i>E.coli</i>	T ^o m*(°C)	%GC *
Nf	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	340 - 358	59.4	63.16
Nr	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	806 - 781	58.1	46.15

* Calculada con Primer-Blast

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50uL por reacción (Cuadro 2.1). Se utilizó una Taq polimerasa recombinante (Invitrogen). El ADN se adicionó al final en un volumen de 5uL. Para los controles negativos se reemplazó el ADN por 5uL de agua grado biología molecular.

Cuadro 2.1 Preparación del Master Mix necesario para la PCR 16S rDNA

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1x (uL)
Primer Nf	100 pmol	10 pmol	0,1
Primer Nr	100 pmol	10pmol	0,1
Taq Polimerasa	5 U/uL	2,5 U/uL	0,5
dNTPs	100 mM c/u	100 uM c/u	1
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5
Buffer	10X	1X	5
Glicerol	60%	5%	4,2
Agua			32,6
Volumen total			45 uL

Las condiciones para la amplificación se basan en una PCR bifásica, utilizando un termociclador Techne TC-512. Los parámetros utilizados se especifican en el Cuadro 2.2. Los fragmentos amplificados se observaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% con BrEt.

Cuadro 2.2. Condiciones para la amplificación del gen 16S rDNA

Nº de ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Denaturación inicial	95	4 min
30	Denaturación	95	10 seg
	Alineamiento	62	1 min
1	Extensión Final	72	4 min
1	Espera Final	4	10 min

2.5.6 Descontaminación mediante 8- methoxypsoralen

2.5.6.1 Estrategia de descontaminación de la PCR

Se disuelve el 8-MOP (Sigma) en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener un stock a una concentración de 2.5 mg/ml. El tratamiento de la PCR se consigue adicionando al master mix la cantidad de solución apropiada para obtener una concentración final de 8- MOP de 25 ug/mL y una concentración final de DMSO del 1% por reacción. En investigaciones realizadas por Meier et.al, 1993, se determinó que una concentración de 25ug/ml no interfiere con la amplificación.

La mezcla se incuba durante 30 min a 4°C en oscuridad para luego irradiarla con luz ultravioleta a 256 nm durante 1-5 minutos mediante un Crosslinker CL-1000 de UVP. Posterior al tratamiento, se añade el ADN en estudio y se prosigue con la PCR.

2.5.6.2 Estrategia de descontaminación de las enzimas líticas

Para la descontaminación de las enzimas líticas (lisozima, lisostafina y liticasa), se adiciona una cantidad apropiada de solución de 8-MOP disuelto en DMSO. Se incuba la mezcla durante 30 min a 4°C en

obscuridad para posteriormente irradiarla por 30min a 256 nm en un Crooslinker. Finalmente se hacen alícuotas de las enzimas y se almacenan a -20°C hasta su utilización durante la extracción de ADN bacteriano.

2.5.6.3 Equipos utilizados para irradiación con UV

Se utilizó el equipo Crosslinker CL-1000 de UVP. Este permite la irradiación mediante UV a una longitud de onda de 254 nm. Además permite dosificar la radiación hasta 1J/cm² así como programar el tiempo de exposición. Para descontaminar el material correspondiente a plasticware, micropipetas, puntas y guantes, se expuso los mismos a radiación UV por 15 minutos ubicándolos en una cabina de bioseguridad la cual consta de 2 lámparas de UV de 256nm.

2.5.6.4 Dosis de UV

Para todos los ensayos se aplicó una dosis de 1 J/cm² ya que en la bibliografía se especifica que a 4 J/cm² se experimenta una disminución en la cantidad de ADN detectado de 4-log (Corless et.al, 2000).

2.5.7 Métodos para determinación de la sensibilidad analítica

2.5.7.1 Determinación de la sensibilidad analítica medida en unidades formadoras de colonias

Cuando una célula aislada comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas produce una colonia en un breve lapso de tiempo.

2.5.7.1.1 Procedimiento de recuento en placa

El recuento en placa permite deducir el número de células viables en una suspensión original. Para ello se cuenta las colonias visibles, considerando la dilución de la que proceden y el volumen de alícuota utilizado.

Para llevar a cabo el proceso se siembra una cepa bacteriana en agar selectivo y se incuba hasta alcanzar el crecimiento exponencial (aproximadamente 18 horas) a 37°C. Se transfieren 3 asas colmadas de bacterias a tubos Falcon con 5 ml de medio de cultivo universal (caldo cerebro corazón). Se deja incubar en agitación 18h a 37°C. Seguidamente se realizan diluciones seriadas a partir del tubo con cultivo puro inoculando 500 uL de muestra en 4500 uL de solución salina. A partir de cada dilución se siembra mediante un asa bacteriológica calibrada de 0.01ml a un medio sólido, mediante el método de siembra por extensión. Esto se realiza por triplicado. Se incuban las cajas a 37°C por 24 h y se procede al conteo de las colonias en cada caja (Figura 2.1). Finalmente se realizan los cálculos respectivos para obtener las UFC/ml.

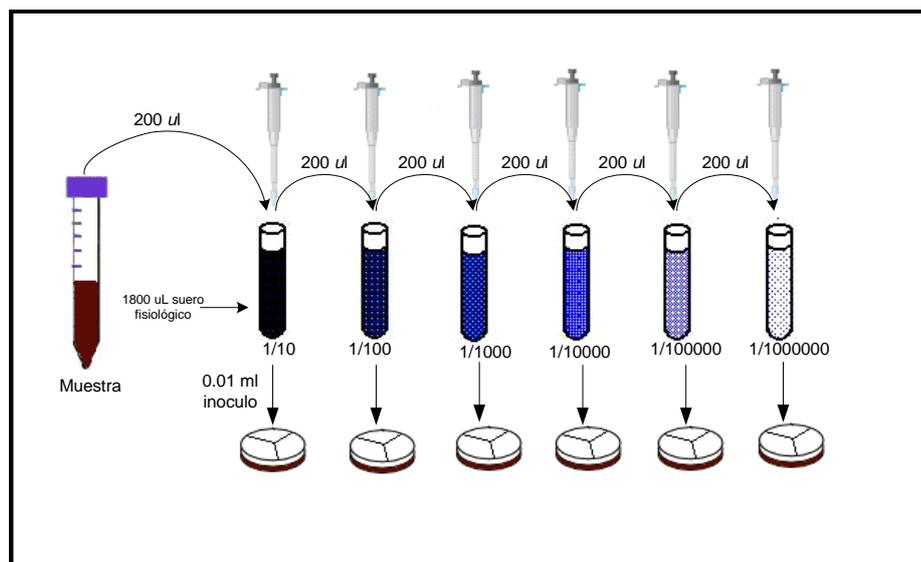


Figura 2.1 Esquema del procedimiento para el conteo en placa de UFC/ml

2.5.7.1.2 Cálculos para la determinación de la UFC/mL

Cuando se mezcla 1 mL de una suspensión bacteriana con 9 mL de solución salina, haciendo un total de 10 mL, representa una dilución 1:10 (también expresada como 1/10 o 10^{-1}).

El factor de dilución es el inverso de la dilución; así por ejemplo para una dilución de $\frac{1}{2}$, el factor de dilución es $\frac{2}{1}$ o 2. El factor de dilución indica el número por el cual hay que multiplicar el número de bacterias encontradas en las placas, para conocer cuánto hay en 1 mL original de la suspensión bacteriana (Figura 2.2).

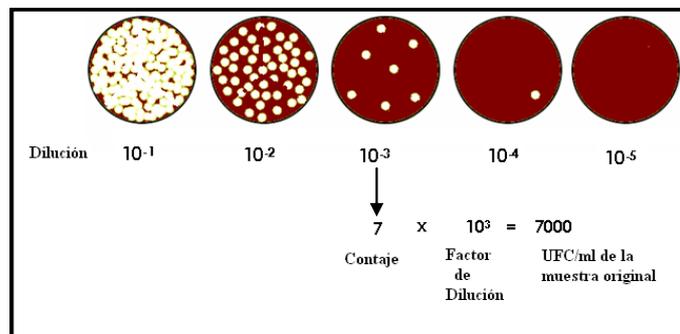


Figura 2.2 Conteo y cálculo de UFCs

Una vez determinadas las UFC/ml de cada dilución, se procede a la extracción del ADN genómico bacteriano de cada una de ellas. Posteriormente se realiza la amplificación mediante PCR 16S rDNA para cada dilución, lo que permitirá determinar el límite de detección del ensayo medido en UFC/mL.

2.5.7.2 Determinación de la sensibilidad analítica medida en concentración de ADN

Para ello se utiliza ADN genómico bacteriano de concentración conocida y se procede a realizar diluciones seriadas del mismo (Figura 2.3). A continuación se realiza un ensayo de PCR 16S rDNA para cada dilución. Esto permite conocer el límite de detección del ensayo medido en ng/uL de ADN.

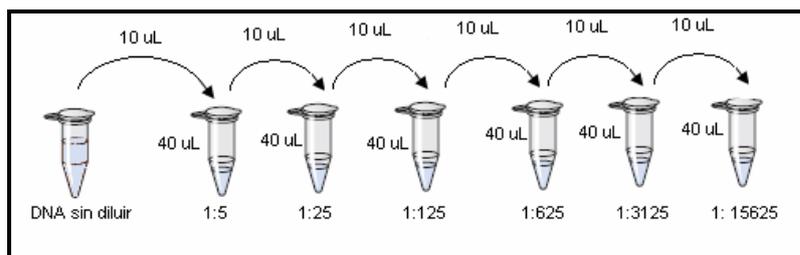


Figura 2.3 Diluciones seriadas de una muestra de ADN de concentración conocida.

2.5.8 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

2.5.8.1 Metodología

Una vez extraído y purificado el ADN genómico bacteriano, se procede a amplificar cada muestra mediante PCR 16S rDNA. Los amplicones resultantes son tratados con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto proporciona un patrón de bandas que es comparada con un algoritmo de referencia.

Para la digestión con las enzimas se ensamblan los reactivos en un tubo estéril de acuerdo al Cuadro 2.3. Se mezcla por pipeteo y se centrifuga unos segundos. Cada enzima de restricción debe ser incubada a una temperatura óptima durante 1-4 horas (Cuadro 2.4). Un período de incubación mayor no afecta las propiedades de la enzima. Finalmente se procede al análisis por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio.

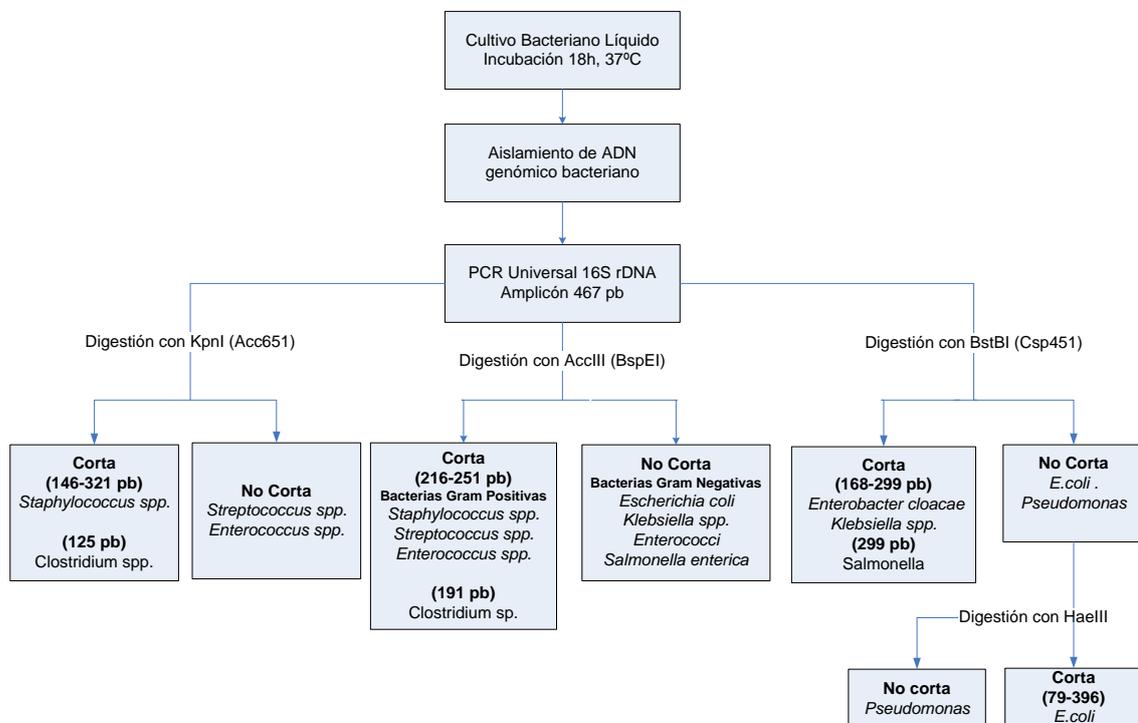
Cuadro 2.3 Protocolo para la digestión con enzimas de restricción

Reactivos	1X (uL)
Agua	15,2
RE 10X Buffer	3
BSA, 10 ug/ul	0,3
DNA o producto de PCR	10
Enzima de restricción, 10U/ul	1.5
Volumen total	30 uL

Cuadro 2.4. Enzimas de restricción para identificación bacteriana

Enzima de restricción	Isoesquímómero	Descripción	Condiciones de Incubación
AccIII (Invitrogen)	BspEI	T▼CCGGA A GGCC▲T	65°C
BstBI (Invitrogen)	Csp451	TT▼CG AA AA GC▲TT	37°C
KpnI (Promega)	Acc651	GGTAC▼C C▲CATGG	37°C
HaeIII (Promega)	BsuRI	GG▼CC CC▲GG	37°C

2.5.8.2 Algoritmo de referencia



2.6 Análisis de datos

Para el análisis de datos se empleó el criterio de positividad por el cual se consideran positivas aquellas muestras en las que se observe la presencia de un fragmento de ADN del peso molecular esperado. Seguidamente se compararon los patrones obtenidos a partir de la digestión con enzimas de restricción contra un algoritmo de referencia.

Además durante la investigación se tomó en consideración los siguientes datos que pueden afectar la realización del ensayo:

- a) Datos de la muestra: reflejan la interacción hospedero/organismo que puede influir en la composición y concentración del agente infeccioso en la muestra a analizar;
- b) Datos del sistema de ensayo: se analizaron los factores físicos, químicos, biológicos y técnicos que pueden afectar la capacidad del ensayo para detectar en la muestra el ADN del agente infeccioso;
- c) Resultados de la prueba: se analizaron datos de sensibilidad analítica que influirán en la capacidad del sistema para predecir de forma precisa la infección mediante un resultado positivo o negativo.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Obtención de controles positivos

Se obtuvieron cuatro controles positivos correspondientes a ADN genómico bacteriano de cepas puras. Para este propósito se eligieron dos cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y dos Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus milleri*). Las cepas fueron provistas por el Hospital Carlos Andrade Marín.

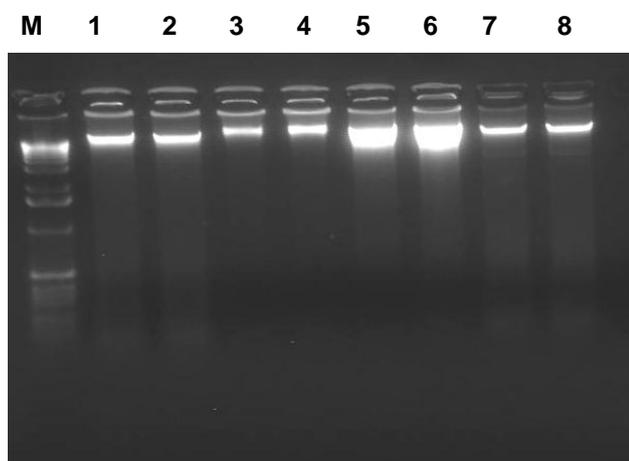


Figura 3.1 Purificación de ADN genómico bacteriano de cepas puras mediante QiAamp DNA MiniKit de Qiagen® a partir de suspensiones bacterianas. Carriles 1-2 *Escherichia coli*; 3-4 *Klebsiella pneumoniae*; 5-6 *Streptococcus milleri*; 7-8 *Staphylococcus aureus*, M, marcador 1Kb. Se visualizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8% con BrEt. Se observó ADN de alto peso molecular íntegro.

Cuadro 3.1 Cuantificación por fluorometría de ADN genómico bacteriano. Los valores corresponden a los controles positivos.

Muestra	1º Lectura ng/uL	2º Lectura ng/uL	3º Lectura ng/uL	Promedio ng/uL
<i>E.coli</i>	32,6	34	34,8	33,80
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35	37	36,8	36,27
<i>S.millieri</i>	98,4	104	106	102,80
<i>S.aureus</i>	31	32	31,6	31,53

3.2 Pruebas preliminares PCR 16s rDNA

Se realizaron pruebas preliminares de la PCR 16S rDNA utilizando un protocolo propuesto por Izquierdo, 2007. Los primers elegidos amplifican un fragmento de 467 pb del gen 16S rDNA. Las condiciones del ensayo fueron: 10 pmol de primers Nf y Nr, 400 uM dNTPs, 2,5U/uL Taq polimerasa, 2,5mM MgCl₂ y 1X buffer en un volumen total de 50uL. Después de 4min. a 95°C y 40 ciclos de 10 seg a 95°C, 1 min a 60°C y 4 min a 72°C en el termociclador, se procedió a visualizar mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con BrEt.

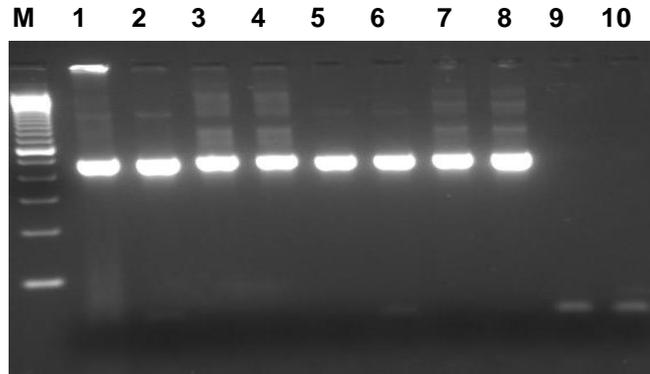


Figura 3.2 Primera prueba preliminar de la PCR 16S rDNA. Carriles 1-2 *E.coli* 10ng/uL, 3-4 *Klebsiella pneumoniae* 17ng/uL, 5-6 *S.aureus* 8 ng/uL, 7-8 *S. milleri* 10 ng/uL, 9-10 control negativo, M, marcador de 100pb. Se observó la presencia de productos inespecíficos.

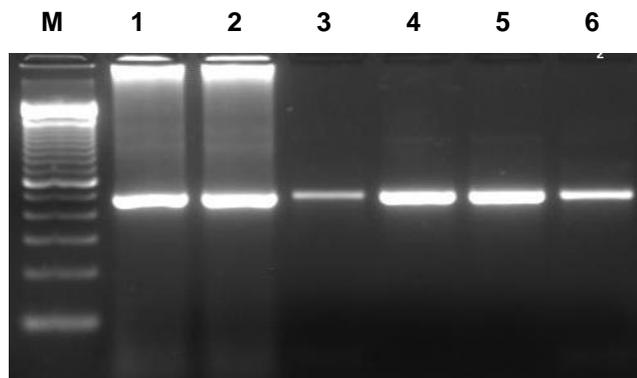


Figura 3.3. Segunda prueba preliminar de la PCR 16S rDNA. Carriles: 1-2, *E.coli*; 3-6, controles negativos; 4-5, *S. aureus*; M, marcador 100pb. Se observó contaminación de los controles negativos.

3.3 Pruebas preliminares RFLP

Para las pruebas preliminares del ensayo de RFLP, se utilizaron las condiciones propuestas por Izquierdo, 2007 que consistieron en: 2,5U de enzima por reacción, 10 ug/uL BSA, 1X buffer en un volumen de 10uL. Finalmente se adiciona 10ul de amplicón. La reacción se incubó por 3 horas.

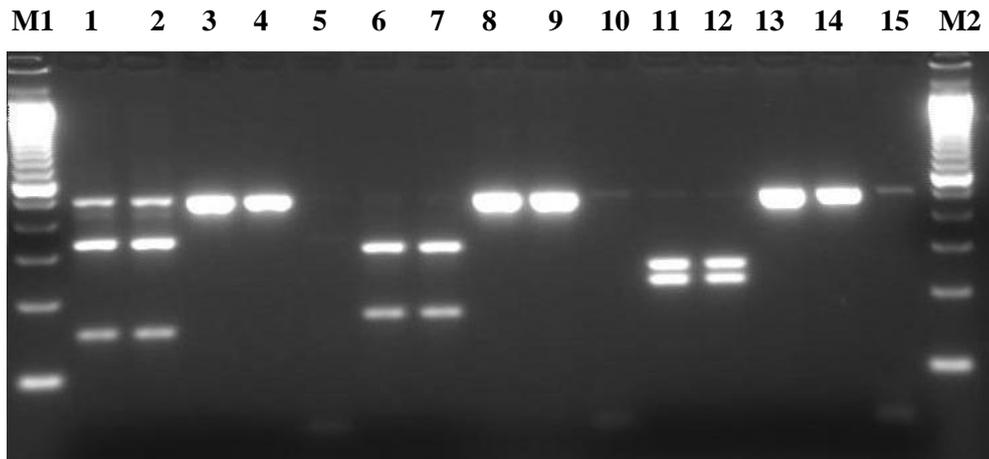


Figura 3.4 Ensayo preliminar de RFLP con amplicones de los controles positivos. Carriles: 1-2, Digestión con KpnI de *Staphylococcus aureus*; 3-4 Digestión con KpnI de *Streptococcus milleri*; 6-7 Digestión con BstBI de *Klebsiella pneumoniae*; 8-9 Digestión con BstBI de *Escherichia coli*; 11-12 Digestión con AcclIII de *Staphylococcus aureus*, 13-14, Digestión con AcclIII de *Escherichia coli*. 5-10-15, Controles negativos contaminados; M1-M2, marcador de 100pb.

Se observó que el sistema de RFLP presenta el patrón de cortes previsto con las enzimas de restricción de acuerdo con el algoritmo. Con la enzima AcclIII se produjeron 2 cortes en bacterias Gram positivas (216-251pb) y ninguno en bacterias Gram negativas. La enzima KpnI realizó 2 cortes en *Staphylococcus aureus* (146-321) y ninguno en el fragmento correspondiente a *Streptococcus milleri*. La enzima BstBI produjo 2 cortes en *Klebsiella pneumoniae* (168-299) y ninguno en *E.coli*. Sin embargo se observó una digestión incompleta con la enzima KpnI. También se pudo apreciar contaminación debido a que los amplicones utilizados para la digestión provinieron del sistema 16S rDNA contaminado.

3.4 Optimización de la PCR 16S rDNA

Se vio la necesidad de optimizar las condiciones de la PCR 16S rDNA propuestas por Izquierdo, 2007 debido a la presencia de productos inespecíficos y de contaminación de los controles negativos. Para ello se modificaron parámetros como temperatura de hibridación, número de ciclos, concentración de $MgCl_2$ y adición de adyuvantes.

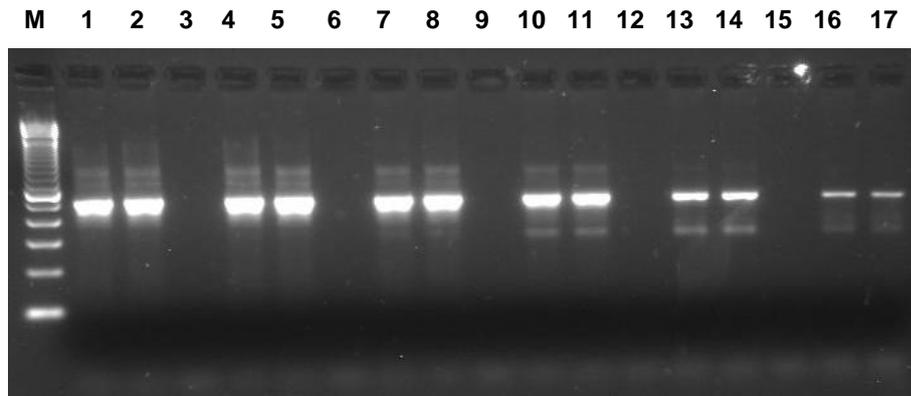


Figura 3.5 Ensayo de gradiente de temperatura. Se utilizó ADN de *E.coli* 10ng/uL, 1.5 mM $MgCl_2$ y 30 ciclos de hibridación y extensión. Carriles: 1-2-3, 58°C; 4-5-6, 60°C; 7-8-9, 62°C; 10-11-12, 64°C, 13-14-15, 66°C; 16-17, 68°C; M, marcador de 100pb. La mejor reacción se observó a 62°C, sin embargo aún existía presencia de productos inespecíficos.

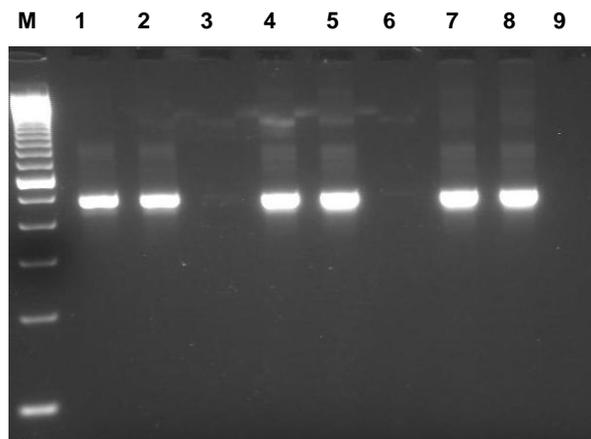


Figura 3.6 Ensayo con adyuvantes. Se utilizó ADN de *E.coli* 10ng/uL, 1.5 mM $MgCl_2$, 62°C de hibridación y 30 ciclos. Carriles 1-2-3, Glicerol 5%; 4-5-6 Sulfato de amonio 3mM; 7-8-9 sin adyuvantes, M, marcador 100 pb. La mejor reacción se observó con glicerol al 5%.

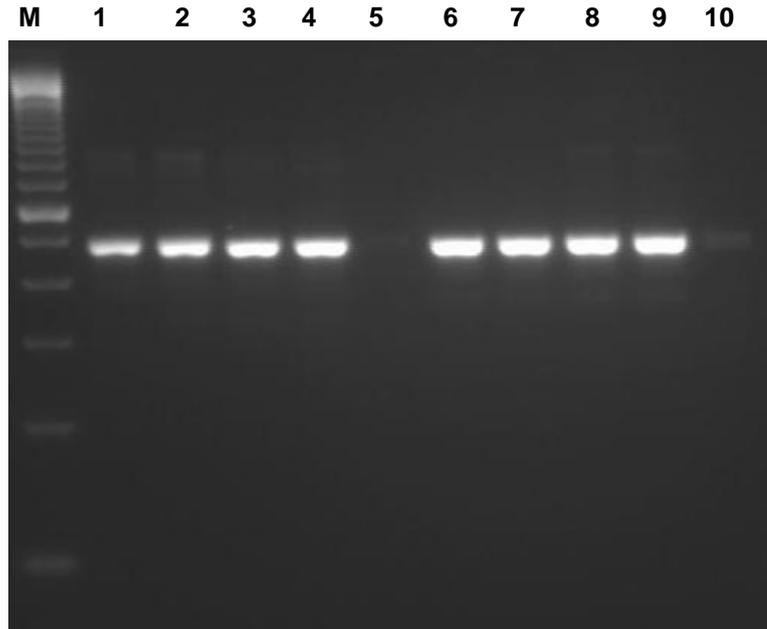


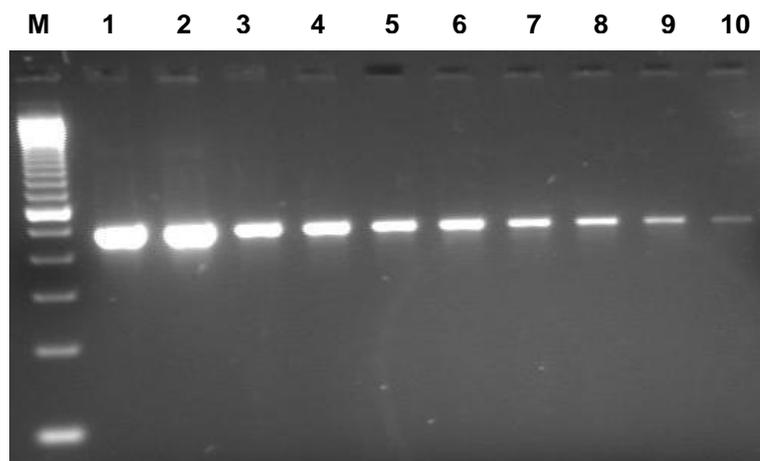
Figura 3.7 Amplificación de controles positivos con las condiciones para la PCR 16S rDNA optimizadas. Se utilizó 1.5 mM MgCl₂, 62°C de hibridación, 30 ciclos y glicerol al 5%. Carriles 1-2 *E.coli* 10ng/uL, 3-4 *Klebsiella pneumoniae* 17ng/uL, 6-7 *S.milleri* 10 ng/uL, 8-9 *S. aureus* 10 ng/uL, 5-10 controles negativos; M, marcador de 100pb. Se observó contaminación de los controles negativos.

3.5 Descontaminación de la PCR

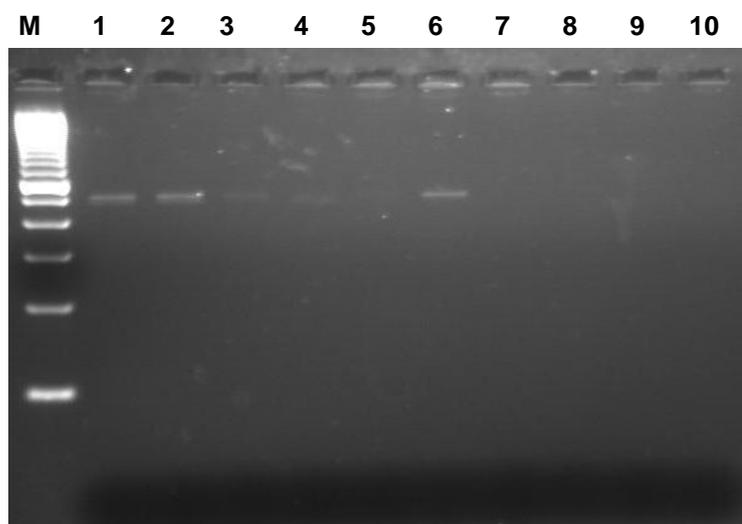
Debido a la contaminación de controles negativos, se procedió a la descontaminación mediante el químico fotoactivo 8-methoxypsoraleno. Se optimizó el tiempo de exposición de UV a 256nm y se determinó la cantidad de ADN que puede ser eliminada con el tratamiento.

3.5.1 Optimización del tiempo de exposición UV

Para determinar el tiempo óptimo de irradiación UV (256nm) necesaria para eliminar el ADN contaminante, se adicionó 8-MOP a una concentración de 25 ug/ml y se irradió el master mix de 1 a 4 minutos, antes de incluir el ADN en la reacción. El procedimiento se llevó a cabo tanto para controles positivos (bacterias Gram negativas y positivas), como para controles negativos.

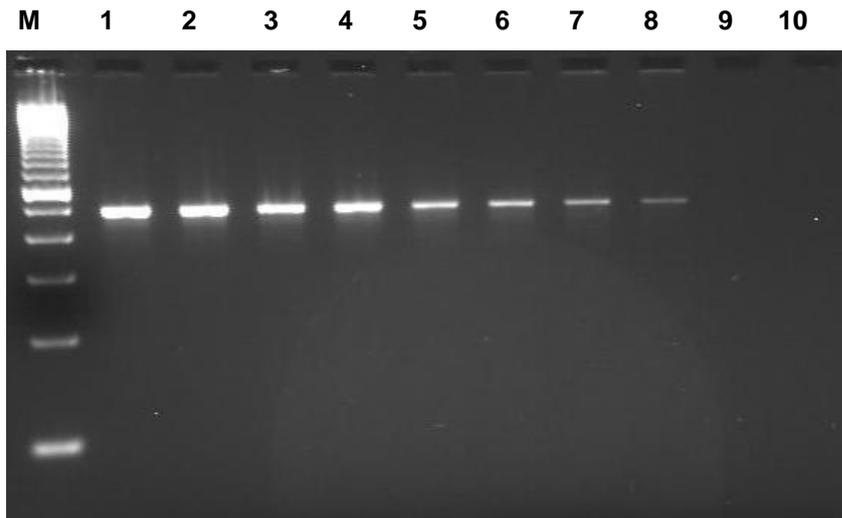


(A)

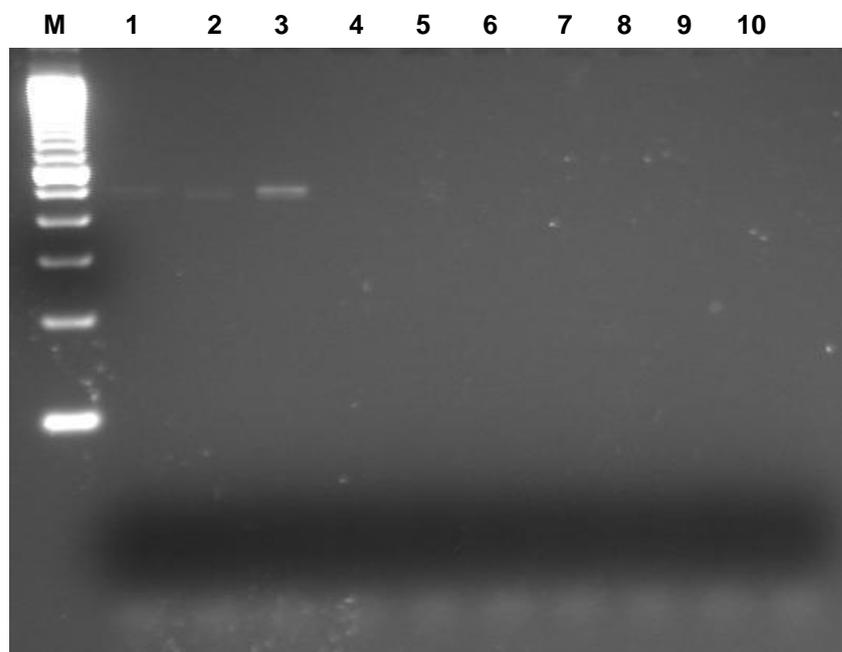


(B)

Figura 3.8 Efecto del tratamiento de UV a 256nm a diferentes tiempos de exposición para bacterias Gram negativas. Se adicionó 8-MOP a una concentración final de 25 ug/mL en 1% DMSO por reacción. (A) Reacción con ADN genómico de *E.coli* (11ng/uL). Carriles: 1-2, Sin tratamiento; 3-4, tratamiento UV 1 min; 5-6, tratamiento UV 2 min; 7-8, tratamiento UV 3 min; 9-10, tratamiento UV 4 min. (B) Reacción sin adición de ADN. Carriles: 1-2, Sin tratamiento; 3-4, tratamiento UV 1 min; 5-6, tratamiento UV 2 min; 7-8, tratamiento UV 3 min; 9-10 tratamiento UV 4 min; M, marcador 100 pb. El punto de corte se observó a los 3 minutos de irradiación.



(A)



(B)

Figura 3.9 Efecto del tratamiento de UV (256nm) a diferentes tiempos de exposición para bacterias Gram positivas. Se adicionó 8-MOP a una concentración final de 25 ug/mL en 1% DMSO por reacción. (A) Reacción con ADN genómico de *S. aureus* (10ng/uL). Carriles: 1-2, tratamiento UV 1 min; 3-4, tratamiento UV 2 min; 5-6, tratamiento UV 3 min; 7-8, tratamiento UV 4 min; 9-10, tratamiento UV 5 min. (B) Reacción sin adición de ADN. Carriles: 1-2, tratamiento UV 1 min; 3-4, tratamiento UV 2 min; 5-6, tratamiento UV 3 min; 7-8, tratamiento UV 4 min; 9-10 tratamiento UV 5min; M, marcador 100 pb. El punto de corte se observó a los 3 minutos de irradiación.

3.5.2 Evaluación del efecto del tratamiento 8-MOP+ UV sobre el ADN contaminante

Para evaluar la cantidad de ADN contaminante que es capaz de ser eliminado con el tratamiento combinado 8-MOP+ 3min UV, se realizó diluciones seriadas de ADN de *S. aureus* y se lo adicionó antes de la irradiación con UV. Se comparó con un ensayo utilizando solo UV.

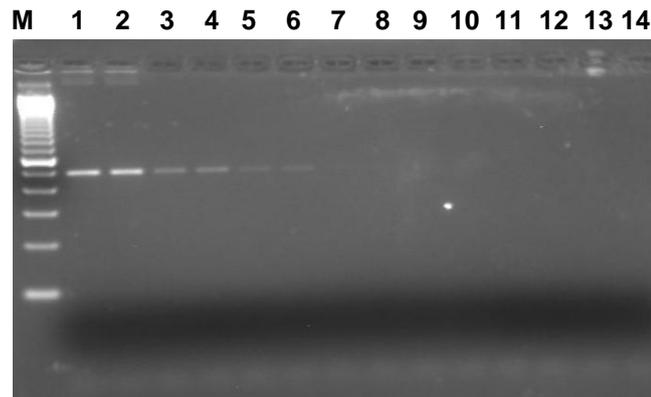


Figura 3.10 Determinación de la cantidad de ADN contaminante eliminado con 8-MOP + UV 3 min. El ADN de *S. aureus* se adicionó antes de la irradiación UV. Carriles: 1-2, 34ng/uL; 3-4, 8.62ng/uL; 5-6, 0.86 ng/uL; 7-8, 0.086 ng/uL; 9-10, 0.0086 ng/uL; 11-12, 0.00086 ng/uL; 13-14 0.000086 ng/uL. Se observó amplificación hasta una concentración de 0.86ng/uL.

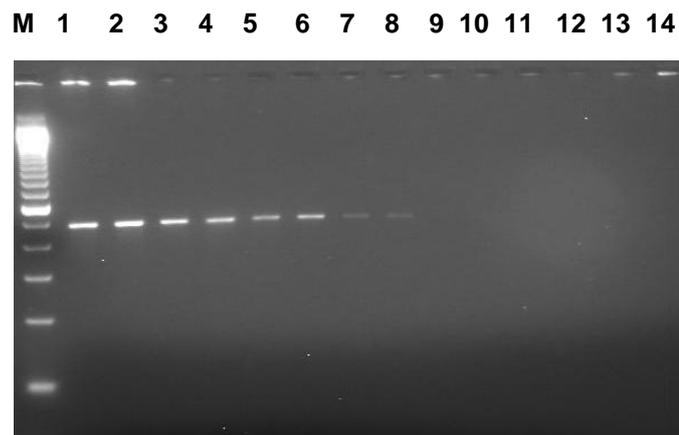


Figura 3.11 Determinación de la cantidad de ADN contaminante eliminado solo con UV 3 min. El ADN de *S. aureus* se adicionó antes de la irradiación UV. Carriles 1-2, 34ng/uL; 3-4, 8.62ng/uL; 5-6, 0.86 ng/uL; 7-8, 0.086 ng/uL; 9-10, 0.0086 ng/uL; 11-12, 0.00086 ng/uL; 13-14 0.000086 ng/uL. Se observó amplificación hasta una concentración de 0.086ng/uL.

3.6 Determinación de la sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se midió en UFC/ml y en concentración de ADN (ng/uL). En cada caso se realizaron ensayos para bacterias tipo Gram negativas y Gram positivas.

3.6.1 Sensibilidad analítica medida en UFC/mL para Gram negativas

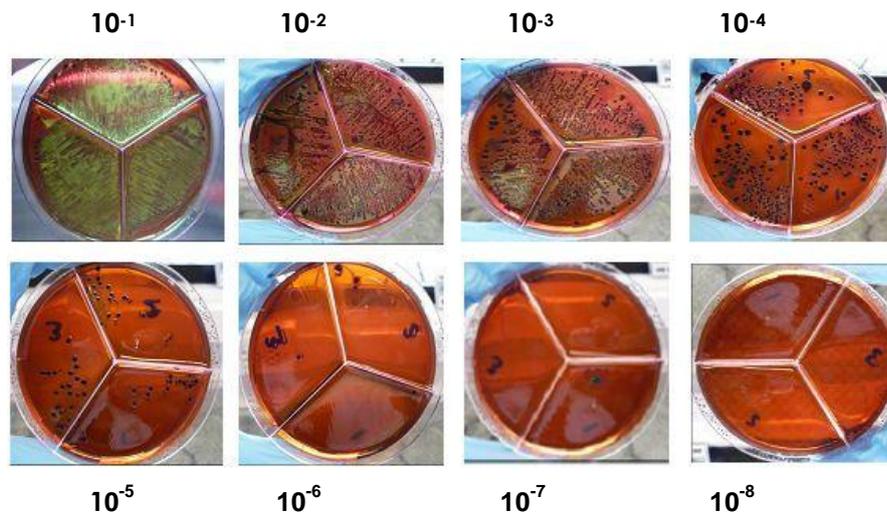


Figura 3.12 Recuento en placa de UFC para Gram negativas. Se realizaron diluciones seriadas a partir de un cultivo puro de *Escherichia coli* y se sembró en agar EMB. Posteriormente se extrajo el ADN genómico bacteriano el cual se utilizó en el ensayo de sensibilidad analítica.

Cuadro 3.2 Cálculo de UFC/ml a partir del recuento de colonias de *E.coli*. Cada dilución se sembró por triplicado. La cantidad de inóculo fue de 0.01mL.

Repetición	Dilución							
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
1	NC	NC	NC	133	17	1	1	0
2	NC	NC	NC	120	22	2	0	0
3	NC	NC	NC	131	19	2	0	0
Promedio colonias	-	-	-	128	19.3	1.6	0.3	0
UFC/ml	-	-	-	1x10 ⁴	1x10 ³	1x10 ²	3x10 ¹	1x10 ⁰

NC: No contable

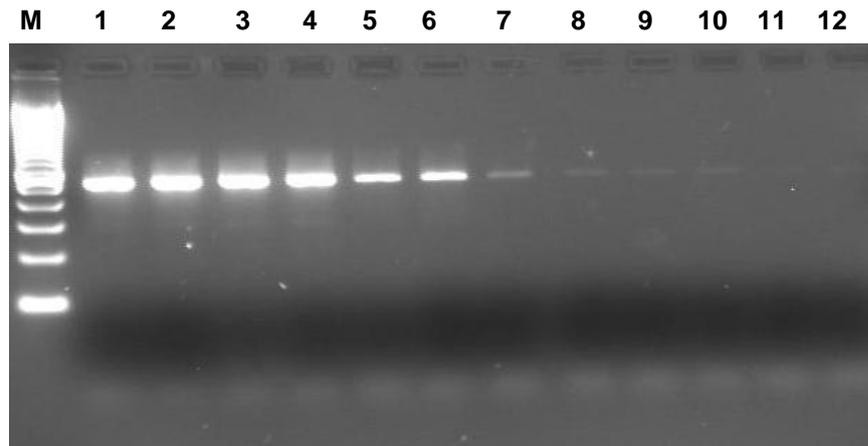


Figura 3.13 Sensibilidad analítica medida en UFC/mL del sistema sin tratamiento de 8-MOP para Gram negativas. Se utilizó ADN de *E.coli*. Carriles 1-2, Dilución 10^{-3} ; 3-4, 1×10^4 UFC/mL; 5-6, 1×10^3 UFC/mL; 7-8, 1×10^2 UFC/mL ; 9-10, 3×10^1 UFC/mL ; 11-12, Control negativo; M, marcador de 100pb. Se observó una sensibilidad analítica de 3×10^1 UFC/ml.

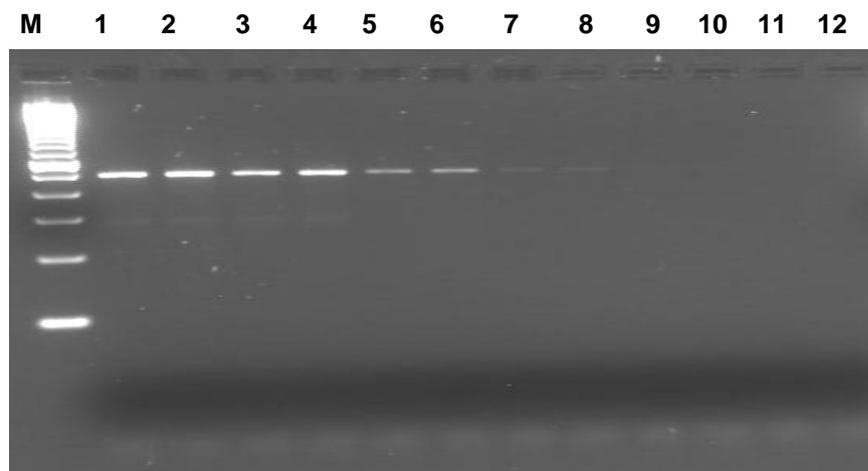


Figura 3.14 Efecto del tratamiento combinado 8-MOP + UV 3 min en la sensibilidad analítica del sistema medido en UFC/ml para Gram negativas. Se adicionó el ADN de *E.coli* después de tratamiento. Carriles 1-2, Dilución 10^{-3} ; 3-4, 1×10^4 UFC/mL ; 5-6, 1×10^3 UFC/mL ; 7-8, 1×10^2 UFC/mL ; 9-10, 3×10^1 UFC/mL ; 11-12, Control negativo; M, marcador de 100pb. Se observó una sensibilidad de 1×10^2 UFC/mL.

3.6.2 Sensibilidad analítica medida en UFC/mL para bacterias Gram positivas

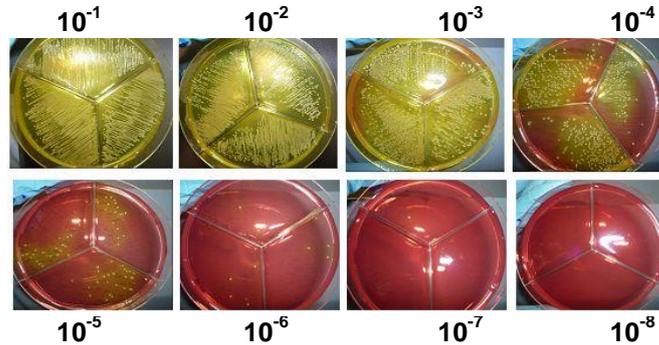


Figura 3.15. Recuento en placa de UFC para bacterias Gram positivas. Se realizaron diluciones seriadas a partir de un cultivo puro de *Staphylococcus aureus* y se sembraron en agar Mannitol. Posteriormente se extrajo el ADN bacteriano.

Cuadro 3.2 Cálculo de la UFC/ml a partir del recuento de colonias de *S. aureus*.

Repetición	Dilución							
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
1	NC	NC	NC	170	18	2	1	0
2	NC	NC	NC	181	24	4	0	0
3	NC	NC	NC	199	26	3	0	0
Promedio	-	-	-	183	23	3	0.3	0
UFC/ml	-	-	-	1×10^4	2×10^3	3×10^2	3×10^1	1×10^0

NC: No contable

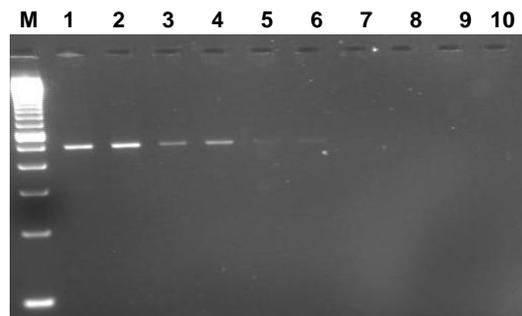


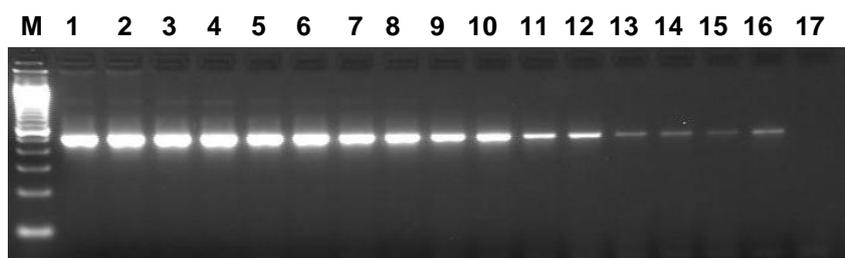
Figura 3.16 Efecto del tratamiento combinado 8-MOP + UV 3 min en la sensibilidad analítica del sistema medido en UFC/ml para Gram positivas. Se adicionó ADN de *S. aureus* después del tratamiento. Carriles 1-2, 1×10^4 UFC/mL ; 3-4, 2×10^3 UFC/mL ; 5-6, 3×10^2 UFC/mL ; 7-8, 3×10^1 UFC/mL ; 9-10, Control negativo; M, marcador de 100pb. Se observó que la sensibilidad analítica fue de 3×10^2 UFC/ml.

3.6.3 Sensibilidad analítica por concentración de ADN para bacterias Gram negativas

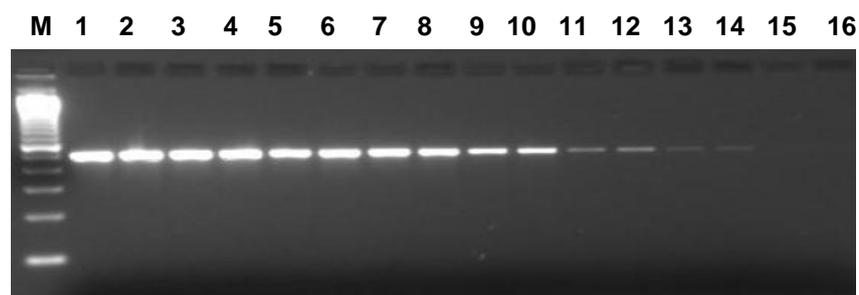
La sensibilidad analítica se midió realizando una PCR utilizando diluciones seriadas de un ADN genómico bacteriano de concentración conocida. Para bacterias Gram negativas se utilizó ADN de *E.coli*

Cuadro 3.3 Cuantificación de ADN de las diluciones seriadas de *E.coli*. Se midió por fluorometría. A partir de la cuarta dilución los valores fueron calculados.

Dilución	[c] ng/uL
Sin diluir	34
1:10	3.18
1:100	0.33
1:1000	0.045
1:10000	0.004
1: 100000	0.0004
1:1000000	0.00004
1:10000000	0.000004



(A)



(B)

Figura 3.17 Sensibilidad analítica por concentración de ADN para bacterias Gram negativas. (A) Sin tratamiento, (B) Con tratamiento de 8-MOP (25 ug/mL)+ UV 3 min. Carriles: 1-2, sin diluir; 3-4, dilución 1:10; 5-6, dilución 1:100; 7-8, dilución 1:1000; 9-10, dilución 1:10000; 11-12, dilución 1:100000; 13-14, dilución 1000000; 15-16 dilución 1:10000000; M, marcador 100pb.

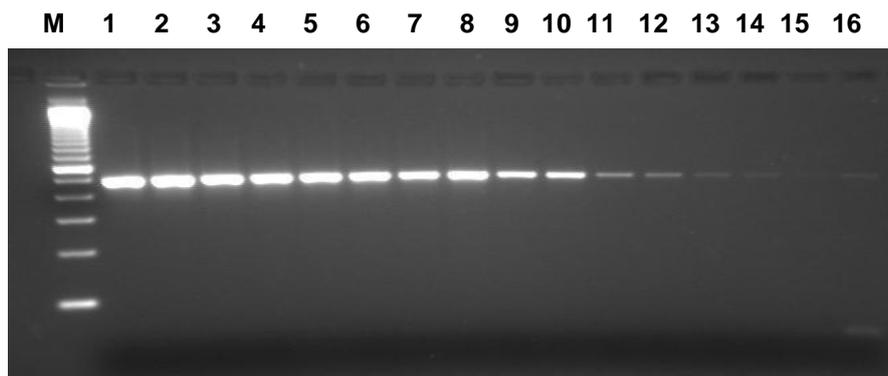


Figura 3.18 Efecto del tratamiento solo con UV 3 min en la sensibilidad analítica medida en concentración de ADN para bacterias Gram negativas. Se adicionó el ADN de *E.coli* post tratamiento. Carriles: 1-2, sin diluir; 3-4, dilución 1:10; 5-6, dilución 1:100; 7-8, dilución 1:1000; 9-10, dilución 1:10000; 11-12, dilución 1:100000; 13-14, dilución 1000000; 15-16 dilución 1:10⁶; M, marcador 100pb.

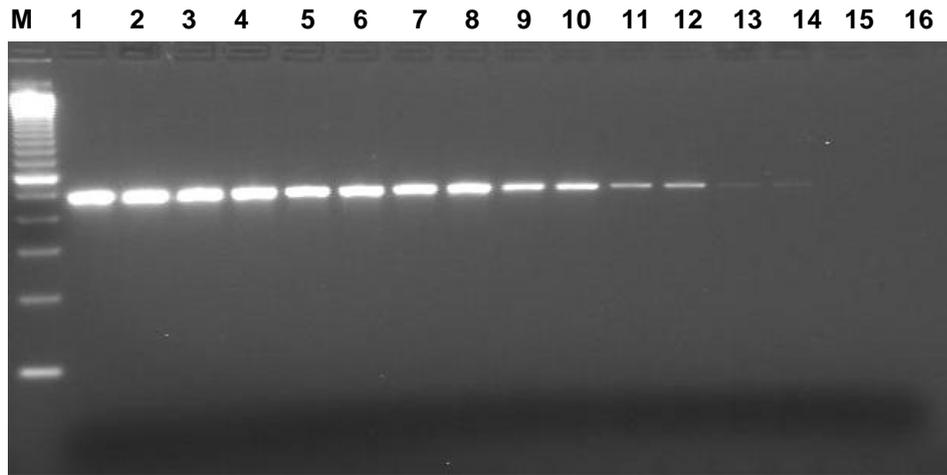
Se observó que para el sistema sin ningún tratamiento la sensibilidad fue menor de 0.004 pg/uL. Para el sistema al que se aplicó un tratamiento de UV 3 minutos, la sensibilidad fue de 0.004 pg/uL. Para el sistema con el tratamiento combinado 8-MOP + 3 min de UV, la sensibilidad disminuyó a 0.04 pg/uL.

3.6.4 Sensibilidad analítica por concentración de ADN para bacterias tipo Gram positivas

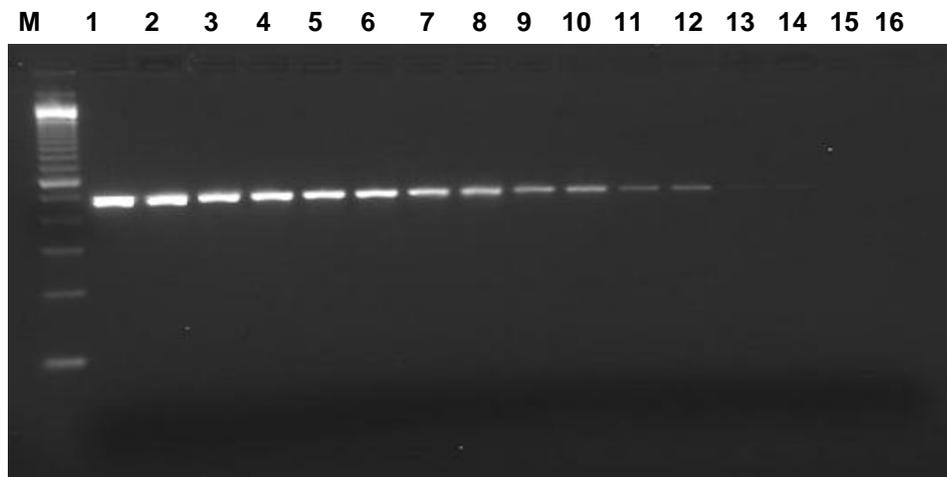
La sensibilidad analítica en bacterias Gram positivas se midió con un ADN purificado a partir de un cultivo puro de *S. aureus*. Se realizó un ensayo sin tratamiento y otro con el tratamiento combinado 8-MOP (25ug/mL) + UV 3 min.

Cuadro 3.4 Cuantificación de ADN de las diluciones seriadas de *S.aureus*. Se midió por fluorometría. A partir de la cuarta dilución los valores fueron calculados.

Dilución	[c] ng/uL
Sin diluir	36
1:10	8.62
1:100	0.79
1:1000	0.083
1:10000	0.008
1: 100000	0.0008
1:1000000	0.00008
1:10000000	0.000008



(A)



(B)

Figura 3.19 Sensibilidad analítica medida en concentración de ADN para bacterias Gram positivas. Se utilizó ADN de *S. aureus*. (A) Sin tratamiento, (B) Con tratamiento de 8-MOP (25 ug/mL)+ UV 3 min. Carriles: 1-2, sin diluir; 3-4, dilución 1:10; 5-6, dilución 1:100; 7-8, dilución 1:1000; 9-10, dilución 1:10000; 11-12, dilución 1:100000; 13-14, dilución 1000000; 15-16 dilución 1:10000000; M, marcador 100pb.

Se observó que para el sistema sin ningún tratamiento la sensibilidad fue de 0.08 pg/uL. Para el sistema con el tratamiento combinado 8-MOP + 3 min de UV, la sensibilidad cambió a 0.8 pg/uL.

3.7 Descontaminación de enzimas líticas

Se descontaminaron las enzimas líticas lisozima, lisostafina y liticasa que son utilizadas para la extracción de ADN genómico bacteriano. Para ello se utilizó un tratamiento combinado de 8-MOP + UV a 256 nm durante 30 minutos sobre cada solución enzimática. Para comprobar si se dio lugar a una descontaminación apropiada, se realizó una PCR 16S rDNA comparando los controles negativos de la extracción con tratamiento y sin él.

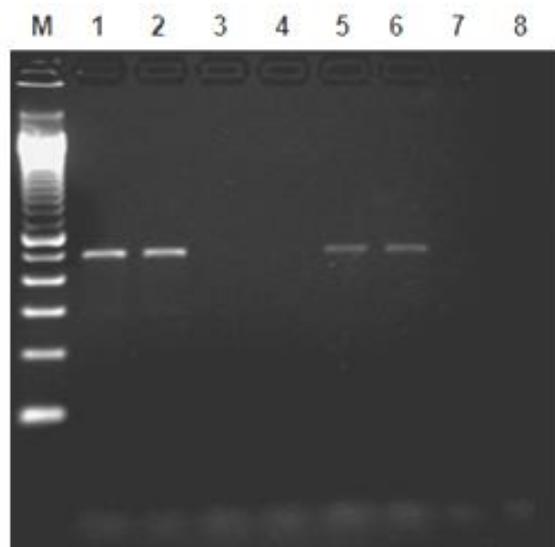


Figura 3.20 Descontaminación enzimas líticas. Carriles: 1-2, controles negativos extracción sin tratamiento; 3-4, controles negativos extracción sin enzimas líticas; 5-6, controles negativos extracción con tratamiento de 8-MOP + UV 30 min; 7-8 controles negativos de la PCR descontaminada, M, marcador 100pb.

3.8 Pruebas del sistema PCR 16S rDNA - RFLPs optimizado

Finalmente se llevó a cabo una prueba de todo el sistema optimizado y descontaminado con un tratamiento combinado de 8-MOP + UV. En la extracción de ADN genómico bacteriano se trató las enzimas líticas y en la PCR se trató el master mix. Para el ensayo de RFLPs se optimizó la concentración de enzima de restricción y el tiempo de incubación.

M 1 2 3 4 5 6

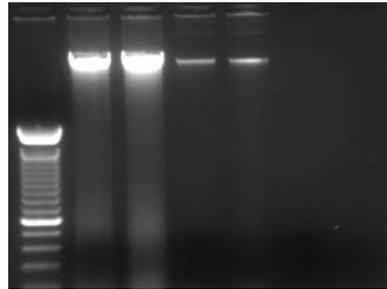


Figura 3.21 Extracción de ADN genómico bacteriano con enzimas líticas tratadas con 8-MOP+ UV 30min. Carriles: 1-2 *E.coli*; 3-4, *S. aureus*; 5-6, Control negativo; M, marcador peso molecular.

1 2 3 4 M 5 6 7 8

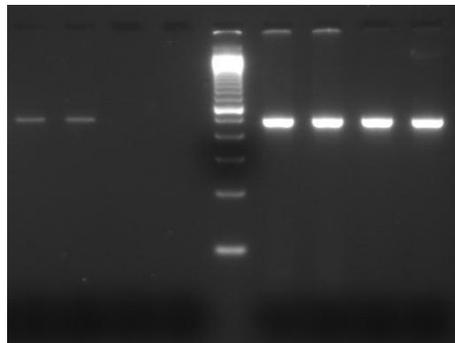


Figura 3.22 PCR descontaminada con 8-MOP + UV 3 min de ADN bacteriano extraído con enzimas líticas tratadas. Carriles: 1-2, Control negativo extracción; 3-4, Control negativo PCR; 5-6, *E.coli*; 7-8, *S. aureus*; M, marcador 100 pb.

1 2 3 M 4 5 6 M 7 8 9

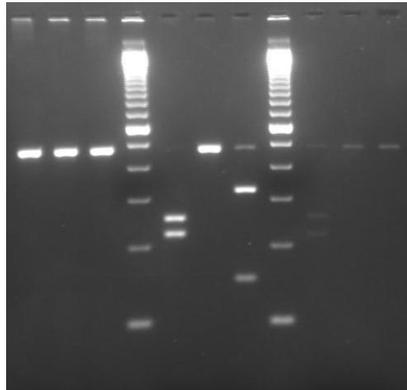


Figura 3.23 Ensayo RFLPs optimizado. Se utilizó 1.5U de enzima y un tiempo de incubación de 12 horas. Cada muestra fue digerida con tres enzimas *AccIII*, *Csp451* y *KpnI* respectivamente. Carriles: 1-2-3 *E.coli*; 4-5-6 *S.aureus*; 7-8-9 Control negativo extracción; M, marcador 100 pb.

3.9 Procesamiento de muestras clínicas provenientes del Hospital de Niños Baca Ortiz

Se procesaron 17 muestras obtenidas a partir de pacientes con sospecha de infección quirúrgica. Estas consistieron en muestras de tejidos, hisopados y secreciones. Una vez receptadas, se procedió a la extracción de ADN genómico de cada muestra y se cuantificó el mismo por fluorimetría. Posteriormente, se amplificó un fragmento de 467 pb del gen 16S rDNA por PCR. Finalmente se identificó el patógeno a nivel de género mediante un ensayo de RFLP.

3.9.1 Muestras clínicas

Los datos correspondientes a las muestras clínicas fueron organizados en formularios que permitieron organizar y registrar la información (Anexo D). De igual manera, los resultados obtenidos mediante el diagnóstico molecular fueron presentados en una hoja de reporte estandarizada (Anexo E).

Cuadro 3.5 Datos correspondientes a las muestras clínicas

Muestra No.	Tipo
01	Tejido de herida quirúrgica apendicitis
02	Hisopado de herida quirúrgica
03	Secreción herida quirúrgica
04	Tejido de herida quirúrgica apendicitis
05	Secreción circuncisión infectada
06	Secreción de herida quirúrgica
07	Secreción apendicitis aguda
08	Secreción herida quirúrgica
09	Secreción laparotomía múltiple
10	Hisopado Peritonitis
11	Tejido de herida por perforación intestinal
12	Secreción apendicetomía
13	Secreción hemática (no especificada)
14	Hisopado (no especificado)
15	Secreción de líquido Purulento
16	Secreción de líquido Purulento
17	Hisopado (no especificado)

3.9.2 Extracción de ADN y cuantificación de muestras clínicas

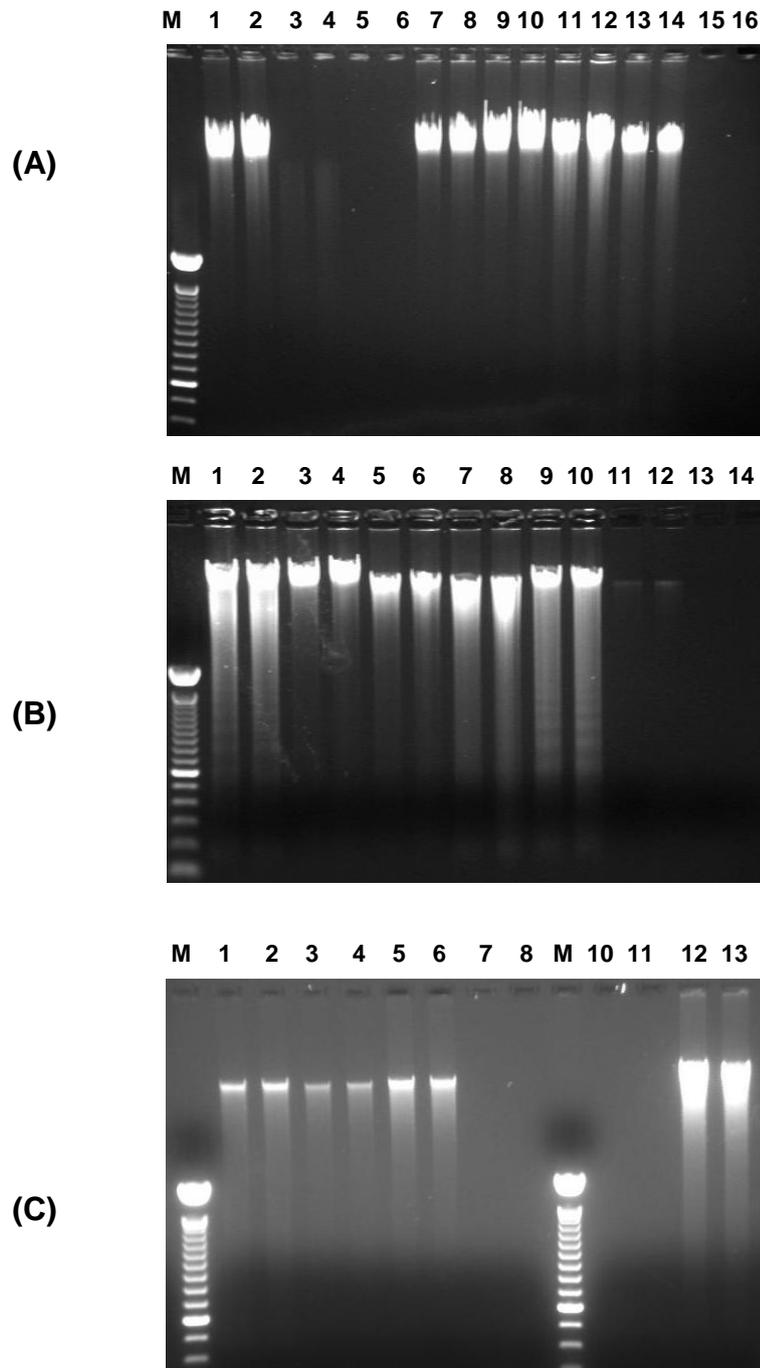


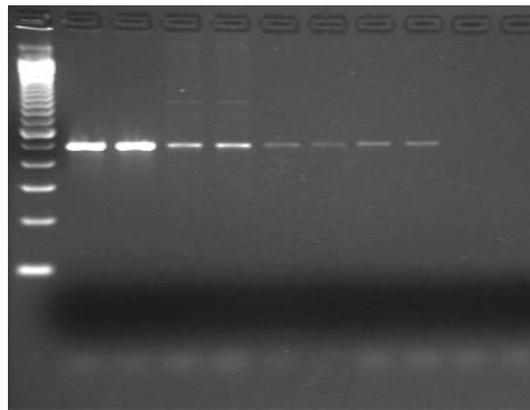
Figura 3.24 Extracción de ADN genómico a partir de muestras clínicas. **(A)** Carriles: 1-2, Muestra 01; 3-4, Muestra 02; 5-6, Muestra 03; 7-8, Muestra 04; 9-10, Muestra 05; 11-12, Muestra 06; 13-14 Muestra 07; 15-16 Controles negativos. **(B)** Carriles: 1-2, Muestra 08; 3-4, Muestra 09; 5-6, Muestra 10; 7-8, Muestra 11; 9-10, Muestra 12; 11-12, Muestra 13; 13-14 Controles negativos **(C)** Carriles: 1-2, Muestra 14; 3-4, Muestra 15; 5-6, Muestra 16; 7-8-10-11, Controles negativos; 12-13 Muestra 17; M, marcador de peso molecular.

Cuadro 3.6 Cuantificación de ADN de las muestras clínicas por fluorometría

Muestra No.	Concentración ADN ng/uL
01	116,67
02	4,74
03	0,31
04	104,67
05	95,13
06	55,73
07	111,33
08	120,00
09	105,33
10	47,20
11	109,33
12	120,00
13	2,58
14	50,32
15	47,2
16	62,0
17	110,1

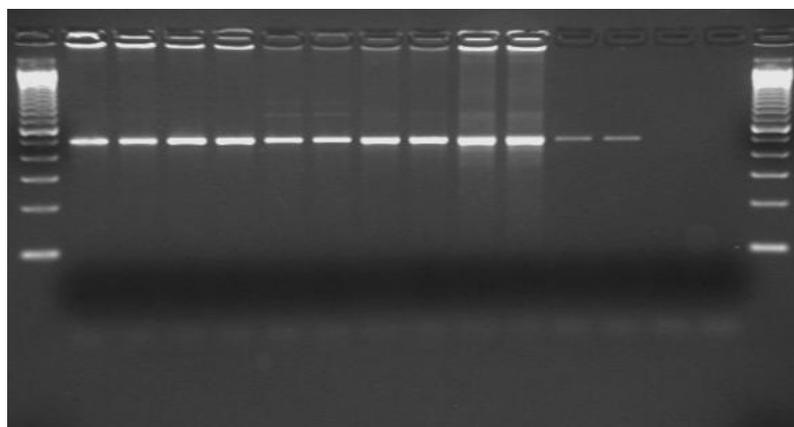
3.9.3 PCR 16S rDNA de las muestras clínicas

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



(A)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M



(B)

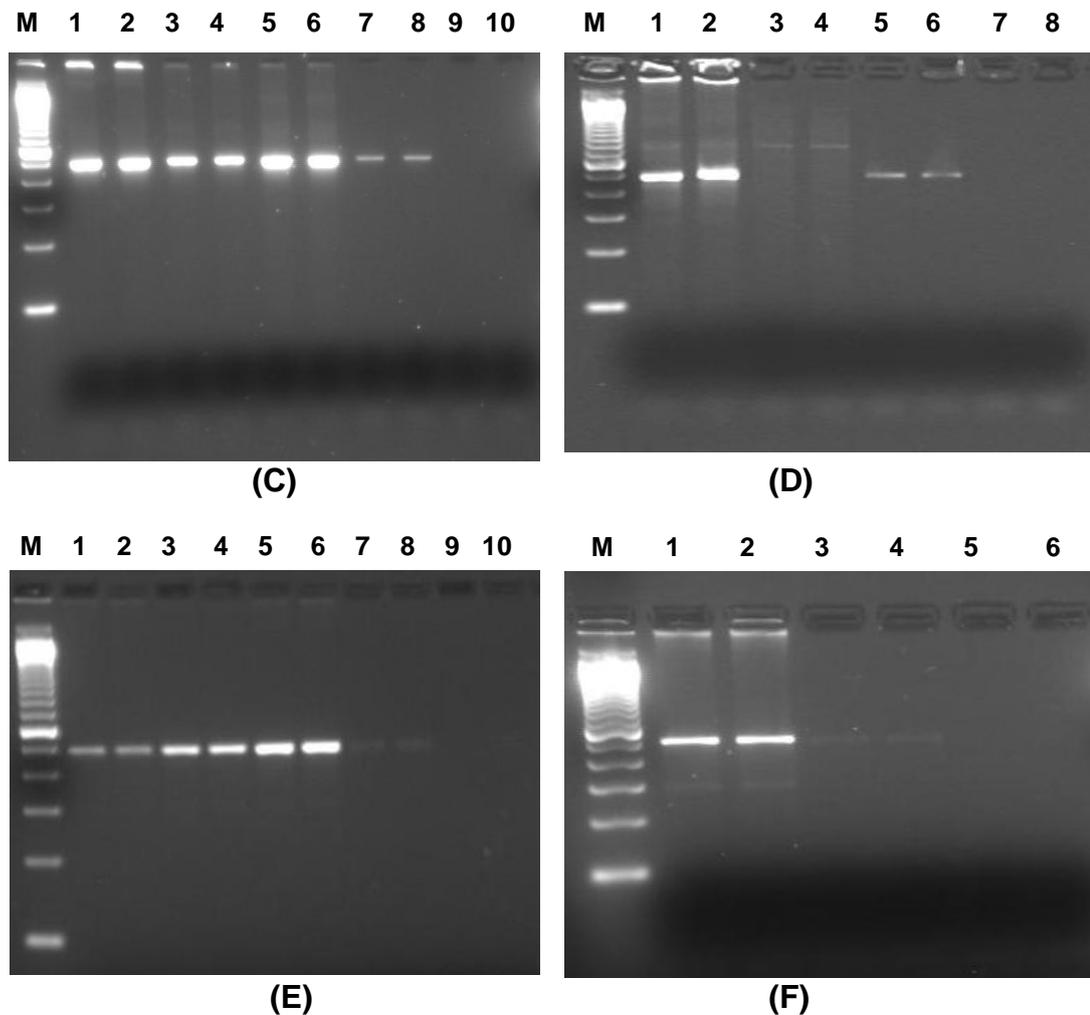


Figura 3.25 Aplicación clínica del sistema PCR 16S rDNA. Se purificó ADN a partir de muestras clínicas. El sistema fue descontaminado con 8-MOP (25ug/mL) + 3 min UV 256nm.

(A) Carriles: 1-2, muestra 01; 3-4, muestra 02; 5-6, muestra 03; 7-8, Control negativo extracción; 9-10, control negativo PCR; M, marcador 100pb.

(B) Carriles: 1-2, muestra 04; 3-4, muestra 05; 5-6, muestra 06; 7-8, muestra 07; 9-10, muestra 08; 11-12, control negativo extracción; 13-14 control negativo PCR; M, marcador 100pb.

(C) Carriles: 1-2, muestra 09; 3-4, muestra 10; 5-6, muestra 11; 7-8 control negativo extracción; 9-10, control negativo PCR; M, marcador 100pb.

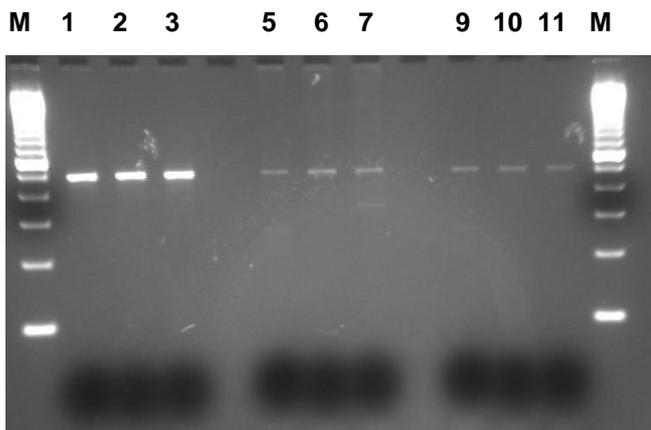
(D) Carriles: 1-2, muestra 12; 3-4, muestra 13; 5-6, control negativo extracción; 7-8, control negativo PCR; M, marcador 100pb.

(E) Carriles: 1-2, muestra 14; 3-4, muestra 15; 5-6, muestra 16; 7-8, control negativo extracción; 9-10, control negativo PCR; M, marcador 100pb

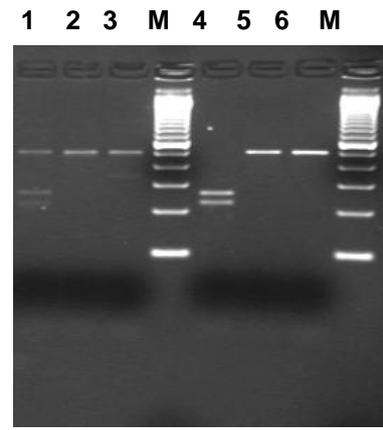
(F) Carriles: 1-2, muestra 17; 3-4, control negativo extracción; 5-6, control negativo PCR; M, marcador 100pb

3.9.4 Análisis de RFLPs de las muestras clínicas

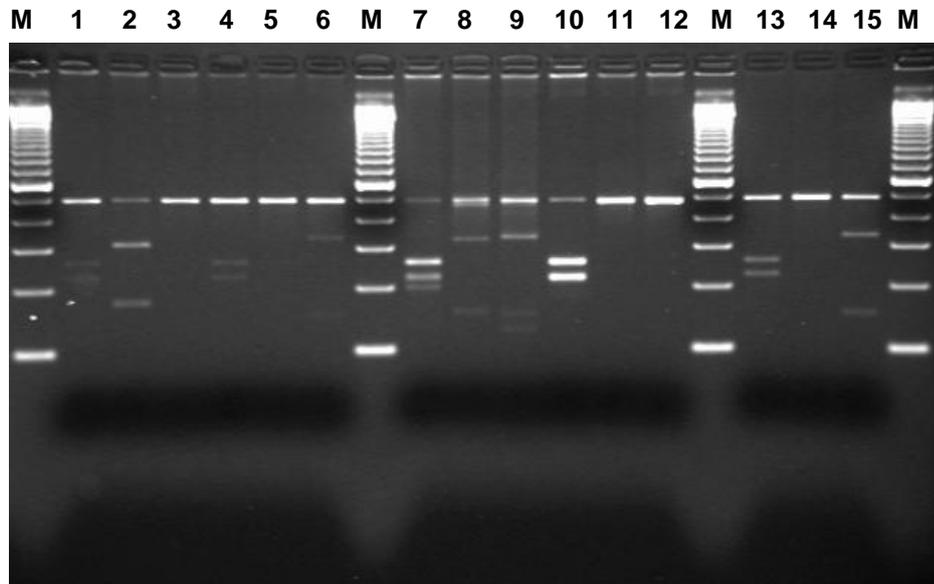
Una vez realizada la amplificación del fragmento de 467pb del gen 16S rDNA se procedió a la identificación del patógeno a nivel de género para lo cual se aplicó la técnica de RFLPs (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), en aquellas muestras que presentaron una banda correspondiente al fragmento específico 16S.



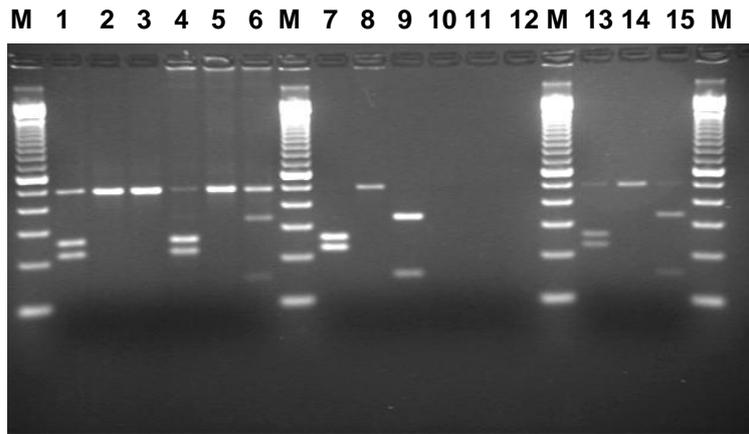
(A)



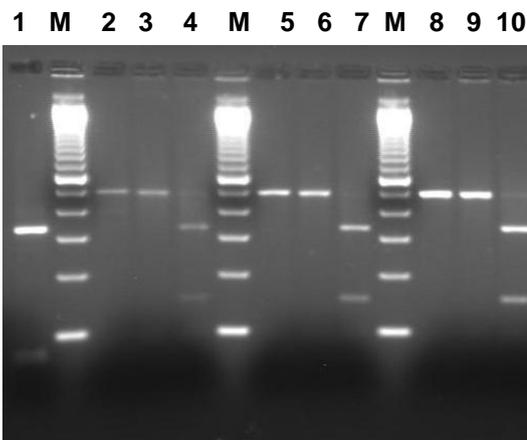
(B)



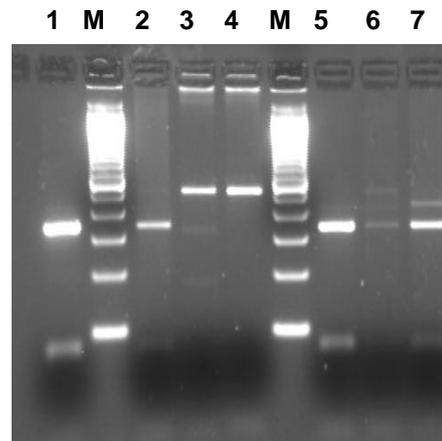
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 3.26 RFLPs a partir del producto de PCR de las muestras clínicas. Cada muestra fue digerida con tres enzimas: *AccIII*, *Csp451* y *KpnI* respectivamente.

(A) Carriles: 1-2-3, muestra 01; 5-6-7, muestra 02; 9-10-11, muestra 03; M, marcador 100 pb.

(B) Carriles: 1-2-3, muestra 04; 4-5-6, muestra 05; M, marcador 100pb.

(C) Carriles: 1-2-3, muestra 06; 4-5-6, muestra 07; 7-8-9, muestra 08; 10-11-12, muestra 09; 13-14-15, muestra 10; M, marcador 100pb.

(D) Carriles: 1-2-3, muestra 11; 4-5-6 muestra 12; 7-8-9 Control positivo *S. aureus*; 10-11-12, Control negativo PCR; 13-14-15, Control negativo extracción; M, marcador 100pb.

(E) Se sustituyó la enzima *AccIII* por la enzima *HaeIII*. Carriles: 1, Control positivo *E.coli*; 2-3-4, muestra 14; 5-6-7, muestra 15; 8-9-10, muestra 16; M, marcador 100pb.

(F) Carriles: 1, Control positivo *E.coli*; 2-3-4, muestra 17 enzimas *HaeIII*, *Csp451*, *KpnI* respectivamente; 5, muestra 01 *HaeIII*; 6, muestra 02 *HaeIII*; 7, muestra 07 *HaeIII*; M, marcador 100pb.

Una vez obtenidos los resultados del análisis de RFLPs, se comparó con los resultados obtenidos por técnicas microbiológicas (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7 Resultados del diagnóstico molecular mediante PCR-RFLPs de muestras con sospecha de infección quirúrgica vs. el resultado microbiológico.

Muestra No.	Presencia de infección ¹	RESULTADO MOLECULAR (PCR-RFLPs)	RESULTADO MICROBIOLÓGICO (Cultivo bacteriano)
01	+	Gram negativa: <i>E.coli</i>	S/D
02	+	Gram negativa: <i>E.coli</i> o <i>Pseudomonas</i>	Gram negativa: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
03	+	Gram negativa: <i>E.coli</i> o <i>Pseudomonas</i>	Gram Negativa: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
04	+	Gram positivas: <i>Staphylococcus spp.</i> Gram negativas: <i>E.coli</i>	S/D
05	+	Gram positivas: <i>Streptococcus spp.</i> ó <i>Enterococcus spp.</i>	S/D
06	+	Polimicrobiana. Gram Positivas: <i>Streptococcus spp.</i> ó <i>Enterococcus spp.</i> Gram negativas: <i>Enterobacter</i> ó <i>Klebsiella spp.</i>	Polimorfonucleares no bacterias
07	+	Gram positiva: <i>Staphylococcus spp.</i> Gram negativa: <i>Escherichia coli</i>	Gram negativa: <i>Klebsiella oxytoca</i>
08	+	Polimicrobiana. Gram positivas: <i>Staphylococcus spp.</i> Gram negativas: <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> ó <i>Klebsiella spp.</i>	Gram negativa: <i>Escherichia coli</i>
09	+	Gram negativa: <i>E.coli</i> ó <i>Pseudomona</i> Gram positiva: <i>Streptococcus spp.</i> ó <i>Enterococcus spp.</i>	<i>Pseudomona</i> <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo

Muestra No.	Presencia de infección ¹	RESULTADO MOLECULAR (PCR-RFLPs)	RESULTADO MICROBIOLÓGICO (Cultivo bacteriano)
10	+	Gram positiva: <i>Staphylococcus spp.</i> Gram negativa: <i>Escherichia coli</i>	S/D
11	+	Gram positiva: <i>Streptococcus spp.</i> ó <i>Enterococcus spp.</i>	S/D
12	+	Gram positiva: <i>Staphylococcus spp.</i> Gram negativa: <i>Escherichia coli</i>	S/D
13	-		S/D
14	+	Gram positiva: <i>Staphylococcus spp.</i>	S/D
15	+	Gram positiva: <i>Staphylococcus spp.</i>	Gram positiva: <i>Staphylococcus aureus</i>
16	+	Gram positiva: <i>Staphylococcus spp.</i>	S/D
17	+	Gram negativa: <i>E.coli</i>	S/D
CE*	contaminado	Gram positiva. <i>Staphylococcus spp.</i>	-

¹ Amplificación de una banda de 467 pb mediante PCR 16S rDNA

*Control negativo extracción

S/D: Sin datos

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El objetivo principal de la presente tesis fue el desarrollo de un método molecular rápido y sensible que permita detectar e identificar patógenos bacterianos en muestras de pacientes pediátricos con sospecha de infección quirúrgica.

Los actuales métodos para diagnosticar infecciones quirúrgicas se basan en técnicas microbiológicas que pueden tardar días o semanas en generar resultados. Las técnicas moleculares, en especial la PCR, superan esta barrera al ser consideradas técnicas sensibles y rápidas.

La aplicación de un sistema que combine PCR y RFLP fue la opción elegida para alcanzar los objetivos propuestos. La investigación se dividió en dos etapas: la primera que consistió en la optimización de todo el sistema y la segunda en el procesamiento de muestras clínicas.

La primera técnica optimizada fue el aislamiento y purificación de ADN. Se buscaba que el método permita la extracción de ADN genómico bacteriano a partir de muestras clínicas como tejidos, secreciones e hisopados. Con este propósito se utilizó el kit de extracción Qiaamp DNA Mini (Qiagen, USA). Sin embargo, el protocolo propuesto por el fabricante favorecía la extracción de ADN genómico humano sobre el bacteriano. Por ello fue necesario modificarlo añadiendo enzimas líticas que permitan romper las paredes bacterianas exponiendo el ADN bacteriano a la purificación.

Antes de la optimización de los métodos de PCR y RFLP, se requirió la consecución de controles positivos. Estos fueron necesarios para estandarizar los ensayos en las mejores condiciones técnicas. Además que permitieron controlar regularmente la eficiencia del sistema. Para ello se eligieron cepas bacterianas de cuatro especies comúnmente encontradas en infecciones nosocomiales y se procedió a extraer su ADN genómico. Las bacterias elegidas fueron *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus*

milleri (Figura 3.1). Una vez obtenido un ADN concentrado e íntegro se procedió a implementar la PCR

La PCR utilizada se basó en un ensayo universal de amplio espectro propuesto originalmente por Warwick et.al, 2003 y modificado por Izquierdo, 2007. Para ello se utilizó un par de primers universales derivados de una región altamente conservada del gen 16S rDNA, conocidos por su capacidad de amplificar un producto de 467pb procedente de cualquier especie bacteriana.

Para llevar a cabo la PCR, se hicieron pruebas preliminares utilizando el protocolo propuesto por Izquierdo, 2007. Sin embargo, éste presentaba problemas de presencia de productos inespecíficos y contaminación de los controles negativos. Se analizaron las condiciones del ensayo y se determinó que era necesario optimizarlo.

Se modificaron parámetros como concentración de $MgCl_2$, temperatura de hibridación y número de ciclos que, en el ensayo preliminar, correspondían a 2,5mM, 60°C y 40 respectivamente. Estas condiciones no eran adecuadas ya que probablemente permitían que el ensayo alcance la fase de “plateau” o meseta, donde los reactivos se agotan y la eficiencia del sistema decae. Esta fase siempre debe ser evitada ya que aumenta la posibilidad de obtención de productos inespecíficos (Surzycki, 2000).

Una forma de evitar este problema fue eligiendo correctamente el número de ciclos. Se disminuyó a 30 los ciclos de hibridación y extensión, y se favoreció la especificidad del sistema disminuyendo la concentración de $MgCl_2$ a 1.5mM. Con estas condiciones se procedió a determinar la mejor temperatura de hibridación.

Para ello se analizaron las T_m de los primers mediante el programa Primer-Blast (Nacional Center for Biotechnology Information, 2009) el mismo que proporcionó datos sobre la temperatura de hibridación para el primer Nf y Nr siendo de 60,73 y 61,11 respectivamente. Se procedió a realizar un ensayo

de gradiente de temperaturas, la cual reportó que la temperatura de hibridación óptima era a 62°C (Figura 3.5).

También se optó por añadir adyuvantes a la reacción de PCR. Estos aditivos mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Los más reportados son BSA, glicerol y DMSO. Se escogió el glicerol al 5% ya que mejoró la estabilidad de la reacción (Figura 3.6). Se piensa que el glicerol incrementa la estabilidad térmica de la polimerasa y disminuye la temperatura de denaturación lo que mejora la hibridación de los primers. (Cheng, Fockler, Barnes & Higuchi, 1994).

Estas condiciones mejoradas permitieron la amplificación del fragmento deseado de 467pb, con una disminución significativa de la presencia de productos inespecíficos, pero no se logró eliminar la contaminación en los controles negativos. Se considera que la contaminación en la PCR es una de las mayores limitaciones cuando se utilizan primers universales.

Según varios autores (Meier et.al, 2007; Rand & Houck, 1990), frecuentemente esta contaminación proviene de la Taq polimerasa y otros reactivos de origen biológico. La incidencia de falsos positivos que pueden producirse a partir de estas fuentes de contaminación, son un obstáculo para el diagnóstico de infecciones. Sin embargo varios métodos pueden utilizarse con la finalidad de descontaminar la reacción. En la presente investigación, se planteó la descontaminación por medio del tratamiento químico con 8-methoxypsoraleno.

Los psoralenos son compuestos que se intercalan en la doble cadena del ADN y forman enlaces covalentes entre las bases de pirimidina. Este entrecruzamiento impide la replicación del ADN. Sin embargo, para que la reacción tenga lugar, se necesita de una fotoactivación con luz UV. Se ha reportado que la longitud de onda óptima para la interacción 8-MOP-ADN está entre 320-400nm (Jinno, Yoshiura & Niikawa, 1990). Sin embargo en la presente investigación se trabajó con menores longitudes de onda correspondientes a luz UVC (200-280nm).

La concentración de 8-MOP (25ug/ml) que se añadió a la reacción de PCR, fue descrita por Meier et.al como la recomendada para no perjudicar la actividad de la polimerasa. La acción del 8-MOP se dio en dos etapas, una incubación en oscuridad y otra en exposición a UV. El tiempo de incubación se estableció en 30 minutos.

Para determinar el tiempo de exposición, se realizó un ensayo de PCR con controles positivos y negativos. Se trató el master mix con 8-MOP y se irradió con luz UV 256nm durante 1 a 4 minutos mediante un crosslinker. Los controles se añadieron post tratamiento.

Se observó que a los 3 minutos de irradiación la contaminación de los controles negativos se eliminaba en su totalidad. Sin embargo a tiempos mayores de 4 minutos ya no se observó amplificación del control positivo (Figuras 3.8 y 3.9). A los 3 minutos, también se observó una notoria disminución en la eficiencia de la amplificación. No obstante, para comprobar cuán afectada se vio la reacción, fue necesaria la realización de ensayos de sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica se midió tanto en UFC/ml como en concentración de ADN. Sin embargo, por lo general se prefiere expresar los resultados en UFC/ml debido a que el número de copias del gen 16S rDNA varía de 1 a 15 entre especies bacterianas, por lo que al medirla de esta forma, se logra estandarizar los resultados.

Se compararon los resultados de sensibilidad analítica obtenidas sin tratamiento y con tratamiento. Medido en UFC, el límite de detección para el ensayo descontaminado fue 100 UFC/ml, mientras que sin el tratamiento, el ensayo detectó <30 UFC/ml. Se observó una disminución de aproximadamente 10 veces en la amplificación. Este resultado fue razonable considerando que se sospecha de una infección cuando ésta supera los 1.000-100.000 UFC/ml dependiendo de la muestra (Ruza, 2003).

Para determinar si el tratamiento combinado fue el que afectó la sensibilidad analítica, se diseñó un ensayo comparando los resultados de la PCR: 1) sin tratamiento, 2) con tratamiento solo de UV 3min y 3) con el tratamiento combinado 8-MOP + UV 3 minutos. La sensibilidad se midió en concentración de ADN (ng/uL).

La primera observación fue que los resultados variaron dependiendo de la especie bacteriana elegida. Siendo así que los resultados con ADN de *E.coli* fueron: 0,004pg/uL sin tratar; 0,004pg/uL solo UV y 0,04pg/uL con el tratamiento combinado. Mientras con ADN de *S. aureus* disminuyeron a 0,08pg/uL sin tratamiento y 0,8pg/uL con tratamiento combinado. Las diferencias observadas entre *E.coli* y *S.aureus* pueden ser explicadas por el hecho de que el número de copias del gen 16S rDNA en cada uno es diferentes, siendo de 7 y 5 respectivamente ((Klappenbach *et.al*, 2000).

Los resultados indicaron que el tratamiento combinado disminuye la sensibilidad del sistema 10 veces más que solo con el tratamiento de UV 3min. Sin embargo, esta disminución en la amplificación se consideró tolerable. Es importante recalcar que el límite en promedio se encuentra entre los 500 fg/uL de ADN, lo que hace de la PCR 16S rDNA un ensayo de excelente sensibilidad.

También se evaluó el efecto del tratamiento de 8-MOP + UV 3min, sobre el ADN contaminante. Para este propósito, se añadieron diferentes concentraciones de ADN de *S. aureus* antes del tratamiento y se lo comparó con un ensayo al que solo se lo trató con UV. Los resultados de las figuras 3.9 y 3.10 revelaron que el tratamiento combinado elimina 0,086ng/uL de ADN, mientras el tratamiento con UV elimina hasta 0,0086ng/uL. Es decir que el tratamiento con 8-MOP permite eliminar hasta 10 veces más que solo con UV.

Posterior a la descontaminación de la PCR, se procedió a descontaminar otros reactivos de origen biológico. Esto debido a que durante el estudio se identificó que las enzimas líticas utilizadas durante la extracción de ADN bacteriano, también eran posibles fuentes de contaminación similar a la Taq

polimerasa. En la Figura 3.20 se observó que el tratamiento disminuyó la contaminación pero no la eliminó.

La longitud de onda de 256nm utilizada no corresponde a la recomendada en el protocolo original, la cual es de 320-400nm. Además en el caso de las enzimas líticas, el tiempo de irradiación necesario fue de 30 minutos. Estudios realizados por Edelson y Gasparro, 2002, descubrieron que mientras más cortas sean las longitudes de onda de radiación UV, más degradación sufre el 8-MOP, y esto también es proporcional al tiempo de exposición. En el caso de la descontaminación de la PCR, el cambio en la longitud de onda no fue un impedimento, probablemente porque la contaminación no era muy severa y porque el tiempo de irradiación no supera los 3 minutos.

Una importante observación que cabe resaltar es que la solución de 8-MOP se prepara en el solvente DMSO (dimetilsulfóxido), el cual es comúnmente utilizado como adyuvante en la PCR. Esta condición probablemente mejoró la reacción siendo así que al concluir la optimización del a PCR 16S rDNA descontaminada, también se reportó una notable eliminación de los productos inespecíficos que el sistema aún presentaba.

Para terminar la primera etapa de la tesis, se optimizó el método de RFLPs. El protocolo utilizado fue propuesto por Izquierdo, 2007 en el diagnóstico de sepsis neonatal. Sin embargo se determinó que las enzimas de restricción elegidas también eran aplicables a la detección de infecciones quirúrgicas. No obstante fue necesario aumentar el algoritmo de referencia con otros géneros comunes a estas infecciones, para lo cual se buscó las secuencias en la base de datos GenBank (Nacional Center for Biotechnology Information, 2009) y se analizaron los patrones de restricción mediante la plataforma Biology Workbench 3.2 (San Diego Supercomputer Center, 2009).

Las modificaciones al protocolo original se enfocaron en la concentración de enzima y tiempo de incubación utilizados. Así, se aumentó la concentración de 2,5U a 15U de enzima/reacción en un volumen final de

reacción de 30uL. Este cambio se fundamentó en que un exceso de enzima asegura una digestión completa en el caso de existir impurezas en el ADN, una disminución de la actividad enzimática a causa del almacenamiento o errores de pipeteo (Surzycki, 2000).

Se aumentó también el tiempo de incubación de 3 a 15 horas. A pesar que el fabricante no recomienda un tiempo de incubación mayor a 4 horas, se comprobó que un incremento en el tiempo de incubación no afecta la actividad enzimática pero si asegura una digestión completa.

Una vez optimizado todo el sistema 16S rDNA PCR-RFLP, se dio lugar a la segunda fase de la investigación mediante la aplicación del sistema a 17 muestras clínicas con sospecha de infección quirúrgica. Los resultados se compararon con los obtenidos mediante técnicas microbiológicas. Durante la experimentación, se utilizó el método de doble ciego. Es decir que el laboratorio de biología molecular no tuvo ningún conocimiento sobre los resultados microbiológicos de la muestra ni el de microbiología conoció los resultados moleculares, sino hasta la culminación del trabajo. Esto permitió evitar que los resultados sean influenciados por el sesgo del operador.

Inmediatamente después de la recepción de las muestras, se procedió a extraer el ADN genómico bacteriano. En la figura 3.24B se observó que el ADN en muchos casos, en especial las muestras 08 y 09, no fue íntegro y se pudo distinguir una degradación del mismo. Sin embargo se presumió que esta degradación corresponde al ADN humano y no al bacteriano. Esto ocurre porque con el método de extracción utilizado, no es posible separarlos y son purificados juntos. Pero a pesar de esto, se demostró que el ADN humano no interfiere en la generación de resultados con el sistema propuesto.

No obstante se tomaron algunas consideraciones, en especial en cuanto a la concentración de ADN. En ninguno de los casos se diluyó el ADN obtenido, sin importar si los valores cuantificados eran muy elevados (Cuadro 3.6). Se tomó esta decisión tomando en cuenta que una muestra clínica puede presentar muy bajas cantidades de un agente infeccioso.

En algunas muestras como la 02, 03 y controles negativos (Figura 3.24C), no se observó presencia de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Pero a pesar de ello, sí se obtuvieron resultados mediante cuantificación por fluorometría. Más tarde en la PCR y RFLP, se comprobó que estas muestras sí dieron resultados positivos. Probablemente, no se observó una señal detectable en el gel al 0,8% debido a la baja concentración de ADN en estas muestras.

Prosiguiendo con la metodología, se continuó con la PCR 16S rDNA. En todos los casos se presencié la amplificación de una banda de 467pb correspondiente al gen 16S rDNA, excepto en la muestra 13. (Figura 3.25D). Según el criterio de positividad establecido, todas las muestras excepto la No.13, se consideraron positivas para una infección quirúrgica.

En conjunto con las muestras, tanto los controles negativos de la extracción como de la PCR, fueron amplificados mediante los primers universales para el gen 16S rDNA. En el caso de los controles negativos de la extracción sí hubo amplificación de un fragmento de 467pb, pero lo suficientemente leve como para reconocer si las muestras presentaban una infección o eran producto de contaminación. En el caso de los controles negativos de la PCR, éstos no amplificaron, por lo que una vez más se reiteró la exitosa descontaminación con 8-MOP + UV 3min.

En la amplificación de algunas muestras como en la No. 06, 08 y 13, se observó la presencia de productos inespecíficos. Estos pudieron ser consecuencia de la presencia de ADN humano u otras impurezas, sin embargo no fueron lo bastante intensos como para interferir en el proceso.

Con los amplicones obtenidos, se realizó el análisis de RFLPs mediante cortes con enzimas de restricción. Esta técnica consiguió generar fragmentos de diferentes tamaños que permitieron diferenciar entre géneros bacterianos. Los resultados obtenidos se presentaron en el cuadro 3.7.

Primero se identificó si el agente causal correspondía a bacterias Gram positivas o negativas. Cuatro muestras (No. 01, 02, 03, 17) presentaron el patrón que corresponde a bacterias Gram negativas. Mediante cortes con las enzimas Csp451 y HaeIII se pudo determinar que en todos los casos se trataba de *Escherichia coli*.

La mayor parte de muestras fueron diagnosticadas como Gram positivas. Tres se identificaron como *Staphylococcus spp.* (No. 14, 15 y 16), mientras cuatro se reportaron dentro del grupo de *enterococo/estreptococo* (05, 09 y 11), sin posibilidad de ser distinguidas entre ellas debido a que presentaban un patrón idéntico con las enzimas de restricción.

Seis muestras (No. 04, 06, 07, 08, 10, 12) presentaron un patrón de bandas confuso, pero que se presumió corresponderían a una infección polimicrobiana. Este tipo de infecciones son muy comunes, sin embargo la diferenciación entre géneros y especies bacterianas no es siempre posible mediante RFLPs ó secuenciación automática. En todos los casos, el patrón de bandas correspondió a bacterias tanto Gram positivas como negativas.

Por ejemplo, la muestra 08 pudo presentar bacterias de los géneros *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.* ó *Enterobacter spp.* En cambio, en las muestras 04, 07, 10 y 12, se observaron bandas que llevarían a pensar la presencia de los género *Staphylococcus spp.* y *Escherichia coli*. Sin embargo, en estos casos se dio prioridad a los microorganismos que puedan representar un mayor riesgo de infección y resistencia antibiótica, como lo es *Staphylococcus spp.*

Este tipo de muestras con presencia de distintos microorganismos son consideradas un nuevo reto para el diagnóstico molecular, ya que mediante metodologías como la propuesta en esta tesis, se dificulta la generación de resultados precisos.

Solo una de las muestras (No. 13) se reportó como negativa por lo que no se digirió con enzimas de restricción. La muestra era de tipo hemática por lo que se presumió que sus componentes pudieron interferir con la PCR.

De forma similar, se realizó el ensayo de RFLP para los controles negativos provenientes de la extracción de ADN bacteriano. En la figura 3.26D, se observó que el control negativo al ser cortado por la enzima *AccIII* y *KpnI* presenta un patrón de bandas correspondiente al género *Staphylococcus spp.* Estos datos son consecuentes con la idea de que dicha contaminación es originada por las enzimas líticas, en especial por la lisostafina (Sigma-Aldrich). Esta enzima en particular es sintetizada a partir de la bacteria *Staphylococcus staphylolyticus*.

La comparación entre los resultados obtenidos mediante PCR-RFLPs vs. cultivo bacteriano, permitió establecer el porcentaje de concordancia entre estas técnicas y la eficacia de las mismas. Sin embargo, cabe destacar que de las diecisiete muestras procesadas, solamente siete pudieron ser comparadas.

Mediante cultivo bacteriano se reportó que de las siete muestras, seis fueron positivas para infección y una fue negativa. Sin embargo la PCR detectó una señal positiva en todos estos casos. Esto indica una concordancia del 86% entre ambas técnicas. Por otro lado, la identificación mediante RFLPs no arrojó los resultados esperados en comparación con la técnica microbiológica, presentando una baja concordancia del 14%.

Con estos resultados, se determinó que los principales problemas fueron: 1) el bajo poder de discriminación de la técnica de RFLPs, 2) la dificultad de interpretar resultados en casos de infección polimicrobiana y 3) la imposibilidad de distinguir entre una verdadera infección ó una colonización.

La técnica de RFLPs puede presentar algunas limitaciones que no permiten alcanzar la identificación bacteriana de manera precisa. Una de ellas es el requerimiento de varias enzimas de restricción que permitan discriminar entre los genomas bacterianos. Debido a que las infecciones quirúrgicas

pueden ser producidas por una gran variedad de bacterias, no es posible incorporar al ensayo todas las enzimas requeridas para la identificación ya que esto aumentaría el costo del ensayo, además del tiempo y dificultad de generación de resultados.

Según Outeda, 2005, otra limitación de los RFLPs es que la búsqueda de polimorfismos en productos de PCR podría no ser metodológicamente efectiva al 100%, ya que muchos SNPs potenciales podrían no cambiar un sitio de restricción y por tanto no serían producidos los fragmentos de restricción esperados.

Una posible solución para el diagnóstico molecular de infecciones polimicrobianas sería el diseño de PCRs multiplex para los géneros bacterianos de mayor prevalencia en estos casos. Mientras que para distinguir entre infección y colonización se podría utilizar la PCR 16S rDNA pero en tiempo real, lo que permitiría disponer de criterios cuantitativos.

Con la metodología propuesta, el tiempo requerido para generar resultados se estimó en 24 horas. Los métodos convencionales pueden aislar el patógeno en el mismo período de tiempo pero necesitan 1 o 2 días adicionales para identificar el microorganismo.

No obstante, se debe considerar que las técnicas moleculares son un apoyo a las técnicas microbiológicas y no un reemplazo de las mismas. Un trabajo conjunto entre las dos, permitiría resolver las limitaciones y desventajas de cada una de ellas. Además es importante que al momento del diagnóstico se analicen todos los datos clínicos del paciente, ya que una infección por lo general conlleva signos y síntomas clínicos asociados a ella.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Se diseñó y optimizó con éxito un sistema de detección molecular de amplio espectro basado en la amplificación mediante PCR del gen 16S rDNA
2. La técnica de RFLPs propuesta presenta un bajo poder de discriminación dificultando una correcta identificación bacteriana.
3. El gen 16S rDNA es un excelente blanco de elección para la amplificación de ADN bacteriano mediante PCR, ya que es un componente común y que presenta regiones altamente conservadas en bacterias.
4. Los primers Nf y Nr elegidos para la PCR 16S rDNA permiten la amplificación de un fragmento de 467pb a partir de cualquier cepa bacteriana.
5. Debido a la característica universal de los primers, el sistema de PCR 16S rDNA es susceptible a contaminación y posible generación de resultados falsos positivos.
6. La principal fuente de contaminación surge de los reactivos obtenidos a partir de fuentes bacterianas, como las enzimas líticas utilizadas durante la extracción de ADN y la Taq DNA polimerasa necesaria en la PCR.
7. La descontaminación de la PCR 16S rDNA mediante un tratamiento combinado de 8-methoxypsoraleno (25ug/mL) + 3min de UV 256nm, es efectivo, eliminando completamente la contaminación del sistema.
8. Se determinó que con el tratamiento combinado de 8-MOP + 3min de UV 256nm se puede descontaminar hasta aprox. 0,08ng/uL de ADN

contaminante a diferencia del tratamiento solo con UV a 256nm por 3 min, que logra eliminar hasta 0,0086ng/uL de ADN.

9. La aplicación del tratamiento combinado de 8-MOP (25ug/uL) + 30 min UV 256nm para la descontaminación de las enzimas líticas, disminuye pero no elimina toda la contaminación.
10. Se concluye que la irradiación con luz UVC a 256nm si permite la fotoactivación del 8-MOP, sin embargo a tiempos de exposición prolongados, disminuye su efecto.
11. El tratamiento combinado de 8-MOP (25ug/mL) + 3 min UV 256nm reduce la sensibilidad analítica de la PCR 16S rDNA. El límite de detección del sistema sin tratamiento es <30 UFC/ml a diferencia del tratamiento combinado que detecta desde 100 UFC/ml.
12. El sistema PCR-RFLPs optimizado permite la detección de patógenos bacterianos a partir de muestras clínicas como tejidos, secreciones e hisopados sin embargo la identificación bacteriana no siempre es posible.
13. Los datos correspondientes a las muestras clínicas, pacientes, resultados microbiológicos y moleculares son procesados a través de un sistema de referencia que permite transmitir la información desde y hacia el hospital.
14. De las diecisiete muestras procesadas mediante el sistema propuesto, se identificaron cuatro con *Escherichia coli*, tres con *Staphylococcus spp.*, tres con *Streptococcus/Enterococcus spp.*, seis con infección polimicrobiana y una muestra negativa.
15. La identificación de las bacterias presentes en casos de sospecha de infección polimicrobiana no fue posible de manera precisa mediante la técnica molecular desarrollada.

16. Los resultados obtenidos mediante PCR 16S rDNA presentan una concordancia del 86% comparado con las técnicas microbiológicas para la detección de infección.
17. Los resultados obtenidos mediante RFLPs presentan una concordancia del 14% comparado con las técnicas microbiológicas para la identificación bacteriana.
18. Todo el ensayo desde la extracción de ADN, amplificación mediante PCR e identificación del patógeno mediante RFLPs, puede ser llevada a cabo en 24 horas.
19. Las técnicas moleculares son una herramienta de apoyo a las técnicas microbiológicas y no un reemplazo de las mismas. Un trabajo conjunto entre las dos, permite resolver las limitaciones y desventajas que cada una de ellas presenta.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Debido a que no fue posible la descontaminación total de las enzimas líticas con el tratamiento de 8-MOP (25ug/mL) + 3min UVC (200-280nm), se recomienda cambiar el espectro de irradiación a luz UVA (320-400nm) ó UVB (280-320). También se puede recurrir a otros métodos químicos como el tratamiento con DNAsa I, UDG ó enzimas de restricción.
- A pesar que la descontaminación de la PCR con 8-MOP fotoactivado a una longitud de onda UV de 256nm fue exitoso, se recomienda la utilización de UVA (320-400nm) para posteriores trabajos ya que esto permite asegurar que la eficiencia del psoraleno no se verá afectada por una posible degradación.
- Se recomienda prevenir la transferencia física de ADN entre distintas muestras ya que esto puede ser motivo de contaminación. Para ello es necesario tomar las precauciones pertinentes como usar guantes descartables, reactivos grado PCR, cámara de flujo laminar, alicuotar las soluciones y siempre incluir en la reacción controles negativos.
- Se sugiere la utilización de una Taq DNA polimerasa de alta fidelidad que permita mejorar la eficiencia de la reacción de PCR y por ende la sensibilidad analítica del sistema.
- El sistema de diagnóstico diseñado puede ser extrapolado a un ensayo de PCR en tiempo real. Con ello se aspiraría a obtener datos cuantitativos que permitan establecer criterios de infección.
- Para futuras investigaciones, se debe considerar la amplificación completa del gen 16S rDNA que corresponde a 1500pb. Probablemente la secuencia completa brinde información que permita distinguir con mayor exactitud distintos patógenos.

- En vista de que los resultados de la PCR 16S rDNA obtenidos a partir de muestras clínicas con sospecha de infección quirúrgica fueron satisfactorios, se puede dar continuidad a la investigación aplicando el sistema propuesto al diagnóstico de otros tipos de infección nosocomial.
- Se recomienda acoplar la técnica de secuenciación automática al sistema de diagnóstico molecular PCR 16S rDNA para conseguir la identificación bacteriana no solo a nivel de género sino de especie.
- Se debe validar el sistema aplicando metodologías que permitan alcanzar fiabilidad estadística. Así se logrará analizar datos de sensibilidad y especificidad diagnóstica además de repetitividad y reproducibilidad del ensayo.

Anexo A. Medios de cultivo bacteriano

- *Eosin methylene blue lactose sucrose agar (EMB)*: Agar selectivo propuesto por Holt Harris and Teague (1916) para la detección y aislamiento de enterobacterias patógenas. Preparación: Suspender 36 g del polvo en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos; mezclar, calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a no más de 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°C y distribuir agitando suavemente.
- *Agar sangre*: Usado para el aislamiento y cultivo de varios microorganismos fastidiosos especialmente de especies patógenas y para establecer su forma de hemólisis. Preparación: Suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto. Esterilizar 20 minutos a 121°C. Enfriar a 45-50°C agregar sangre desfibrinada al 5%. Homogeneizar y distribuir en placas.
- *Agar Mannitol Salt*: Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Preparación: Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.
- *Caldo cerebro-corazón*: medio apropiado para el cultivo de microorganismos de difícil crecimiento. Preparación: Suspender 37g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Dispensar en tubos de vidrio, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Anexo B. Protocolo para el aislamiento de ADN genómico bacteriano mediante QiAamp DNA Mini Kit de Qiagen® .

Una vez seleccionado el material a partir del cual se aislará en ADN bacteriano se procede con los siguientes pasos:

1. Añadir 120 uL Buffer ATL además de 20ul de lisozima, 20uL de lisostafina y 20uL de liticasa. Incubar en agitación por 60 min a 37°C
2. Añadir 20uL de proteinasa K, mezclar con vórtex e incubar a 56°C por 60 minutos.
3. Centrifugar brevemente para remover las gotas del interior de la tapa.
4. Añadir 200uL de Buffer AL a la muestra, mezclar por vórtex e incubar a 70°C por 10 minutos. Centrifugar brevemente.
5. Añadir 200uL de etanol (96-100%), mezclar en el vórtex con un pulso de 15 seg.
6. Cuidadosamente aplicar la mezcla a la columna QIAamp Spin con cuidado de no mojar las paredes del tubo, cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna QIAamp Spin en un tubo limpio de 2 ml, y descartar el tubo conteniendo el filtrado.
7. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp Spin y añadir 500 µl de buffer AW1 sin mojar las paredes. cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna QIAamp Spin en un tubo limpio de 2 ml, y descartar el tubo conteniendo el filtrado.
8. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp Spin y añadir 500 µl de buffer AW2 sin mojar las paredes. cerrar la tapa y centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
9. Colocar la columna QIAamp Spin en un tubo limpio de 1.5 ml, y descartar el tubo conteniendo el filtrado. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp Spin y añadir 150 µl de buffer AE o agua destilada. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
10. Repetir el último paso y llevar a -20 °C para almacenar.

Anexo C. Cuantificación de la concentración de ADN por fluorometría mediante el Kit quant iT dsDNA de Invitrogen

1. Prepara la solución de trabajo, mezclando el fluoróforo con la buffer de dilución en una proporción de 1:200, tomando en cuenta que el volumen final por reacción es de 200uL.
2. Preparar las soluciones estándar mezclando 190 uL de la solución de trabajo con 10 uL de cada estándar de calibración. Mezcla en un vórtex por 3 segundos.
3. Preparar las muestras añadiendo de 1-20 uL de ADN. Ajustar el volumen final de reacción a 200uL añadiendo la cantidad apropiada de solución de trabajo. Mezclar en un vórtex por 3 segundos.
4. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente tanto los estándares como las muestras.
5. Insertar los tubos en el fluorómetro y realizar tres lecturas por muestra.
6. Realizar los cálculos correspondientes mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de ADN [ng/uL]} = Q_f * (200/x)$$

donde ;

Q_f : promedio de las lecturas

x : volumen de ADN en uL

Anexo D. Formulario para recepción de muestras clínicas

Id Nº: <input type="text"/>
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
FORMULARIO
Fecha de recepción de muestra (dd/mm/aaaa): <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
DATOS DEL PACIENTE
Nombre del paciente: <input type="text"/>
No. de historia clínica: <input type="text"/>
Edad: <input type="text"/>
Sexo: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>
DATOS CLINICOS
Diagnóstico <input type="text"/>
<input type="text"/>
<input type="text"/>
Fecha de cirugía (dd/mm/aaaa): <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
DATOS DE LA MUESTRA
Fecha de toma de muestra (dd/mm/aaaa): <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Tipo de muestra
Sangre <input type="checkbox"/> Pus <input type="checkbox"/>
Secreción <input type="checkbox"/> Tejido <input type="checkbox"/>
Orina <input type="checkbox"/> Esputo <input type="checkbox"/>
Otros: <input type="text"/>
Resultado microbiológico
<input type="text"/>
<input type="text"/>
<input type="text"/>

Anexo E. Hoja para reporte de resultados

Id Nº:

ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA

HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

DATOS DEL PACIENTE

Nombre del paciente:

No. de historia clínica:

Edad:

Sexo: F M

RESULTADO DE LA MUESTRA

Fecha de recepción de muestra (dd/mm/aaaa): / /

Fecha de entrega de resultados (dd/mm/aaaa): / /

Tipo de muestra:

Diagnóstico por biología molecular reporta : Positivo Negativo

Identificación:

Observaciones

Responsable,

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Adrianzén, R. (1999), Infecciones quirúrgicas y antibióticos en cirugía, Lima,

UNMSM, Cirugía: I cirugía general, Tomo I Capítulo 02

Alemán,L., Guanche,H. (2004), Etiología de la infección del sitio quirúrgico en

pacientes egresados del hospital clínico quirúrgico docente “Joaquín

Albarrán” Enero a Marzo del 2000, Habana, Rev. Cubana Cir 2001;

40(4):291-6

Anderson,C., Haliberto,B., Morán,R., Moreno,A., Vera,D. (2008),

Comportamiento de la infección del sitio operatorio en urgencias, Correo

Científico Médico de Holguín;12(3)

Arredondo, P. (2006), Bacteriología-Capítulo dos- Cultivo e identificación de

Agentes Infecciosos, Instituto Politécnico Nacional, México, [Disponible en

línea], www.pathmicro.med.sc.edu/spanish/bact-span.htm

Arias, J. (2001), Generalidades médico-quirúrgicas, Madrid: Editorial Tebar

Barrera, H., Rodríguez, I. (2004), La reacción en cadena de la polimerasa a dos

décadas de su invención, Universidad Autónoma de Nuevo León, México,

Ciencia Uanl; Vol. VII, No.3

Bender, L. (2007), Resúmenes de temas de cirugía, Cátedra de Cirugía II

U.H.C No. 4, Hospital San Roque, Pcia de Córdoba facultad de ciencias

médicas, Universidad Nacional de Córdoba, [Disponible en línea],
<http://www.eco.unc.edu.ar/docentes/bender/index.htm>

Boddinghaus,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

Burillo, A., Moreno, A. y Salas, C. (2007), Diagnóstico microbiológico de las infecciones y tejidos blando, Madrid, Enferm Infecc Microbiol Clin, 25(9): 579-86

Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. & Higuchi, R. (1994), Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA, Proc. Natl. Acad. Sci: Vol. 91, pp. 5695-5699

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, p. 1747–1752

Dall, F., Vedaldi, D. & Rodighiero, G. (1979), New studies on the interaction between 8-methoxypsoralen and DNA in vitro, Journal of Investigate Dermatology, 73: 191-197

- Edelson, R., Gasparro, F. (2002), Modulación del sistema inmunológico utilizando psoralenos activados por luz visible, Oficina Española de patentes y marcas, publicación 2165872
- Fajardo,A., Gordillo,J. & Schmalbach,J. (2005), Prediction scales and infection on surgical sites in 15 625 surgeries, Bogotá, Rev. salud pública v.7 n.1
- García, P. (2006), Métodos diagnósticos en microbiología, Universidad Católica de Chile, [Disponible en línea], <http://www.labored.cl/capunes/Microbiologia/MICROBIOLOGIA%20-%20Metodos%20Diagnosticos.ppt>.
- Guirao,X., Alonso,S & Arias,J. (2006), Infecciones Quirúrgicas. España: Arán Ediciones.
- Herrera, J. (2008), Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S, Universidad Nacional Autónoma de México, [Disponible en línea], www.uaem.mx/biologicas/index/progenote/bacteriana.pdf
- Hill, W. (2002), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), FDA website, [Disponible en línea], <http://www.foodsafety.gov/~frf/rflp.html>
- Jill,E. (2004), Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Clinical Microbiology reviews p. 840–862 Vol. 17, No. 4

- Jinno, Y., Yoshiura, K. & Niikawa, N. (1990), Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR, Nucleic Acids Research: Vol.18, No.22 6739
- Klappenbach, J., Dunbar, J. & Schmidt, T. (2000), rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria, Applied and environmental Microbiology, Vol.66, No.4, p.1328-1333
- Keith, J., Westran, R. (2005), Clinical Bacteriology, España: Elsevier
- Kwok, S. & Higuchi, R. (1989), Avoiding false positives with PCR, NATURE, vol.339 pp. 237-238
- Lewin, B. (2004), Genes ,VIII edition, USA: Pearson Prentice Hall
- 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 230:587-591
- Lizcano, F. (2005), Fundamentos moleculares en medicina, Colombia: Universidad de la Sabana
- Lodish, H., (2003), Molecular cell biology, 5.ed, New York: W.H. Freeman & Co.
- Longo, M., Berninger, M. & Hartley, J. (1990), Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in PCR, GENE 93:125-128

- Luque, J., Herráez, M., (2001), Biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud, España: Elsevier
- Mendoza, M., Rodicio, M, (2003), Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica, Universidad de Oviedo. España, Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(4):238-45
- Mifflin, T., (1997), Control of contamination associated with PCR and other amplification reactions, Molecular BioProducts, [Disponible en línea], <http://gene-quantification.com/mifflin-optimisation-report.pdf>.
- Nandi, P., Raja, S., Mak, K., Chan, S. & So, Y. (1999), Surgical wound infection, Hong kong, HKMJ; 5(1): 82-6
- Nacional Center for Biotechnology Information, (2009), [Disponible en línea], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Niederhauser,C., Hofelein,C., Wegmiuller,B., Liuthy,J. & Candrian U. (1994), Reliability of PCR Decontamination Systems, PCR Methods Appl. 4: 117-123
- Nikkari, S., Lopez, F., Lepp, P., Cieslak, P., Wilson, S., Passaro, D., Danila, R. & Relman, D. (2002), Broad-Range bacterial detection and analysis of

unexplained death and critical illness, California, Emerging Infectious diseases: Vol.8, No.2

Organización Mundial de la Salud. (2003), Prevención de las infecciones nosocomiales guía práctica, 2da. Edición.

Outeda, P. (2005), Estudio molecular y búsqueda de genes candidatos, Universidad de Santiago de Compostela, [Disponible en línea], http://books.google.com.ec/books?id=LCSP_2IJNPsC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false

Pavía, P., Caderon, C., Puerta, C. (2005), Diferenciación de especies de *Rhodococcus* mediante una prueba de PCR-RFLP basada en los genes codificantes para la subunidad 16S ribosomal, NOVA-Publicación científica ISSN ; 1794-2470 Vol.3: 1-116

Petty, C. (2007), Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing, Clinical Infectious Diseases ; 44:1108–14_2007

Rand, K & Houck, H. (1990), Taq Polymerase contains bacterial DNA of unknown origin, Mol Cell Probes: 4(6): 445-50

Romero, R. (2004), Factores asociados a infecciones nosocomiales en el servicios de Neonatología del Hospital Fernando Velez Paiz durante el

período Junio-Noviembre del 2004, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.

Ruza, F. (2003), Tratado de cuidados intensivos pediátricos, Tercera edición, volumen III, Madrid: Ediciones Norma-Capitel

San Diego Supercomputer Center. (2009), [Disponible en línea], <http://workbench.sdsc.edu/>

Serra, E. & Tribó, M. (1999), Enfermedades por fotosensibilidad inducidas exógenamente, Actualidad dermatológica, [Disponible en línea], <http://www.actualidaddermatol.com/art1102.pdf>.

Surzycki, S. (2000), Basic techniques in molecular biology, Berlin: Springer-Verlag

Treguerres, J., Martínez, V. y Navas, V. (2003), Biología aplicada a la medicina, Madrid: Editorial Díaz de Santos.

Warwick, S., Wilks, M., Hennessy, E., Powell-Tuck, J., Small, M., Sharp, J. & Millar, M. (2003), Use of Quantitative 16S ribosomal DNA detection for diagnosis of central vascular catheter-associated bacterial infection, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 42, No.4