

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

**18.**

Métodos moleculares de  
tipificación epidemiológica  
en bacteriología

2 0 0 5

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

**Coordinador: M. Angeles Domínguez**

**Autores: Pere Coll**

**M. Teresa Coque**

**M. Angeles Domínguez**

**Julio Vázquez**

**Jordi Vila**



ISBN: 84-609-7030-2

# INDICE:

## INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción
2. Métodos moleculares de tipificación en el laboratorio de microbiología
3. Características de los marcadores moleculares. Criterios para la elección de un buen marcador molecular.
  - 3.1. Evaluación de los marcadores moleculares
    - 3.1.1. Criterios que evalúan su eficacia
    - 3.1.2. Criterios que evalúan su eficiencia
    - 3.1.3. ¿Con qué colección de cepas deben evaluarse los marcadores epidemiológicos?
    - 3.1.4. Análisis de los datos
  - 3.2. Bibliografía específica
4. Análisis del ADN extracromosómico y de los elementos genéticos de transmisión horizontal
  - 4.1. Plásmidos
    - 4.1.1. Fundamentos y variantes técnicas
      - 4.1.1.1. Crecimiento del cultivo bacteriano.
      - 4.1.1.2. Centrifugación, lisis bacteriana y extracción del ADN plasmídico.
      - 4.1.1.3. Purificación del ADN.
      - 4.1.1.4. Digestión del ADN plasmídico.
      - 4.1.1.5. Determinación del peso molecular de plásmidos.
    - 4.1.2. Criterios para la interpretación de los resultados
      - 4.1.2.1. Análisis de plásmidos sin restricción.
      - 4.1.2.2. Análisis de perfiles de plásmidos tras restricción.
    - 4.1.3. Indicaciones para la aplicación del análisis de plásmidos
    - 4.1.4. Inconvenientes de la técnica
  - 4.2. Análisis de otros elementos de transmisión horizontal (ETH)
    - 4.2.1. Indicaciones para el análisis epidemiológico de ETH
    - 4.2.2. Criterios para la interpretación de resultados
  - 4.3. Bibliografía específica
5. Análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación
  - 5.1. Fundamentos y variantes técnicas
    - 5.1.1. Hibridación con sondas específicas
    - 5.1.2. Ribotipado
  - 5.2. Procedimiento técnico
    - 5.2.1. Subcultivo de la cepa
    - 5.2.2. Lisis bacteriana
    - 5.2.3. Extracción del ADN total
    - 5.2.4. Restricción del ADN
    - 5.2.5. Electroforesis
    - 5.2.6. Transferencia
    - 5.2.7. Hibridación
    - 5.2.8. Revelado
  - 5.3. Criterios para la interpretación de los resultados
  - 5.4. Indicaciones
  - 5.5. Inconvenientes de la técnica
  - 5.6. Bibliografía específica
6. Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Electroforesis en campo pulsante (PFGE)
  - 6.1. Tratamiento previo de los microorganismos
    - 6.1.1. Crecimiento bacteriano
    - 6.1.2. Lisis
    - 6.1.3. Lavados
    - 6.1.4. Restricción
  - 6.2. Fundamentos y variantes técnicas
    - 6.2.1. Componentes de un sistema de PFGE
    - 6.2.2. Variables que afectan a la resolución del PFGE
  - 6.3. Criterios para la interpretación de resultados
  - 6.4. Indicaciones
  - 6.5. Inconvenientes de la técnica
  - 6.6. Bibliografía específica
7. Análisis del ADN mediante amplificación con PCR
  - 7.1. Tratamiento previo de los microorganismos
  - 7.2. Fundamentos y variantes técnicas
  - 7.3. Criterios para la interpretación de resultados

- 7.4. Indicaciones
- 7.5. Inconvenientes de la técnica
- 7.6. Bibliografía específica
- 8. Análisis del ADN por secuenciación: *Multilocus sequence typing* (MLST)
  - 8.1. Tratamiento previo de los microorganismos
  - 8.2. Fundamentos y variantes técnicas
    - 8.2.1. Aplicación directa sobre muestras clínicas en ausencia de cultivo
    - 8.2.2. *Multilocus Restriction Type* (MLRT)
    - 8.2.3. Aplicación de MLST mediante tecnología de micromatrices
  - 8.3. Criterios para la interpretación de resultados
  - 8.4. Indicaciones
  - 8.5. Inconvenientes de la técnica
  - 8.6. Bibliografía específica
- 9. Otras técnicas de tipificación molecular
  - 9.1. *Amplification fragment length polymorphism* (AFLP)
  - 9.2. Bibliografía específica
  - 9.3. Micromatrices de ADN
  - 9.4. Bibliografía específica

## **DOCUMENTOS TÉCNICOS**

1. Análisis de ADN extracromosómico y de los elementos genéticos de transmisión horizontal: Análisis de ADN plasmídico (métodos de kado-liu y birnboim-doly).
2. Análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación: análisis del polimorfismo de restricción asociado a *IS6110*.
3. Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE).
4. Análisis del ADN mediante amplificación con pcr: Tipificación molecular utilizando técnicas de amplificación de ADN relacionado con secuencias rep (*repetitive extragenic palindrom*).
5. Análisis del ADN por secuenciación: *Multilocus sequence typing* (MLST) en *Neisseria meningitidis*

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

## **18. MÉTODOS MOLECULARES DE TIPIFICACIÓN EPIDEMIOLÓGICA EN BACTERIOLOGÍA. 2005**

**Coordinador: M. Angeles Domínguez**

**Autores: Pere Coll**

**M. Teresa Coque**

**M. Angeles Domínguez**

**Julio Vázquez**

**Jordi Vila**

## 1. INTRODUCCIÓN

En esta nueva edición de los Procedimientos en Microbiología Clínica, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica ha considerado de interés incluir un documento que recoja las aplicaciones de los métodos moleculares en la tipificación bacteriana y su utilidad en los estudios epidemiológicos.

Los sistemas de tipificación molecular constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. Estos sistemas comprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. De este modo, se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común. A la vez, deben ser técnicas capaces de diferenciar aislamientos no relacionados, con independencia de su pertenencia a la misma especie microbiológica o taxón. Con anterioridad estos estudios se basaban en las características fenotípicas de los microorganismos (propiedades antigénicas, metabólicas o de resistencia antibiótica). Sin embargo, muchos de estos sistemas fenotípicos son limitados para establecer diferencias o similitudes concluyentes entre microorganismos.

En este documento se utilizará una nomenclatura que mantiene las siglas originales en inglés de las diferentes técnicas y que son como se las conoce internacionalmente.

## 2. MÉTODOS MOLECULARES DE TIPIFICACIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Las técnicas moleculares que analizan propiedades o polimorfismos genéticos en los microorganismos, han ampliado notablemente el campo de la tipificación en microbiología. Los fundamentos de estas técnicas son variables: estudios de restricción del ADN cromosómico o extracromosómico, análisis del número de copias de determinadas secuencias de inserción o repetitivas a lo largo del cromosoma o de las regiones entre secuencias de inserción o repetitivas adyacentes (REP-PCR; polimorfismo IS6110 en *Mycobacterium tuberculosis*) o amplificación arbitraria de fragmentos genéticos (AP-PCR). La mayor ventaja de estos métodos radica en la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y en la posibilidad de aplicarlos universalmente a distintos géneros y especies de microorganismos.

Los marcadores moleculares se han aplicado a diferentes campos y su disponibilidad ha mejorado nuestro conocimiento sobre:

- patogénesis e historia natural de ciertas infecciones,
- detección de brotes y epidemias, identificación de reservorios y de mecanismos de transmisión de patógenos,
- diseño de medidas de control de propagación de la infección, y
- evolución genética de poblaciones microbianas.

En todas estas aplicaciones el objetivo de los marcadores moleculares es el de definir la relación

existente, clonal o no, entre los aislamientos estudiados. El término *clon* o *grupo clonal* en epidemiología hace referencia al grupo de aislamientos relacionados por el hecho de descender de un ancestro común, esto es, por formar parte de una cadena de replicación y transmisión. Las cepas relacionadas provienen, pues, de la expansión clonal de un precursor único y poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y fenotipos significativamente superior al que se encontraría entre aislamientos no relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente.

Merece también especial mención, la diseminación horizontal entre bacterias (del mismo o distinto taxón) de plásmidos o elementos genéticos potencialmente móviles (transposones, integrones, fagos...) que contengan secuencias relevantes epidemiológicamente, como por ejemplo, genes de resistencia antibiótica o de virulencia. A estos aspectos se ha dedicado también uno de los apartados.

La aplicación de técnicas y marcadores de epidemiología molecular es indispensable en el estudio de la infección nosocomial, sobre todo en hospitales en los que se dispone de unidades de vigilancia intensiva, neonatología, quemados, hematología u oncología, en donde ingresan pacientes susceptibles de adquirir infecciones graves intrahospitalarias. Asimismo, existen numerosas referencias relacionadas con la aplicación de marcadores moleculares al estudio de las infecciones extrahospitalarias, son algunos ejemplos los estudios de patrones de transmisión de tuberculosis, la identificación de reservorios de legionelosis y los estudios epidemiológicos de infección por neumococo o meningococo.

Los métodos moleculares aplicados al estudio epidemiológico pueden estructurarse en los siguientes apartados: 1) análisis de ADN extracromosómico; 2) restricción de ADN cromosómico y detección de secuencias por hibridación con sondas; 3) macrorrestricción de ADN cromosómico, 4) amplificación de secuencias genéticas con o sin restricción posterior del producto obtenido, 5) análisis de ADN por secuenciación y 6) perfil de hibridación de múltiples secuencias. La elección de la técnica a aplicar dependerá de la capacidad técnica y tecnológica de cada laboratorio, de la situación epidemiológica específica a estudiar y de la rapidez necesaria en la respuesta del laboratorio. La macrorrestricción de ADN cromosómico, incluye la técnica de PFGE, siendo una de las más utilizadas ya que presenta gran versatilidad y permite conocer la clonalidad de diferentes aislados en situaciones epidémicas con tiempo y espacio definido. Como alternativa se encuentran las técnicas de amplificación (técnicas de PCR), de mayor rapidez que el PFGE, que ofrecen las mismas ventajas que el PFGE en situaciones de epidemia, y el análisis por secuenciación que ofrece ventajas en estudios de grandes grupos clonales pero de escasa utilidad en la caracterización de epidemias por lo que se utilizan para el análisis y

comparación de aislados de diferentes áreas geográficas y su evolución en el tiempo. El perfil de hibridación de múltiples secuencias incluye las micromatrices o *microarrays*, técnica de escasa aplicación actual pero con gran proyección de futuro. A continuación se exponen los métodos moleculares que más se han utilizado para estudios epidemiológicos en bacteriología, clasificados en los 6 apartados mencionados. En cada uno de ellos se comentan los fundamentos básicos y técnicos de estos métodos, incluyendo criterios para la interpretación de los resultados e indicaciones sobre cada uno de los procedimientos. Al final, se ha incluido un capítulo de documentos técnicos, en el que se detallan 5 procedimientos, representativos de los métodos moleculares expuestos, en forma de protocolo de trabajo normalizado (PNT) redactado según la normativa ISO, que puede ser adaptado a las particularidades de cada laboratorio. Previamente se indican las características que deben reunir los marcadores moleculares para poder utilizarse en el estudio epidemiológico.

### **3. CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADORES MOLECULARES. CRITERIOS PARA LA ELECCIÓN DE UN BUEN MARCADOR MOLECULAR**

La definición de clon es probabilística y el nivel de similitud necesario para su definición debe tener en cuenta el taxón estudiado, el marcador utilizado y el tiempo que dure la investigación epidemiológica. Por ello, antes de escoger un marcador molecular debe formularse de forma clara y precisa aquella pregunta en términos epidemiológicos cuya respuesta es preciso conocer, definir el nivel de relación genética que es necesario determinar para responder a la pregunta anterior, escoger los marcadores que son capaces de discriminar a este nivel de relación y verificar la eficacia de los métodos seleccionados.

Cuando se analizan brotes epidémicos por taxones muy homogéneos es necesario utilizar marcadores muy discriminativos para reconocer a los aislamientos no relacionados como distintos de la cepa epidémica. Por el contrario, en la vigilancia de las enfermedades infecciosas, puede interesar monitorizar la diseminación de un clon a nivel mundial de forma prospectiva (esto es, durante mucho tiempo). En este caso, es posible que este clon sufra cambios microevolutivos que generen patrones relacionados pero no idénticos. Si utilizamos marcadores muy discriminativos podemos identificar aislamientos relacionados como diferentes. Es por ello que se ha recomendado establecer categorías de relación entre las cepas. En el caso de la electroforesis de campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), se habla de cepas "idénticas", "probablemente relacionadas", "posiblemente relacionadas" o "distintas" en función del número de cambios genéticos que traduce la diferencia existente entre los patrones obtenidos. En cualquier caso, conviene recordar que estos criterios se han establecido para el estudio de epidemias con el objeto de diferenciar las cepas incluidas en una

cadena de transmisión (relacionadas) de las que no lo están (no relacionadas). Por otra parte, cuando se utilizan marcadores cuya capacidad discriminativa se basa en secuencias que se ven influidas por el ambiente o el estado fisiológico del microorganismo las diferencias que se observan no serán proporcionales al grado de relación de las cepas. Así, por ejemplo, los plásmidos se ven muy influidos por las condiciones de crecimiento del microorganismo y las diferencias en el perfil plasmídico no traducen necesariamente el grado de relación existente entre las cepas estudiadas.

La capacidad de discriminación de un marcador depende de la variabilidad genética existente en la región del cromosoma que explora. Así, por ejemplo, el PFGE explora todo el cromosoma detectando la variabilidad existente en los lugares de restricción del enzima utilizado para la digestión del ADN o la inserción o delección de grandes fragmentos entre dos lugares de restricción. En función de estos factores se obtendrá un polimorfismo en los tamaños de los fragmentos obtenidos en la digestión. En general el PFGE es muy discriminativo ya que es muy sensible a la microvariación existente en una colección de cepas. Por el contrario, el ribotipado basa su capacidad de discriminación en la variabilidad existente en las regiones cromosómicas adyacentes a las distintas copias del operón *rnm*. Este marcador suele ser menos discriminativo y la variabilidad que detecta suele tener su origen en un momento relativamente lejano en el tiempo (Tabla 1). Idealmente un marcador debería permitir calcular la distancia genética existente entre las cepas estudiadas. Su conocimiento permite establecer la relación entre las cepas y, por lo tanto, conocer con precisión su historia evolutiva. Las diferencias detectadas por este marcador ideal deberían corresponder a cambios evolutivos "neutros" cuya acumulación fuera proporcional al tiempo transcurrido. Ello requiere que la estructura poblacional del microorganismo estudiado sea fundamentalmente clonal. En aquellas poblaciones panmíticas en las que los fenómenos de recombinación dan lugar a un intercambio aleatorio frecuente de genes es más difícil interpretar los resultados de los marcadores moleculares.

En cualquier caso, deben escogerse marcadores que analicen secuencias con baja recombinación. Debe mencionarse, no obstante, que en determinadas especies muy homogéneas la única manera de discriminar los aislamientos es analizar precisamente regiones recombinativas (este es el caso, por ejemplo de *M. tuberculosis* donde se utiliza el polimorfismo genético asociado a la IS6110 o el tipado por la unidad repetitiva intercalada de micobacteria: MIRU).

**Tabla 1.** Características de los marcadores moleculares más utilizados (modificada de van Belkum *et al.* Clin Microbiol Rev 2001; 14: 547-560)

Marcador	Tipabilidad	Reproducibilidad	Poder de discriminación	Facilidad técnica	Interpretación	Disponibilidad	Coste
Perfil plasmídico	Variable	Regular	Variable	Regular	Buena	Excelente	Medio
REA de ADN total	Excelente	Variable	Variable	Buena	Regular	Variable	Medio
Ribotipado	Excelente	Excelente	Buena	Buena	Buena	Variable	Alto
PFGE	Excelente	Excelente	Excelente	Buena	Buena	Variable	Alto
PCR	Excelente	Regular	Excelente	Buena	Regular	Buena	Medio
AFLP	Excelente	Buena	Excelente	Buena	Regular	Baja	Alto
MLST	Óptima	Excelente	Excelente	Difícil	Excelente	Baja	Alto

REA: análisis del ADN total con enzimas de restricción de alta frecuencia de corte; PFGE: digestión del ADN total con enzimas de baja frecuencia de corte y resolución de los fragmentos generados por electroforesis de campo pulsante; PCR: polimorfismo de amplificación; AFLP: polimorfismo del tamaño de los fragmentos de amplificación; MLST: tipado por secuenciación de múltiples *loci*.

### 3.1. EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES:

#### 3.1.1. Criterios que evalúan su eficacia:

**Tipabilidad:** Proporción de cepas que un marcador puede clasificar como pertenecientes a un tipo determinado. Al conjunto de cepas que no son susceptibles de ser clasificadas se les conoce como cepas no tipables. Un marcador será tanto más útil cuando más se acerque su tipabilidad al valor 1.

**Reproducibilidad:** Capacidad de un marcador para clasificar a una cepa en el mismo tipo cuando se realizan varios ensayos independientes. En aquellos marcadores complejos no debe tenerse en cuenta la variabilidad que se acepta entre patrones dentro de un mismo tipo. Los experimentos destinados a valorar la reproducibilidad deben tener en cuenta todas las variables posibles. Dado que el valor de reproducibilidad de un marcador afecta de manera muy significativa su capacidad de discriminación, el valor de reproducibilidad debe ser superior a 0,95. Las situaciones en las que se pretende comparar un número limitado de cepas (frecuentemente en el mismo experimento) toleran una menor reproducibilidad; las bases de datos a gran escala (centros de referencia) exigen una reproducibilidad mayor.

**Estabilidad:** Mide la capacidad de un marcador para reconocer la relación clonal que existe entre cepas que proceden de un precursor común, a pesar de la variación fenotípica o genotípica ocurrida durante la diseminación clonal en la naturaleza o en el almacenamiento y replicación en el laboratorio (epidemias a gran escala, cepas de archivo). El estudio de la estabilidad *in vivo* se realiza comparando cepas antes y después de un número de pases en un modelo animal, aislamientos consecutivos en el mismo enfermo (colonización o infección persistente) o en sitios anatómicos distintos o en el curso de epidemias muy bien definidas. El estudio de la estabilidad *in vitro* se realiza comparando las cepas antes y después de su almacenamiento durante un periodo determinado de tiempo, en el que se hacen una serie de resiembras en un medio de cultivo concreto (se recomienda incluir un mínimo de 10 cepas que se estudian cada cinco pases en un experimento de 50 resiembras, lo que da un total de 100).

**Poder discriminativo:** Probabilidad promedio de que el marcador utilizado clasifique en 2 tipos distintos a 2 cepas no relacionadas escogidas al azar de la población de un determinado taxón. El poder discriminativo se cuantifica con el Índice de Diversidad de Simpson, según la fórmula:

$$ID = 1 - 1/N (N-1) \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1)$$

N = nº de cepas; S = nº tipos distintos;  $n_j$  = nº cepas pertenecientes al tipo J.

El valor de ID depende del número de tipos distintos definidos por el marcador y de la homogeneidad con la que la población estudiada se distribuye en los "n" tipos. Idealmente el valor de ID debe ser superior a 0,95. Puede utilizarse una combinación de marcadores.

#### 3.1.2. Criterios que evalúan su eficiencia:

Antes de escoger un marcador debemos considerar las características de la investigación que nos proponemos llevar a término. Entre estas características cabe destacar el tamaño de la muestra a analizar y la premura con la que se necesitan los resultados. Así, no es lo mismo un estudio de 5 casos que pueden corresponder a una transmisión nosocomial cuya confirmación puede condicionar una serie de medidas de control que están en marcha, que un estudio retrospectivo sobre la difusión de una cepa en una determinada comunidad que puede representar el análisis de centenares de cepas. Dada por supuesto la capacidad de discriminación, en el primer caso se valorará la rapidez del marcador y la disponibilidad de los distintos marcadores en el entorno inmediato. En el segundo serán la reproducibilidad y el coste.

También hay que valorar la versatilidad de un marcador y su facilidad técnica. El PFGE es un marcador flexible, ya que se puede utilizar para el estudio de la mayor parte de bacterias, pero el procedimiento técnico es relativamente complejo y exige de una instrumentación específica que no se encuentra presente en todos los laboratorios de microbiología clínica. Con la excepción del ribotipado, las técnicas que analizan polimorfismos o variantes de restricción (*restriction fragment length polymorphism* o RFLP) asociados a una secuencia y revelados con una sonda específica, además de técnicamente complejos, sólo sirven para el estudio de la especie en la que se encuentra esta secuencia (por ejemplo, RFLP asociado a IS6110 y *M. tuberculosis*). En los taxones en los que se han demostrado útiles, los polimorfismos de amplificación son rápidos, técnicamente sencillos y la mayor parte de laboratorios de microbiología tienen acceso a un termociclador.

Por último, es importante considerar la facilidad con la que se pueden exportar los datos generados a bases de datos del propio laboratorio o intercambiar estos con otros laboratorios o centros de referencia.

#### 3.1.3. ¿Con qué colección de cepas deben evaluarse los marcadores epidemiológicos?

Deben evaluarse con una colección suficientemente numerosa de cepas, correctamente identificadas al nivel taxonómico indicado, que reflejen al máximo la diversidad que se espera en este taxón, o como mínimo en la subpoblación que se pretende estudiar con el marcador. Es conveniente que se incluyan los diferentes grados de relación posible, esto es, cepas idénticas, cepas no idénticas pero muy similares, cepas moderadamente relacionadas y cepas claramente distintas. La relación epidemiológica de las cepas debe conocerse en función de datos clínicos y epidemiológicos pormenorizados.

Para conocer la tipabilidad y el poder de discriminación se recomienda estudiar una colección numerosa de cepas no relacionadas epidemiológicamente (>100). Cuando se quiere conocer la estructura genética de una población se utilizan colecciones incluso mayores que deben reflejar el conjunto de la población. Por ejemplo, en



el caso del meningococo se han de incluir cepas aisladas de enfermos, pero también de portadores. Para conocer la eficacia de un marcador en el estudio y control de brotes epidémicos se han de comparar las cepas supuestamente relacionadas con una colección de cepas control no relacionadas (de 10 a 30 cepas) aisladas de pacientes similares y en un periodo de tiempo similar.

#### 3.1.4. Análisis de los datos

La mayoría de los marcadores moleculares se basan en separaciones electroforéticas que dan lugar a un patrón de bandas. El análisis de los resultados se basará en el cálculo de los coeficientes de similitud de estos patrones para cada par de cepas. Estos resultados se expresan en una matriz de similitud que puede representarse gráficamente como un dendrograma de homologías.

Es extremadamente importante estandarizar las condiciones experimentales a fin de que los patrones electroforéticos sean reproducibles y puedan compararse los resultados obtenidos en distintos geles tanto en el mismo laboratorio como en distintos laboratorios. Este hecho es especialmente importante cuando los datos de tipificación de un determinado microorganismo se centralizan en un laboratorio dando lugar a grandes bases de datos. Si bien este esfuerzo de estandarización se ha realizado para algunos microorganismos (*M. tuberculosis* y RFLP asociado a IS6110, *Staphylococcus aureus* y PFGE) queda mucho por hacer en este sentido.

El primer paso en el análisis de los resultados es la normalización de los geles. Existen numerosos factores que influyen en el proceso electroforético (protocolo de trabajo, carga del gel, condiciones de electroforesis, instrumentación... etc) que pueden dar lugar a que dos bandas del mismo tamaño tengan una posición en el gel ligeramente diferente. La normalización consiste en asignar a estas bandas el mismo peso (posición) a pesar de las diferencias generadas por el proceso analítico. La normalización de los geles se ha visto facilitada por el desarrollo de programas informáticos (algunos comercializados), pero en cualquier caso exige una cuidadosa supervisión visual.

Una vez normalizados los geles, para el cálculo de la similitud entre un par de cepas pueden utilizarse diversos coeficientes. El más utilizado es el coeficiente de Dice que se basa en la posición de las bandas. Cuando se ha definido la totalidad de bandas presentes, se determina su presencia o ausencia en cada una de las dos cepas y el coeficiente de similitud se calcula con la siguiente fórmula:

$$S_D = \frac{2n_{AB}}{2n_{AB} + a + b}$$

$n_{AB}$  = número de bandas presentes en las dos cepas

$a$  = número de bandas presentes en la cepa A pero no en la cepa B

$b$  = número de bandas presentes en la cepa B pero no en la cepa A

Otros marcadores basados en la posición de las bandas son el de Jaccard o el coeficiente de Pearson. Existen otros coeficientes de similitud que también tienen en cuenta la intensidad de las bandas. Su utilización exige que la intensidad de las bandas sea reproducible en los diferentes ensayos.

El algoritmo matemático que se utiliza más comúnmente para construir dendrogramas a partir de la matriz de similitud es el método de agrupación por pares no ponderado, utilizando promedios (*unweighted pair group method using arithmetic averages*: UPGMA). Este método asume que el "reloj molecular" es idéntico para todas las cepas y da lugar a un árbol "con raíz" (o punto de partida) a partir del cual tienen lugar las divisiones. Los dendrogramas generados con los marcadores moleculares no hay que considerarlos como una representación filogenética de las relaciones entre cepas, sino como una forma práctica de visualizar el grado de relación entre cepas e identificar grupos o *clades*. En un dendrograma, el punto de corte para considerar las cepas como relacionadas es arbitrario. En algunos casos se exige una identidad de patrones pero frecuentemente, tal como se ha comentado para el PFGE, se acepta un cierto número de diferencias. La experiencia, y, tal como se ha comentado, la concordancia de sistemas de tipado ayudan a seleccionar un punto de corte adecuado.

#### 3.2. BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Struelens MJ and the Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial typing systems. *Clin Microbiol Infect* 1996; 2: 2-11.
2. Van Belkum, A, Struelens M, de Visser, A, Verbrugh, H, Tibayrenc, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 547-560.
3. Soll DR, Lockhart SR, Pujol C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ED). *Manual of Clinical Microbiology*. 8ª Edición. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003; pp 139-161.
4. Pfaller, MA. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med*. 1999; 123: 1007-1010.

#### 4. ANÁLISIS DEL ADN EXTRACROMOSÓMICO Y DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS DE TRANSMISIÓN HORIZONTAL

La resistencia a agentes antimicrobianos se produce por mutación o por la adquisición de genes localizados en diferentes elementos de transmisión horizontal (ETH) como plásmidos, transposones o integrones, capaces de transmitirse entre microorganismos de la misma o de distinta especie. El aumento de la resistencia a un determinado antibiótico puede ser debido a la diseminación de un clon o de un ETH entre distintas cepas. La diferenciación entre "epidemias" debidas a clones o a ETH puede ser relevante ya que las políticas de

control pueden variar según las diferentes situaciones epidemiológicas. El análisis y caracterización de los ETH permite la monitorización de elementos genéticos específicos de los microorganismos o de áreas geográficas que pueden ser importantes en la evolución y diseminación de las bacterias que los albergan.

En este apartado analizaremos los fundamentos e importancia del análisis de diferente ETH implicados en la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos con especial énfasis en los plásmidos.

#### 4.1. PLÁSMIDOS

Los plásmidos son elementos de ADN extracromosómico que constituyen entre el 1% y >10% del genoma de muchas especies bacterianas. Se replican intracelularmente de manera autónoma y, aunque en la mayoría de las ocasiones no son esenciales para la viabilidad de la célula, contienen genes que confieren distintas propiedades como la resistencia a antibióticos, virulencia o actividades metabólicas. Los plásmidos se clasifican según sus características, algunas de ellas con importancia epidemiológica: tamaño, rango de hospedador (presencia en una o diferentes especies y géneros), número de copias por célula, capacidad de transferirse por conjugación y grupo de incompatibilidad. Tradicionalmente, el número de plásmidos por célula se ha utilizado como marcador fenotípico. Hoy en día tiene escasa utilidad y el análisis plasmídico está enfocado a dirimir la transmisibilidad de los genes que albergan y por tanto su valor epidemiológico.

Los plásmidos están constituidos por una región constante que incluye determinantes genéticos para sus funciones esenciales (replicación, mantenimiento y transferencia) y una región variable de ADN heterólogo (ej., genes de resistencia). La relación epidemiológica entre distintos plásmidos se realiza en función de su región constante. La caracterización del ADN heterólogo es útil para determinar la ecología y la epidemiología de los mismos en respuesta a distintas presiones selectivas, en el caso de los determinantes de resistencia a la utilización de antimicrobianos.

Los plásmidos suelen existir como moléculas circulares de ADN de doble hebra (dsADN) cerradas covalentemente (conocidas como formas CCC, Covalently Closed Circular). Las alteraciones por rotura de la dsADN dan lugar a las configuraciones

plasmídicas abiertas circulares (formas OC, Open Circular) o lineal (formas L) según se afecte una o las dos hebras. Estas tres configuraciones migran a distinta velocidad en los geles de agarosa: la forma CCC más rápidamente que la OC y ésta más rápidamente que la L. Todas ellas se encuentran frecuentemente en una misma célula por lo que normalmente se observan 3 bandas correspondientes al mismo plásmido. Con frecuencia también se detectan dímeros o multímeros de las formas CCC y OC (figura 1.).

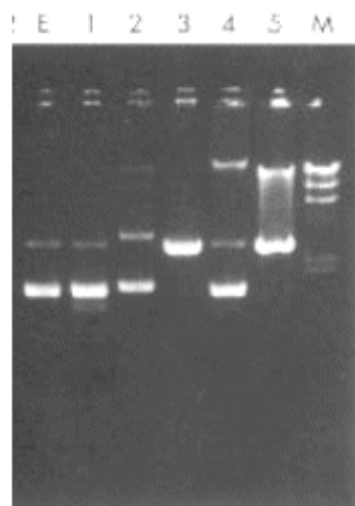
**Figura 1.** Interpretación del ADN plasmídico obtenido. Problemas más frecuentes en la extracción de plásmidos. Línea E. ADN plasmídico puro de excelente calidad. Las líneas 1-5 ilustran los resultados atípicos más frecuentes que nos podemos encontrar. Línea 1, Formas CCC (banda inferior) y OC (banda superior) del plásmido multicopia pUC18 con una banda inferior de ADN plasmídico degradado (inmediatamente debajo de la forma CCC). Estas formas aparecen tras una lisis prolongada y son resistentes a la digestión enzimática. Línea 2, multímeros de las formas CCC junto con las formas CCC y OC del plásmido pTZ19. Los multímeros se diferencian de la contaminación de ADN cromosómico con una simple digestión enzimática, éstos junto las formas CCC y OC darán una única banda correspondiente a la forma L del plásmido como se ilustra en el siguiente carril. Línea 3, formas L del plásmido tras digestión enzimática. Línea 4, contaminación de ADN cromosómico (banda superior) junto a las formas CCC y OC plasmídicas. Se observa cuando las preparaciones han sido tratadas agresivamente (agitación con vórtex durante los primeros pasos de la extracción). Se identifica fácilmente tras digestión enzimática ya que da lugar a una mancha difusa a lo largo del carril como se ilustra en la línea 5. Línea 5, ADN plasmídico contaminado con ADN cromosómico tras digestión enzimática. Línea 6, marcador de peso molecular lambda ADN digerido con *HindIII*. (Imagen tomada de *Qiagen Plasmid Purification Handbook 09/2000*)

Los plásmidos se han encontrado en la mayoría de las bacterias conocidas. En algunos géneros como *Borrelia* y *Streptomyces* existen los llamados “*plásmidos lineales*” de extremos covalentemente cerrados y estructura similar a la de algunos virus.

##### 4.1.1. Fundamentos y variantes técnicas

El análisis de plásmidos tiene como objetivos detectar su presencia y/o establecer la relación entre ellos. Para ello es necesario partir de un cultivo bacteriano adecuado, centrifugar el cultivo, aplicar un método de extracción y purificar el ADN plasmídico obtenido. Posteriormente podremos medir el tamaño de los plásmidos y establecer las relaciones epidemiológicas.

4.1.1.1 Crecimiento del cultivo bacteriano. La cantidad y calidad de ADN plasmídico final obtenido vienen determinadas por diferentes factores como el número de copias, el tamaño del ADN heterólogo y la cepa hospedadora. Los plásmidos de alto peso molecular o con grandes secuencias en su región variable suelen estar en bajo número de copias y el rendimiento de su extracción puede optimizarse modificando el volumen, el medio de cultivo y la



técnica de lisis. Debe tenerse en cuenta diferentes factores:

**Inoculación.** Se debe partir de una única colonia de cultivo en medio selectivo sólido crecidas el día anterior. La incubación debe ser de 12-16 h coincidiendo con la transición de la fase logarítmica a la estacionaria. En este intervalo, el cociente ADN/ARN es mayor que en la fase logarítmica y el ADN todavía no se degrada, como sucede al final de la fase estacionaria.

**Medios de cultivo.** Suelen ser líquidos y con suplemento antibiótico para lograr amplificar las células que portan el plásmido. El más utilizado es el medio Luria Bertani (LB), siendo la formulación que contiene 10 g de NaCl/L la que mejores rendimientos de ADN plasmídico ofrece. En el caso de plásmidos de muy bajo número de copias pueden utilizarse medios enriquecidos como el medio TB (*Terrific Broth*) que aumentan de 4-6 veces el rendimiento. Para microorganismos grampositivos se utiliza infusión cerebro-corazón (BHI), tripticasa de soja (TSA) o medio definido M9. Si se utilizan medios de cultivo ricos, el volumen ha de reducirse para evitar un aumento de la biomasa que aumentaría la viscosidad del lisado, afectaría a la lisis bacteriana y haría necesaria una mayor agitación con aumento del riesgo de fragmentación del ADN cromosómico y por tanto contaminación del ADN plasmídico.

La adición de cloranfenicol (170 µg/mL) al medio de cultivo amplifica el número de copias de los plásmidos y por tanto el rendimiento final. Esto se debe a la acción inhibitoria del cloranfenicol sobre la síntesis de proteínas y por ello sobre la replicación del cromosoma bacteriano pero no sobre la de los plásmidos. Asimismo, favorece la disminución de la biomasa cuando se emplean grandes volúmenes. El cloranfenicol no debe añadirse cuando se inocula el microorganismo sino después de 2,5 h de incubación.

**Volumen de cultivo.** Casi todos los métodos, muchos de ellos comerciales (sistemas *miniprep*), pueden adaptarse para diferentes volúmenes. En general se debe aumentar el volumen en función del tamaño y número de copias (tabla 2).

**Cepas hospedadoras.** La extracción de plásmidos se puede realizar a partir de las cepas salvajes que los albergan (cuando se quiere determinar el contenido plasmídico o las cepas contienen un único plásmido) o de los transconjugantes a los que previamente se ha transferido el plásmido (cuando se quiere caracterizar un único plásmido en cepas que contienen más de uno). En este último caso, se deben utilizar cepas receptoras conocidas para asegurarnos una extracción óptima. Existe un gran número de cepas receptoras de *Escherichia coli*. La mayoría funcionan adecuadamente pero HB101 y sus derivados como TG1 y la serie JM100 liberan una gran cantidad de carbohidratos durante la lisis lo cual puede inhibir la digestión con enzimas de restricción y tienen una

elevada actividad endonucleasa lo que determina un ADN de inferior calidad. Las cepas DH1, DH5α, C600 y XL1Blue son las que mejores rendimientos ofrecen. En ocasiones se recomiendan algunas específicas de especie como OG1RF y JH2-2 para *Enterococcus faecalis* o la cepa GE1 para *Enterococcus faecium*.

**4.1.1.2. Centrifugación, lisis bacteriana y extracción del ADN plasmídico.** El contenido celular de los cultivos bacterianos se concentra por centrifugación y se lisa por diferentes métodos que incluyen tratamiento con álcalis o calor, detergentes iónicos o no iónicos y disolventes orgánicos. La elección del método de extracción depende de la especie bacteriana que contiene el plásmido, su tamaño molecular y el tipo de análisis que se planea realizar:

Los plásmidos de alto peso molecular han de extraerse con una lisis suave que evite su fragmentación. Normalmente se resuspenden en soluciones de sacarosa y se tratan con lisozima y EDTA para romper la membrana, procediendo a la lisis de los esferoplastos resultantes del tratamiento previo con detergentes como dodecil sulfato de sodio (SDS). Los plásmidos de bajo o medio peso molecular (los más frecuentemente analizados) se extraen con métodos más agresivos que incluyen tratamiento con EDTA y lisozima y exposición posterior al calor o a álcalis.

El tratamiento debe modificarse según la cepa hospedadora (especie bacteriana o estirpe, debido a la diferente composición de la pared celular de distintos microorganismos).

Se han descrito numerosos protocolos para la separación de ADN plasmídico del cromosómico. Los protocolos actuales permiten el análisis de un gran número de muestras (métodos "a pequeña escala"). Se basan mayoritariamente en el **método de lisis alcalina de Birnboim y Doly** y son aplicables a un gran número de bacterias grampositivas y gramnegativas. Este método se basa en la diferente resistencia a valores de pH elevados del ADN plasmídico y cromosómico. La aplicación de una solución de SDS y NaOH provoca la lisis celular y la desnaturalización del ADN plasmídico y cromosómico. La neutralización con acetato potásico permite que el ADN plasmídico vuelva a su configuración CCC y por tanto permanezca soluble mientras el ADN cromosómico y las proteínas precipitan en un complejo formado por potasio y SDS que se elimina por centrifugación. El ADN plasmídico en el sobrenadante se concentra por precipitación con etanol. Los métodos se modifican en el caso de microorganismos grampositivos con el fin de digerir la pared celular (por adición de lisozima o de lisozima y lisostafina) o para posterior restricción añadiendo RNAsa.

**TABLA 2. Principales métodos para la extracción de plásmidos y sus aplicaciones**

Método	Microorganismos	Tamaño (kbp)	Purificación posterior	DNA para digestión	Aplicaciones/Observaciones	Referencia
<u>Kado y Liu</u>	Gramnegativos: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> Grampositivos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i>	2-150	NO	SI**	Su aplicación principal es la <b>determinación del tamaño molecular</b> **El ADN obtenido puede utilizarse para digestión aunque normalmente se evita debido a que la contaminación con fenol puede inhibir la digestión enzimática	<i>J Bacteriol</i> , 1981
<i>Barton</i>	Grampositivos, Gramnegativos, levaduras	>150	NO	NO	Su única aplicación es la <b>determinación del tamaño molecular</b>	<i>Analytical Biochem</i> , 1995
<i>Birnboim y Doly</i>	Gramnegativos: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> Grampositivos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i>	< 60	Variable	SI	Método de elección para minipreps y para midi/maxipreps si se aplica un paso de purificación posterior. Se debe recurrir a otro método si los plásmidos son >100-150kbp	<i>Nucleic Acids Research</i> , 1979
<i>Holmes y Quigley</i> ("boiling")	Gramnegativos: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> Grampositivos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus</i>	< 50	NO	SI	Solamente utilizable para plásmidos multicopia. El ADN obtenido es de inferior calidad al conseguido por otros métodos pero permite evaluar un gran número en un corto espacio de tiempo	<i>Analytical Biochem</i> , 1981
<i>Chassy</i>	Grampositivos: estreptococos, actinomicetos, rodococos o nocardias	2- 50	NO	SI		<i>Biochem Biophys Res Comm</i> , 1976
<i>Woodford</i>	<i>Enterococcus</i> spp	< 50	NO	SI	Utilizado frecuentemente por muchos autores. Ampliamente aceptado para este género aunque otros métodos aquí mencionados dan excelentes resultados	<i>Antimicrob Agents Chemother</i> , 1993
<i>Townsend</i>	<i>S. aureus</i>	< 50	NO	SI	Utilizado para el análisis de plásmidos en un gran número de muestras de esta especie	<i>Lett Appl Microbiol</i> , 1985
<i>Anderson y McKay</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>Streptococcus</i>	> 50 kbp	NO	SI		<i>Appl Environm Microbiol</i> , 1983
<i>Currier and Nester</i>	Gramnegativos Grampositivos: <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (modificación del original en ref 3)	>100	SI	SI	Uno de los métodos de elección para la obtención de plásmidos de elevado Pm en cantidades del orden de decenas de microgramos-mg	<i>Analytical Biochem</i> , 1976 Referencia 3
<i>Portnoy</i>	Gramnegativos: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Legionella</i> Grampositivos: <i>Enterococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp, <i>Staphylococcus</i> spp	>100-530	SI	SI	Es el método de elección para la obtención de plásmidos de elevado Pm (rendimiento:decenas de microgramos-mg)	<i>Infect Immunol</i> , 1981

Este método está limitado a la obtención de plásmidos en alto o medio número de copias y de peso molecular <50 kb. Algunos microorganismos grampositivos como estreptococos, actinomicetos, rododoccos o nocardias pueden resultar difíciles de lisar, empleándose en estos casos el **método de Chassy** que incluye un pretratamiento con lisozima y PEG para hacer a las células sensibles a la acción de los detergentes.

Un método rápido que permite la extracción de plásmidos CCC de grampositivos y gramnegativos con un amplio rango de peso molecular es el **método de Kado y Liu** que combina tratamiento a elevado pH con una elevada temperatura (55°C) lo cual tiene el efecto de reducir la obtención de ADN cromosómico en la preparación final. Las proteínas residuales obtenidas en el proceso se eliminan por extracción con fenol:cloroformo lo cual puede inhibir la digestión posterior con enzimas de restricción.

La extracción de plásmidos por calor (**método de "boiling" o de Holmes y Quigley**) se utiliza para extraer ADN plasmídico de un gran número de muestras empleando pequeños volúmenes (*minipreps*). El ADN suele ser de calidad inferior al obtenido con otros métodos. Las bacterias se lisan tras tratamiento con lisozima, tritón y calor. El ADN cromosómico queda en la pared celular y se elimina por centrifugación. El ADN plasmídico queda en el sobrenadante y se precipita con isopropanol.

Para la extracción de plásmidos de mayor peso molecular se utilizan modificaciones de los métodos de lisis alcalina o de "boiling" con un paso de purificación posterior (ver apartado 5.1.1.3) o distintos métodos a gran escala que incluyen una lisis suave y purificación posterior del ADN con CsCl (tabla 2). La detección y determinación del peso molecular de megaplásmidos se realiza por el **método de Barton** que permite la separación de plásmidos de hasta 600 kb y consiste en el análisis del ADN por PFGE tras digestión con S1 nucleasa.

**4.1.1.3. Purificación del ADN.** La mayoría de los plásmidos obtenidos con *minipreps* no requieren purificación posterior ya que permiten obtener una cantidad de ADN suficiente para la digestión enzimática, transformación, aislamiento de fragmentos específicos y/o generación de sondas. Sin embargo, los plásmidos de elevado peso molecular (>20 kb) siempre deben purificarse. El método de elección es la centrifugación en gradiente de cloruro de cesio-bromuro de etidio (CICs-BrEt). Debido a su excesivo coste y duración y la imposibilidad de aplicación a un elevado número de muestras se han desarrollado otros métodos que incluyen el uso de resinas de intercambio iónico, HPLC o precipitación diferencial con polietilenglicol (PEG). Las resinas están disponibles comercialmente (equipos QIAGEN Plasmid Midi, Maxi, Mega y Giga, distribuidos por IZASA) y permiten la extracción y purificación de plásmidos de hasta 150 kb.

**4.1.1.4. Digestión del ADN plasmídico.** El estudio de las relaciones epidemiológicas entre diferentes plásmidos se lleva a cabo por comparación de sus

patrones de huella dactilar ("*plasmid fingerprinting*") generados tras la digestión del dsADN plasmídico (formas CCC) con enzimas de restricción (ER). Para que los resultados puedan ser interpretables, los patrones deben tener entre 5 y 10 bandas. Dado que en la mayoría de los casos la secuencia de los plásmidos se desconoce, la elección del/los ER ha de realizarse inicialmente de forma empírica.

**4.1.1.5. Determinación del peso molecular de plásmidos.** La estimación del tamaño molecular de un plásmido se realiza por comparación de la movilidad electroforética en geles de agarosa de sus formas CCC con la de plásmidos de tamaño molecular conocido o por la suma del tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos tras digestión enzimática. La determinación del tamaño de plásmidos lineales ha de realizarse por electroforesis de campo pulsante. En general, es necesario:

- *Calcular la movilidad electroforética:* se define midiendo las distancias de migración de los fragmentos de ADN (en mm) sobre la fotografía de los geles o de las imágenes.

- *Construir una curva de calibración* en la que se representa la distancia recorrida (en mm) de los controles utilizados frente a sus pesos moleculares (en kbp). La curva ha de ser una línea recta para permitir una correcta determinación de los valores objeto de estudio por interpolación. Existen distintos métodos matemáticos lineales que incluyen el  $\log_{10}$  del tamaño molecular *versus* la movilidad, el  $\log_{10}$  del tamaño molecular *versus* el  $\log_{10}$  de la movilidad, y el tamaño molecular *versus* el valor recíproco de la movilidad. Este último es uno de los más precisos, especialmente cuando se aplica con el método de mínimos cuadrados adaptado a los ordenadores personales. Finalmente, el tamaño molecular de los fragmentos correspondientes se determina por interpolación de las distancias recorridas sobre la curva de calibración obtenida con los valores de los controles.

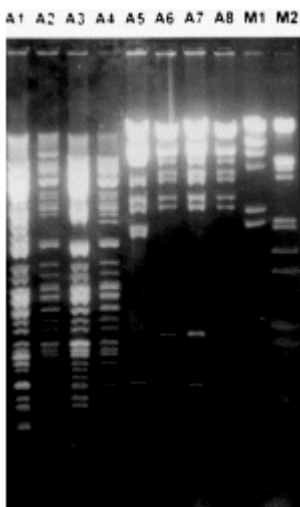
- Los nuevos *sistemas de captación y análisis de imágenes* digitalizadas ampliamente utilizados en la actualidad como el *Phoretix™ gel análisis software package* (NonLinear Dynamics USA, Newcastle, UK) o el *Applied Mathematics* (BioRad, Birmingham, UK) permiten el cálculo computerizado de los pesos moleculares, el análisis de gran número de muestras y la comparación de muestras en distintos geles de forma directa.

#### **4.1.2. Criterios para la interpretación de los resultados**

**4.1.2.1. Análisis de plásmidos sin restricción.** La obtención de perfiles plasmídicos idénticos o muy similares en diferentes aislados debe ser interpretada con precaución ya que no siempre refleja una relación epidemiológica entre los mismos. Hay que tener presente que especies bacterianas próximas evolutivamente adquieren con frecuencia plásmidos similares y que determinados patrones plasmídicos pueden ser muy estables en

determinadas especies como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.

4.1.2.2. Análisis de perfiles de plásmidos tras restricción. Se realiza por comparación de los polimorfismos genéticos obtenidos tras la digestión enzimática del ADN plasmídico. A diferencia de lo que sucede con el ADN *genómico*, no existen criterios que establezcan el número de bandas que deben compartir dos plásmidos para ser considerados idénticos o posiblemente relacionados. En general, consideramos que dos plásmidos están genéticamente relacionados cuando comparten  $\geq 3$  sitios de restricción para un ER determinado y generan el mismo número de bandas de igual peso molecular. Esto suele confirmarse al menos para 2 ER diferentes (figura 2).



**Figura 2.** Análisis de polimorfismos plasmídicos. (Método de *Birnboim Doly* y purificación posterior con resinas de intercambio iónico). Electroforesis en gel de agarosa de los patrones de bandas correspondientes a plásmidos de diferentes clones de *Klebsiella pneumoniae* productores de TEM-4 tras digestión enzimática con *EcoRI* y *PstI*. Este ensayo permitió demostrar una epidemia plasmídica en nuestra institución. El ADN plasmídico fue obtenido a partir de transconjugantes utilizando como cepa receptora *E. coli* BM21; línea A1-A4, ADN plasmídico obtenido de cuatro clones de *K. pneumoniae* tras digestión enzimática con *PstI*; línea A5-8, ADN plasmídico obtenido de cuatro clones de *K. pneumoniae* tras digestión enzimática con *EcoRI*; línea M1, marcador de peso molecular II (Roche Diagnostics) y línea M2, ADN marcador de peso molecular III (Roche Diagnostics). Tres de los plásmidos tenían perfiles idénticos y el otro difería en 2 bandas con respecto a este perfil utilizando diferentes enzimas de restricción, lo cual permitió establecer la relación epidemiológica de éste con el perfil de los plásmidos anteriores. (Imagen tomada de *Coque et al, Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:500*).

Es importante tener en cuenta que:

- La obtención de patrones de bandas similares no siempre indica una relación epidemiológica entre plásmidos; y que diferentes plásmidos portadores de los mismos transposones y/o integrones pueden tener fragmentos comunes. Por ello, es importante considerar siempre la

posible presencia de otros elementos de transmisión horizontal "epidémicos".

- La hibridación cruzada de un plásmido con otro es el método de elección para determinar la homología entre los mismos. No obstante, ha de interpretarse con precaución ya que una hibridación positiva en fragmentos de alto peso molecular puede deberse a una homología en regiones mucho más pequeñas contenidas en los mismos. Para evitar interpretaciones erróneas, es conveniente realizar la hibridación cruzada sobre ADN plasmídico digerido con enzimas que generen un gran número de fragmentos.

#### 4.1.3. Indicaciones para la aplicación del análisis de plásmidos

El análisis del contenido total plasmídico fue una de las técnicas epidemiológicas moleculares más utilizadas en los años 70 y 80 para la investigación de brotes epidémicos. En la actualidad apenas se utiliza con este fin, debido a la introducción de otras técnicas y a las limitaciones que presenta. En la actualidad las indicaciones de mayor utilidad serían: establecer la relación epidemiológica entre plásmidos diferentes aislados de la misma o diferente especie bacteriana y ayudar a la localización de otros elementos extracromosómicos (transposones, integrones).

#### 4.1.4. Inconvenientes de la técnica

El análisis plasmídico puede presentar una serie de inconvenientes prácticos y de interpretación de los resultados obtenidos.

1. Su utilidad está restringida a aislados que contengan plásmidos.
2. Los plásmidos son inestables en determinadas especies o clones.
3. El análisis de plásmidos de elevado peso molecular precisa técnicas que requieren tiempo (sólo permiten el análisis de un limitado número de muestras por jornada de trabajo) y personal especializado.
4. La presencia de diferentes formas plasmídicas en una preparación puede dificultar la identificación de sus correspondientes bandas. Las formas OC suelen ser muy frecuentes en preparaciones almacenadas durante largo tiempo y en plásmidos de alto peso molecular. En numerosas ocasiones es difícil establecer si una banda corresponde a una forma CCC o OC, lo cual puede complicarse al comparar preparaciones de plásmidos diferentes (figura 1- vista anteriormente).

#### 4.2. ANÁLISIS DE OTROS ELEMENTOS DE TRANSMISIÓN HORIZONTAL

La diseminación de genes de resistencia puede realizarse a través de elementos de transmisión horizontal diferentes de los plásmidos. También se denominan *elementos transponibles* (ETH) y se caracterizan por su capacidad de movilización entre distintas regiones del genoma de una célula bacteriana y/o entre diferentes regiones del genoma de diferentes clones bacterianos de igual o diferente especie. Estos elementos frecuentemente dan lugar

a polimorfismos en los perfiles de ADN plasmídico o de ADN genómico que pueden interpretarse como la introducción de nuevas cepas o de nuevos plásmidos en lugar de un intercambio genético de "ETH epidémicos" entre cepas o plásmidos endémicos de cada institución.

De forma general, los ETH o elementos transponibles se pueden clasificar según su mecanismo de transposición y estructura en los siguientes tipos:

**Clase I.** Incluyen las secuencias de inserción (IS) y los transposones compuestos que consisten en una secuencia de ADN flanqueada por 2 IS que pueden ser iguales o distintas (ej., Tn5, Tn10 que confieren resistencia a bleomicina-estreptomina y tetraciclina, respectivamente).

**Clase II.** Incluyen transposones que carecen de IS reconocibles en sus extremos (ej., Tn1546 y Tn5382 que confieren resistencia a glicopéptidos).

**Clase III.** Bacteriófagos transponibles (fago Mu)

**Transposones conjugativos.** Difieren de los anteriores por su estructura y mecanismo de translocación. Son más similares a plásmidos y fagos que a los otros elementos transponibles (ej., Tn916).

**Otros elementos.** Comparten características con alguno de los grupos anteriores e incluyen integrones, intrones y plásmidos integrativos.

El análisis con fines epidemiológicos se lleva a cabo cuando sospechamos la presencia de un ETH epidémico específico tratándose normalmente de transposones de clase II e integrones (ej., Tn1546 y Tn5382 en enterococos con fenotipos de resistencia VanA y VanB, respectivamente, integrones de clase 1 en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido de tipo CTX-M). La presencia de integrones (clase 1 y 2), de transposones de clase I y de secuencias indicativas de elementos móviles como integrasas (*int*), secuencias de inserción (IS) o transposición (*tnp*) es frecuente en el cromosoma y en plásmidos de aislados hospitalarios y en muchas ocasiones no está relacionada directamente con el ETH que contiene el gen de resistencia objeto de nuestro interés. En la tabla 3 se resumen algunos de los ETH implicados en la diseminación epidémica de genes de resistencia antibiótica.

El análisis de ETH suele estar limitado a centros de referencia y laboratorios interesados en determinar el modo de transmisión y la evolución de estos elementos. Requiere personal entrenado en técnicas de biología molecular. Su aplicación va en aumento en los laboratorios de microbiología interesados en la epidemiología molecular de la resistencia a los agentes antimicrobianos.

#### **4.2.1. Indicaciones para el análisis epidemiológico de ETH**

El análisis de ETH con fines epidemiológicos se realiza con 2 objetivos principales:

4.2.1.1. Identificación de ETH epidémicos (en aislados bacterianos de igual o diferente especie). Se han descrito múltiples estrategias que combinan

diferentes técnicas moleculares. Las más utilizadas son:

*Comparación de los polimorfismos de ETH obtenidos por amplificación de la secuencia completa del elemento y posterior digestión enzimática.* Las condiciones específicas dependen del tamaño molecular y la secuencia del ETH y de la especie bacteriana en que se encuentra. Para ETH de 3,5-5 kb aplicaremos PCR con polimerasas "hot-start"; para ETH de 5-30 kb utilizaremos L-PCR (Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics). Los cebadores y las enzimas de restricción a utilizar dependen del elemento. Pueden diseñarse en el propio laboratorio o, en el caso de elementos conocidos, utilizar condiciones previamente publicadas.

*Comparación de los patrones de amplificación de secuencias parciales del ETH que cubren toda la estructura del elemento (PCR overlapping).* Los amplicones deben compartir sus secuencias terminales para poder concluir su pertenencia al mismo ETH. La secuenciación de fragmentos específicos resulta necesaria para: i) confirmar la asociación de un gen de resistencia al ETH, ii) identificar alteraciones en regiones específicas (mutaciones, inserciones o deleciones).

Las condiciones experimentales dependen del ETH a analizar.

*Comparación de los polimorfismos obtenidos por amplificación de la secuencia completa del elemento, posterior digestión enzimática e hibridación con sondas específicas.* Presenta una mayor dificultad técnica que las anteriores. Se ha utilizado para la caracterización de los distintos ETH diseminados mundialmente (figura 3).

4.2.1.2. Localización de ETH en el genoma bacteriano. En ocasiones, es necesario caracterizar un brote epidémico por ETH lo cual incluye la localización de los mismos en el genoma de distintos aislados. La estrategia más común es la transferencia por *Southern blot* de geles con ADN genómico digerido enzimáticamente y de geles con ADN plasmídico y una posterior hibridación con sondas específicas para el gen de resistencia y, en algunos casos, para genes específicos del cromosoma.

#### **4.2.2. Criterios para la interpretación de resultados**

- Alteraciones en los patrones de amplificación y/o restricción de un ETH indican mutaciones, inserciones o deleciones respecto a la secuencia inicial del elemento. Se han de confirmar por hibridación y/o secuenciación de fragmentos específicos.

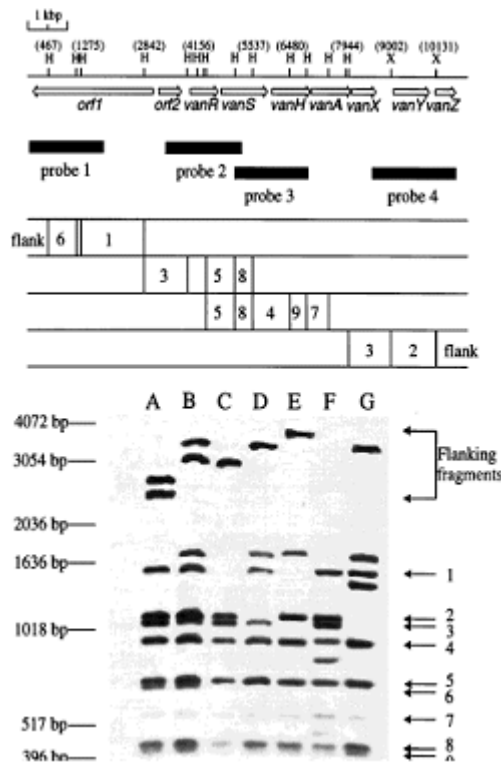
- La localización de un ETH en el genoma presenta dificultades debido a la frecuente contaminación de las preparaciones de ADN plasmídico con ADN cromosómico y a la presencia de ADN plasmídico en

**TABLA 3. Algunos ETH implicados en la diseminación epidémica de genes de resistencia**

ETH	Elemento	Tamaño (kbp)	Resistencia principal		Otras resistencias <sup>a</sup>	Microorganismos	Comentarios
			Fenotipo	Genotipo			
In60	Integron clase 1	13	BLEE clase A (cefotaximasa)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	Tmp, Sm, Spec	<i>Enterobacteriaceae</i>	ETH epidémico en España
InS21	Integron clase 1	8,8	BLEE clase A (cefotaximasa)	<i>bla</i> <sub>CTXM-2</sub>	β-lac, Ag	<i>Enterobacteriaceae</i>	ETH epidémico en Argentina
-	Integron clase 1 (distintos integrones descritos)	Variable	BLEE clase A	<i>bla</i> <sub>GES-1</sub>		<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No descrito en España pero sí en Europa. Ejemplo de diseminación de genes en distintos ETH
In36, In37	Integron clase 1	13 (In36) 14,8 (In37)	Quinolonas	<i>qnr</i>	In36 (Tmp, β-lac, Ag, Su) In37 (Ag, Cm, Rf, β-lac, Su)	<i>Escherichia coli</i>	ETH encontrado en China
In31 y otros	Integron clase 1	Variable	BLEE clase B	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> <i>bla</i> <sub>IMP-2</sub>	In31 (Ag, Cm, Su) Otros ( variable)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Acinetobacte</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i>	No descrito en España pero sí en Europa.y otros continentes Ejemplo de diseminación de gen de resistencia y variables alélicas en distintos ETH
<i>Tn1207.1</i>	Transposon clase II	7,2	macrólidos	<i>mef</i> (A)	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ETH epidémico en Italia
Mef(E) "macrolide efflux genetic assembly [the mega-element]"	Transposon clase II	5,5	macrólidos	<i>mef</i> (E)	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Tn1546</i>	Transposon clase II	10,8	VanA (Van, Tei)	<i>vanA</i>	-	<i>Enterococcus spp</i> , <i>Oeskorvia</i> , <i>Streptococcus spp</i> , Lactococci <i>Corynebacterium</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	- ETH epidémico en Europa. - Gran polimorfismo genético específico de área geográfica.
<i>Tn1547</i>	Transposon clase I	Variable	VanB (Van)	<i>vanB</i>	-	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. gallolyticus</i>	ETH epidémico en Europa.
<i>Tn5382</i>	Transposon clase I	27	VanB (Van)	<i>vanB</i>	(Amp) <sup>b</sup>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. gallolyticus</i>	ETH epidémico universalmente Extraordinario polimorfismo genético específico de área geográfica.
<i>Tn5381</i>	Transposon clase I	4,7	HLRGm	<i>aac</i> (6')- <i>aph</i> (2')	-	<i>E. faecalis</i> ,	ETH epidémico universalmente
<i>SCC-mec</i>						<i>Staphylococcus aureus</i>	

(<sup>a</sup>)Tmp = trimetoprim, Sm= estreptomycin , Spec= Espectinomycin, Ag= aminoglicósidos, Su = sulfamidas, β-lac = beta-lactámicos, HLRGm = alto nivel de resistencia a gentamicina, Cm = cloranfenicol, Rf = rifampicina. (<sup>b</sup>) *Tn5382* presente en los aislados clínicos de *Enterococcus faecium* descritos en EEUU está asociado al gen que confiere resistencia a la ampicilina (*pbp5*). Esta estructura *pbp5-Tn5382* se disemina como un ETH *per se* dando lugar a resistencia a glicopéptidos y ampicilina.





**Figura 3.** Polimorfismos genéticos en el Tn1546 tras digestión con enzimas de restricción y posterior hibridación con sondas específicas de regiones parciales de este elemento. En la parte superior está representado el Tn1546. Las líneas gruesas negras representan las sondas utilizadas y su correlación con las secuencias del elemento. Los números del 1-9 representan los fragmentos tras hibridación con las sondas anteriores. Las letras sobre los pocillos de la membrana reflejan los polimorfismos de Tn1546 encontrados (imagen reproducida con permiso del autor, *Willems et al. 1999. Antimicrob. Agents Chemother 1999; 43:483-91*).

las preparaciones de ADN genómico. La hibridación con sondas correspondientes a genes específicos de cromosoma o de plásmidos evita este problema.

#### 4.3. BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor press. 1989.
2. Threlfall EJ, Woodford N. Plasmid profile typing and plasmid fingerprinting. En: Howard J, Whitcombe DM (editores). *Methods in Molecular Biology. Diagnostic bacteriology protocols*. Totowa, NJ.: Humana Press Inc. Vol 46: p. 225-236.
3. Murray BE, Hodel-Christian SL. Bacterial Resistance: Theoretical and practical considerations, characterization of R plasmids, and detection of plasmid-specified genes. En: Lorian V (editor). *Antibiotics in Molecular Medicine*.
4. Platt DJ, Chesham JS, Brown DJ, Kraft CA, Taggart J. Restriction enzyme fingerprinting of enterobacterial plasmids: a simple strategy with wide application. *J Hyg (Lond)*. 1986; 97:205-210.
5. Rochelle PA, Fry JC, Day MJ, Bale MJ. An accurate method for estimating sizes of small and large plasmids and DNA fragments by gel electrophoresis. *J Gen Microbiol* 1985; 132:53-59.
6. Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM. *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington, D.C. 2002.

#### 5. ANÁLISIS DEL ADN MEDIANTE PROCEDIMIENTOS DE RESTRICCIÓN E HIBRIDACIÓN

Con el fin de evitar la contaminación de su genoma por ADN exógeno, las bacterias han desarrollado un sistema de protección basado en los enzimas de restricción, que reconocen una secuencia específica de nucleótidos de unos 4 a 8 pares de bases (pb)

dando lugar a un corte en la molécula de ADN a este nivel. A la secuencia específica reconocida por cada enzima se le conoce como lugar de restricción. Este sistema de protección se complementa con una metilación del ADN propio de la bacteria a nivel del lugar de restricción para evitar que sea digerido por su propio enzima de restricción.

Cuando se digiere una molécula de ADN con un enzima de restricción se obtienen un número de fragmentos equivalentes a las veces que se encuentra repetido el lugar de restricción a lo largo de la molécula. Esta frecuencia depende del número de pb del lugar de restricción así como de la proporción relativa de los nucleótidos ATGC del lugar de restricción en relación con la del ADN digerido. Así, la probabilidad de encontrar un lugar de restricción de 6 pb en una molécula de ADN es de una vez por cada 4096 pb, mientras que un lugar de restricción de 4 pb se da cada 256 pb. Por otra parte, el lugar de restricción del enzima *SmaI*, CCCGGG, se encuentra menos representado de lo previsible en el cromosoma de los estafilococos dada la pobreza en GC de su genoma (%GC 38).

El tamaño de los distintos fragmentos de restricción traduce la separación entre dos lugares de restricción contiguos. Un cambio por mutación o recombinación, en uno de estos lugares de restricción lo hace irreconocible para el enzima y se traduce en una variación del perfil de fragmentos de restricción que es el responsable del polimorfismo existente entre las distintas cepas.

Este perfil también variará si existen deleciones o inserciones de ADN entre dos lugares de restricción.

La comparación de cepas para detectar el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) se consigue separando los fragmentos obtenidos mediante una electroforesis en un gel de agarosa que se tiñe con bromuro de etidio. Cada banda corresponde a la suma de todos los fragmentos generados del tamaño correspondiente a aquella movilidad electroforética.

Podemos dividir a los enzimas de restricción para una especie concreta, en aquellos que darán lugar a un gran número de fragmentos (cientos) de pequeño tamaño y aquellos cuyo lugar de restricción estará poco representado en el genoma y darán pocos fragmentos (10 a 30) de gran tamaño. Los fragmentos de pequeño tamaño obtenidos con los enzimas de alta frecuencia de corte pueden separarse por electroforesis convencional mientras que los fragmentos de gran tamaño (>40 kb) co-emigran en una única banda en la electroforesis convencional y se deben separar con técnicas electroforéticas especiales como la electroforesis con alternancia de campos eléctricos o electroforesis de campo pulsante.

Cuando se separan por electroforesis en un gel los fragmentos de restricción del ADN total obtenidos con un enzima con alta frecuencia de corte, se obtiene un número tan elevado de fragmentos que es muy difícil, si no imposible, resolver las bandas existentes. Ello dificulta enormemente la comparación de los perfiles de las distintas cepas invalidando, en cierta forma, la utilidad de esta técnica. Una alternativa para simplificar la interpretación de los RFLP del ADN total, consiste en centrarse en una zona concreta del genoma en lugar de estudiar todo el cromosoma. Para ello, se realiza una transferencia de los fragmentos de restricción del ADN total obtenidos a una membrana (*Southern-blot*) que se analiza mediante hibridación con una sonda marcada complementaria del fragmento cuyo polimorfismo se quiere estudiar. El revelado de la hibridación tan solo pondrá en evidencia aquellos fragmentos que contengan la totalidad o parte de la secuencia escogida, obteniéndose perfiles con pocas bandas. El número de bandas estará en relación con el número de copias de la secuencia existentes en el genoma mientras que su polimorfismo estará en relación con su distribución a lo largo del genoma, así como con las variaciones en los lugares de restricción dentro de esta secuencia y en las regiones más próximas. Tanto la transferencia de *Southern* como la hibridación complican notablemente los aspectos técnicos del análisis.

### 5.1. FUNDAMENTOS Y VARIANTES TÉCNICAS

Cuando se quieren utilizar las técnicas de restricción-hibridación para la tipificación molecular de un determinado microorganismo, el paso más importante es la elección de la sonda a utilizar. Hay que conocer con precisión el poder de discriminación de la sonda, esto es, el nivel de relación genética que puede resolver. Además, este conocimiento debe adquirirse para cada nuevo taxón que se quiera estudiar. Se han utilizado varias aproximaciones a la

hora de diseñar sondas que exploren los fragmentos de restricción del ADN total. El fragmento analizado (y por consiguiente su sonda complementaria), puede ser específico de una especie determinada o, en el caso del ribotipado, utilizar una sonda única para todas las bacterias, complementaria de los operones de 16 y 23S RNA de *E. coli* (regiones del cromosoma que codifican el ARN ribosómico). Se aprovecha el hecho de que en estos operones existen zonas muy conservadas para utilizar la misma sonda para el análisis de la gran mayoría de especies bacterianas.

#### 5.1.1. Hibridación con sondas específicas

En el diseño de sondas específicas para un determinado microorganismo se han utilizado, entre otras, sondas clonadas al azar, sondas complementarias de un gen, o sondas complementarias de elementos transponibles como las secuencias de inserción. La clonación al azar de fragmentos de genoma y su uso como sonda exige un trabajo inicial de cribado importante antes de encontrar un fragmento que explore una zona suficientemente estable y discriminativa del genoma. Las sondas que exploran supuestos genes de patogenicidad o las regiones que los flanquean suelen ser poco discriminativas. Las secuencias de inserción son elementos repetitivos de ADN que se encuentran en muchas células procariontas y eucariotas. La presencia de elementos repetitivos facilita las reorganizaciones cromosómicas y da lugar a diversidad. En algunas bacterias con gran homología cromosómica, como *Mycobacterium tuberculosis*, el uso de patrones de restricción-hibridación asociados a secuencias de inserción es de las pocas técnicas capaces de diferenciar entre cepas. En este sentido, existe un protocolo estandarizado para el estudio de los RFLP asociados a IS6110 con el que se han creado bases de datos locales y en el ámbito internacional que han permitido conocer mejor la difusión de este microorganismo así como determinados aspectos de su patogenicidad. A fin de aumentar la reproducibilidad de la técnica, el peso molecular de las bandas de cada patrón se obtiene por extrapolación a partir de un estándar interno que se incluye en cada canal y que exige una segunda hibridación con una sonda complementaria del mismo (ver documento técnico).

#### 5.1.2. Ribotipado

Los genes que codifican para las tres clases de rARN (23S, 16S y 5S) se encuentran en una unidad de transcripción policistrónica: el operón *rrn*. El orden de los genes, después del promotor, es 5'-16S-23S-5S-3'. Un operón típico de *E. coli* mide 6.000-7.000 pb de ADN. En el cromosoma bacteriano se encuentran un número variable de copias del operón *rrn* (entre 2 y 11) según la especie, aunque existen especies como *Mycobacterium spp*, *Mycoplasma* o *Borrelia burgdorferi* en las que solo se encuentra una copia. Como veremos más adelante, cuanto mayor es el número de copias, mayor es la capacidad discriminativa del ribotipado.

Las secuencias de nucleótidos que codifican para el ARN 16S y 23S han cambiado muy poco a lo largo

de la evolución. Esto es, estas secuencias están muy conservadas en las distintas especies bacterianas a pesar de la diversidad que pueda existir en el resto del genoma. No obstante, entre los genes que codifican para el rARN 16S y 23S existe una región espaciadora heterogénea que codifica para tARN y secuencias repetidas. También existen genes que codifican para tARN en la región 3' del operón. Así pues, la estructura del operón *rrn* permite, por una parte, que sea reconocido por una sonda universal (derivada de *E. coli*) y, por la otra, que se generen polimorfismos de restricción en función de la heterogeneidad que se ha comentado para las secuencias espaciadoras y el entorno 3'. Algunos de los polimorfismos observados son específicos de especie mientras que otros permiten discriminar a nivel infraespecífico. En este sentido, el ribotipado puede tener aplicaciones tanto taxonómicas como epidemiológicas. Es de destacar que existe un sistema automatizado (*Riboprinter. Qualicon Inc.* Wilmington. EEUU) que facilita el proceso y estandariza el sistema lo que favorece la creación de bases de datos.

## 5.2. PROCEDIMIENTO TÉCNICO

En los métodos de restricción-hibridación pueden diferenciarse los siguientes pasos: 1) Subcultivo de la cepa. 2) Lisis celular. 3) Preparación del ADN genómico. 4) Digestión con enzimas de restricción. 5) Electroforesis. 6) Transferencia de los fragmentos de restricción a una membrana. 7) Hibridación con una sonda marcada. 8) Revelado. 9) Análisis de resultados. El protocolo de trabajo de algunos de ellos dependerá del microorganismo que se esté analizando por lo que sólo se comentarán los aspectos generales.

5.2.1. Subcultivo de la cepa: Cada vez existen mayores evidencias de que en una muestra clínica pueden coexistir varias cepas de la misma especie. Por ello es importante la observación atenta de las placas de aislamiento para la identificación y subcultivo de los distintos morfotipos e incluso, cuando la apariencia es homogénea, en determinados estudios es prudente el análisis de varias colonias del mismo morfotipo. El subcultivo se realiza en un medio líquido adecuado para el microorganismo estudiado y una vez en la fase estacionaria (generalmente a las 18 horas) se sedimentan las células bacterianas por centrifugación procediéndose a su lavado.

5.2.2. Lisis bacteriana: Para obtener el ADN es preciso romper la pared bacteriana. Para ello, el *pellet* (sedimento) obtenido se resuspende en un tampón de lisis adecuado que suele contener lisozima y un detergente (SDS al 1%). También se incluye proteinasa K que inactiva las nucleasas que podrían dañar el ADN.

5.2.3. Extracción del ADN total: Puede utilizarse el método clásico con fenol. En este caso se añaden dos volúmenes de fenol tamponado al tampón de lisis agitándose por inversión del tubo a fin de mezclar las fases acuosas y fenólica. Posteriormente se separan las dos fases por centrifugación y se

transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo, repitiéndose el procedimiento. Finalmente se añaden dos volúmenes de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) mezclándose cuidadosamente y, después de centrifugar, se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo. El ADN obtenido, después de añadir NaCl a una concentración final de 300 mM, se precipita con 2 volúmenes de etanol al 95% enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El *pellet* de ADN obtenido por centrifugación se lava con etanol al 70%, se seca y se resuspende con el tampón adecuado (generalmente Tris-HCL 10 mM a pH 7,5 con EDTA 1 mM). Alternativamente, el ADN puede obtenerse utilizando columnas de extracción comerciales en las que el ADN de la muestra queda retenido en la matriz y es eluido después de un lavado.

La cuantificación del ADN obtenido se realiza por espectrofotometría o sometiéndolo a electroforesis junto con otras alícuotas de concentración conocida y evaluando la intensidad de la banda obtenida. La concentración mínima para poder digerirlo es de 0,12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

5.2.4. Restricción del ADN: Unos 3  $\mu\text{g}$  de ADN se digerirán en 25  $\mu\text{l}$  de un tampón de reacción que contenga el enzima de restricción elegido. El tampón de reacción se elaborará siguiendo las instrucciones del fabricante. Es prudente aumentar la cantidad de enzima recomendada a fin de conseguir una digestión completa, que es imprescindible para obtener resultados reproducibles. La elección del enzima de restricción se hace en función de los datos existentes en la literatura. Cuando se analiza un taxón del que no existe experiencia previa se deberán estudiar varios enzimas hasta encontrar el que se adecue a nuestras necesidades.

5.2.5. Electroforesis: La electroforesis se realizará en un gel de agarosa cuyo porcentaje dependerá del tamaño de los fragmentos que se han de resolver, lo que a su vez depende del tamaño del genoma del microorganismo estudiado y del enzima de restricción utilizado. Antes de cargar el gel se añadirá a cada ADN digerido 3  $\mu\text{l}$  de tampón de carga. El tampón de carga contiene un colorante de bajo peso como el azul de bromofenol que migra cerca del frente de la muestra y permite monitorizar la separación electroforética. Uno de los tampones de electroforesis más utilizados es el TBE (Tris-HCL 89 mM a pH 8,1 con  $\text{H}_3\text{BO}_3$  89 mM y EDTA 2 mM). En cada gel deben incluirse marcadores de peso molecular con un rango de tamaños que permita extrapolar el peso de las bandas de hibridación obtenidos. Estos marcadores pueden ser externos, esto es correr en un canal propio, o internos. En el caso de marcadores externos se utilizan cepas control con patrones conocidos ya que hibridarán con la sonda utilizada. Los marcadores internos corren con la muestra en cada carril y deben evidenciarse con una segunda hibridación que utiliza una sonda complementaria de los mismos (ver documento técnico). Para visualizar la separación electroforética de los fragmentos de restricción, el gel se sumerge durante una hora en una solución de 0,2

µg/ml de bromuro de etidio. La visualización de los fragmentos obtenidos se consigue con luz UV. Esta visualización permite, por una parte, controlar que la digestión ha sido completa y, por otra, que la separación electroforética ha sido correcta. Es importante conseguir una imagen digitalizada del gel.

**5.2.6. Transferencia:** Los fragmentos de restricción visualizados se encuentran en el interior de la matriz del gel y no son accesibles para la sonda que se utilizará en la hibridación. Por ello es necesario primero transferirlos del gel a la superficie de una membrana en un proceso conocido como transferencia o *Southern blot*. Se procede en primer lugar a la depurinación y fragmentación de los ácidos nucleicos con HCl 0,25 M, a continuación el gel se lava con agua y se sumerge en una solución de NaOH 0,5 M y ClNa 1,5 M para desnaturalizar el ADN. A continuación se pueden transferir los fragmentos de restricción a una membrana mediante diversos procedimientos como la transferencia por capilaridad o mediante el vacío (figura 4). Puede comprobarse la transferencia visualizando el gel con luz UV y comprobando que no queda ADN en el mismo.

**5.2.7. Hibridación:** La sonda que se utilizará en la hibridación es complementaria de la región cuyo polimorfismo analizamos. Generalmente se obtiene en el propio laboratorio por técnicas de amplificación (ver documento técnico). Clásicamente las sondas se marcaban con isótopos radioactivos y los híbridos resultantes se detectaban mediante autoradiografía. En la actualidad se utiliza, en general, el marcado con peroxidasa. Se procede en primer lugar a la desnaturalización de la sonda obteniéndose monocadenas cargadas negativamente. La peroxidasa formando un complejo con un polímero con carga positiva se une inicialmente al ADN por carga electrostática y posteriormente de forma covalente por la acción del glutaraldehído. Los

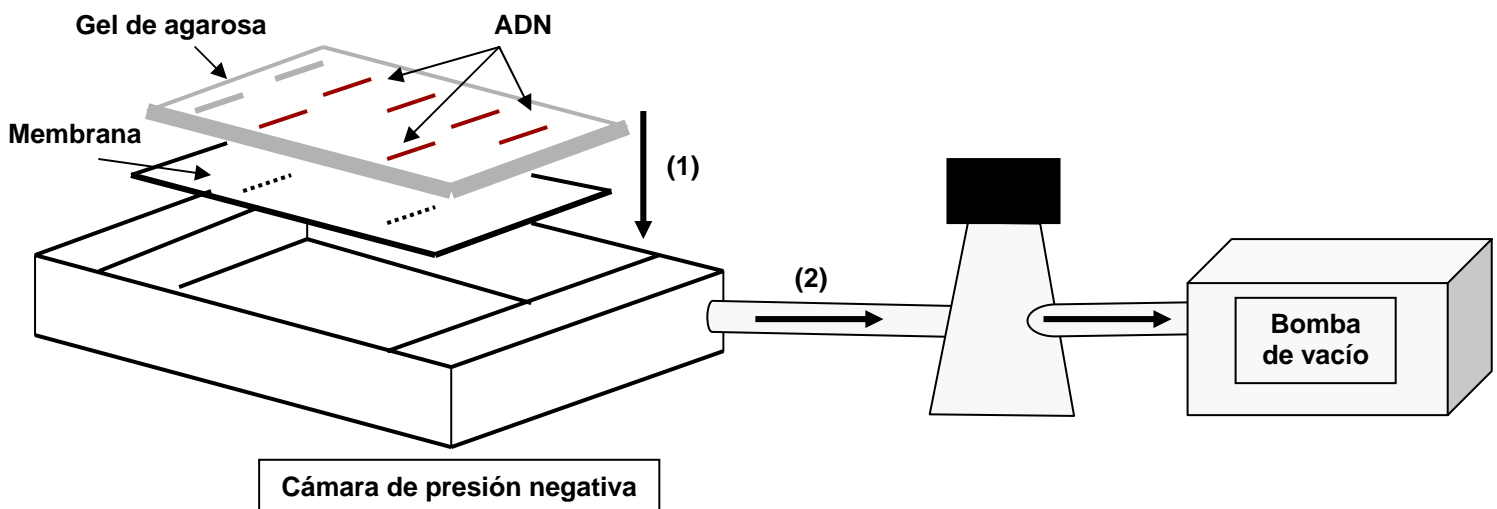
híbridos resultantes se detectan por la oxidación de luminol por la peroxidasa que, en presencia de un compuesto intensificador da lugar a la emisión de luz que se detecta por autoradiografía. Sea cual sea la forma de marcado de la sonda, antes de la hibridación la membrana debe ser tratada con un tampón de hibridación que contenga esperma de salmón, timo de ternero u otra fuente de ADN que bloquee los sitios libres de la membrana e impida la fijación inespecífica de la sonda.

La hibridación se realiza a continuación añadiendo al mismo tampón la sonda marcada. Un tampón de hibridación estándar contiene NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH7,5), EDTA 50 mM, NaCl 0,9 M, sulfato de dextrano al 5% y SDS al 3%. La hibridación tendrá lugar en tubos de hibridación en el interior de un horno de hibridación a unos 65°C durante 16-24 h. Una vez finalizada, se lavará la membrana con un tampón de lavado que contiene NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M (pH 7,0) y SDS al 2% a 45°C.

**5.2.8. Revelado:** El patrón de hibridación se visualiza exponiendo la membrana a una película fotográfica en el interior de un *cassette* con pantallas intensificadoras (autoradiografía). Una vez expuesta, la película se revela y fija con reactivos fotográficos. En función del tiempo de exposición y de revelado se podrá modular la intensidad de las imágenes obtenidas.

### 5.3. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El estudio de los RFLP por técnicas de hibridación generalmente da lugar a perfiles con un número limitado de bandas. El análisis de estos patrones puede hacerse teniendo en cuenta el número absoluto de las diferencias observadas en las bandas o bien mediante el porcentaje de similitud de los patrones que suele calcularse mediante el índice de Dice (apartado 3.1.4).



**Figura 4.-** *Southern blot* o transferencia de ADN utilizando un sistema de vacío: los fragmentos de ADN contenidos en un gel de agarosa, previamente tratado, son *transferidos* a una membrana, de nylon o nitrocelulosa, con ayuda de la presión creada por una cámara conectada a una bomba de vacío. Las flechas muestran la dirección en la que avanzan los fragmentos de ADN (1), desde el gel a la membrana, siguiendo la dirección de la presión generada por el sistema (2).

Pueden existir situaciones en las que, por el bajo número de bandas obtenido, la técnica no sea discriminativa. Así, por ejemplo, en *Mycobacterium tuberculosis*, el estudio de los RFLP asociados a IS6110 no es discriminativo en las cepas con menos de seis bandas y, en estos casos, deberán utilizarse marcadores alternativos.

Por otra parte, es muy importante la cuidadosa estandarización de la reacción ya que en distintos experimentos pueden darse diferencias en la cantidad de ADN estudiada, en la digestión, electroforesis, eficacia de la hibridación o del marcado de la sonda. Esta falta de estandarización afectará la reproducibilidad del marcador dando lugar a variaciones en los patrones siendo especialmente difícil la valoración de las bandas débiles.

Una vez sabemos que el marcador es discriminativo y hemos asegurado la reproducibilidad de la técnica, suelen considerarse cepas clonales las que comparten el mismo patrón de hibridación (figura 5). No obstante, hay que tener en cuenta que muchas de las sondas utilizadas son complementarias de elementos móviles. Por ello, en las cepas cuyos patrones se diferencian en una única banda se aconseja estudiarlas con un segundo marcador.

#### 5.4. INDICACIONES

En general, en las bacterias, no se recomienda la utilización de las técnicas de restricción-hibridación cuando existen alternativas menos complejas técnicamente y con capacidad de discriminación similar. Una notable excepción a esta regla es la epidemiología molecular de la tuberculosis. Existe un protocolo estandarizado para el estudio de los RFLP asociados a IS6110 en *M. tuberculosis* (véase documento técnico) y se han creado bases de datos locales e internacionales con miles de cepas. Este marcador ha permitido conocer mejor la

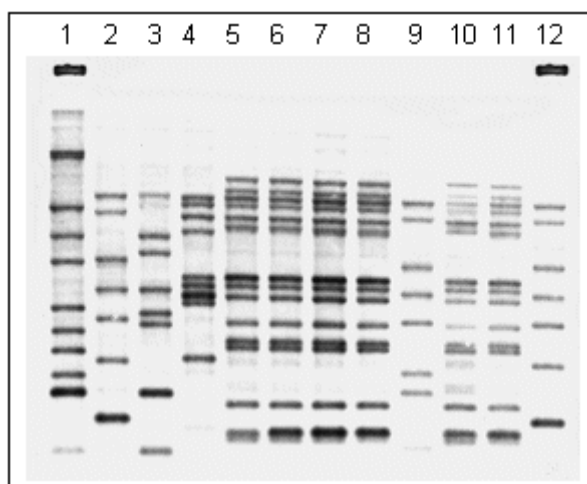
epidemiología de la enfermedad y seguir la pista de determinadas cepas caracterizadas por su resistencia o patogenicidad. A pesar de ello, incluso en este caso y teniendo en cuenta la dificultad de convertir las bases de datos existentes, existen propuestas para cambiar el marcador.

#### 5.5. INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA

El inconveniente fundamental de la restricción-hibridación es la complejidad técnica. Como se ha visto, conlleva la realización de numerosos pasos que retrasan varios días la obtención de resultados. Por otra parte, con la salvedad del ribotipado, cada sonda suele ser específica de una especie y a menudo no se dispone de sondas que exploren eficientemente el polimorfismo existente en un determinado taxón. El ribotipado, que sería una técnica "universal" suele tener una capacidad de discriminación inferior a otras técnicas como la electroforesis en campo pulsante.

#### 5.6. BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Van Belkum A, Struelens M, deVisser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 547-560.
2. Bingen EH, Denamur E, Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 311-327.
3. Hollis RJ, Bruce L, Fritschel SJ, Pfaller MA. Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 263-268.
4. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. J Appl Microbiol 2003; 94: 781-791.



**Figura 5.** Patrones de restricción-hibridación asociados a IS6110: Línea 1, cepa control MT1423. Obsérvese como las cepas de las líneas 5, 6, 7 y 8 comparten el mismo patrón constituyendo un *cluster*. Ello también ocurre con las cepas en las líneas 10 y 11.

## 6. ANÁLISIS DEL ADN CROMOSÓMICO MEDIANTE MACRORRESTRICCIÓN: ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE)

Como se ha expuesto en el apartado 5 (procedimientos de restricción e hibridación de ADN) para una especie bacteriana concreta, podemos encontrar enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana en cuestión. El uso de este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria y la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 kb, y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, en las que se aplica un campo eléctrico constante ó estático, sino que requieren técnicas en las que la orientación del campo eléctrico es variable periódicamente, son las denominadas técnicas de electroforesis en campo pulsante o *pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)*.

La combinación de estas dos técnicas, macrorrestricción del ADN y separación de los fragmentos por PFGE, se ha aplicado con mucha frecuencia en estudios epidemiológicos en bacteriología. Se obtienen así, patrones de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas. Sin embargo, las características de estas técnicas determinan una serie de cambios a tener en cuenta en las distintas fases en las que se divide el proceso de macrorrestricción y PFGE: 1) el procedimiento de extracción de ADN, obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa, en los que se llevará a cabo la lisis, de manera que el ADN cromosómico también quede embebido en agarosa, el objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fracture accidentalmente (al pipetear, agitar ...) lo cual desvirtuaría los patrones de restricción y afectaría a la reproducibilidad de la técnica, 2) la restricción del ADN debe hacerse tal y como éste está preparado, es decir, inmovilizado en los bloques de agarosa, utilizando enzimas de baja frecuencia de corte, y 3) la técnica de electroforesis utilizada para la separación de fragmentos debe ser una PFGE, con las características diferenciales propias de ésta.

### 6.1. TRATAMIENTO PREVIO DE LOS MICROORGANISMOS

Como se ha apuntado previamente, para poder obtener patrones de restricción reproducibles por PFGE que permitan la comparación de los genotipos de una serie de microorganismos, el objetivo es aislar el ADN cromosómico íntegro, sin fracturas y, a la vez, en las mejores condiciones de pureza para que los enzimas de restricción puedan cortar correctamente, evitando restricciones incompletas. Para ello deben observarse una serie de precauciones con relación al procesamiento y tratamiento previo de los microorganismos:

6.1.1. Crecimiento bacteriano. Los microorganismos se pueden obtener a partir de un cultivo en medio líquido o bien realizar una suspensión procedente de un medio sólido. En cualquier caso se debe tratar de cultivos puros, en medios no selectivos, de no más de 18-24 horas de incubación. Es conveniente estandarizar el inóculo mediante espectrofotometría (ver documento técnico correspondiente), ésta será una medida indirecta de la concentración de ADN que se obtendrá durante el procedimiento. Seguidamente, se mezcla parte del inóculo con el mismo volumen de agarosa de bajo punto de fusión fundida, y se deja solidificar en un molde especialmente diseñado para ello. De esta manera conseguimos inmovilizar un número de células bacterianas equivalente para cada cepa que incluimos en el estudio. A partir de este momento, el resto del procesamiento se realizará utilizando el bloque completo. La agarosa en la que se encuentran embebidas las células permite fluir a su través las soluciones de lisis o restricción en las que vamos a sumergir el bloque, y a la vez va a proteger las moléculas de ADN de la rotura mecánica y de la degradación nucleolítica.

6.1.2. Lisis. Para conseguir la lisis de los microorganismos, los bloques se sumergen en una solución de lisis que contenga los enzimas precisos para romper las células. La composición de la solución de lisis es variable en función de la especie bacteriana con la que estemos trabajando (ver documento técnico correspondiente). Como los enzimas deben actuar en el interior de la malla de agarosa en que están embebidas las células, se precisan enzimas más concentrados e incubaciones prolongadas.

6.1.3. Lavados. Una vez que las células están lisadas es preciso someter a los bloques a sucesivos lavados con una solución TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA ). Los lavados consisten en introducir los bloques en TE y agitarlos durante, al menos, 30 minutos, esta operación se repite cuatro o cinco veces. El objetivo de los lavados es arrastrar fuera del bloque de agarosa restos celulares procedentes de la lisis, así como eliminar componentes que puedan inhibir la restricción posterior (proteínasa K, detergente o EDTA). Algunos protocolos publicados para el procesamiento rápido de ciertas bacterias por PFGE, prescinden de los lavados y para ello se eliminan ciertos compuestos del procesamiento previo, como el tratamiento con proteínasa K.

6.1.4. Restricción. La actividad de los enzimas de restricción viene definida sobre ADN en ausencia de agarosa. En general, la presencia de agarosa conlleva cierto grado de inhibición de la reacción de digestión, por tanto es preciso aumentar el número de unidades de enzima por reacción. El tiempo de incubación de la reacción de restricción también debe incrementarse, teniendo en cuenta, no obstante, que algunos enzimas pierden su actividad tras las primeras horas de incubación. En este caso, se debería añadir a la reacción una segunda alícuota del enzima. En relación a la selección del enzima de restricción más adecuado, en estos momentos se

pueden encontrar en la bibliografía científica especializada publicaciones sobre prácticamente cualquier especie bacteriana estudiada por PFGE (en el anexo 3 del documento técnico correspondiente, se incluye una tabla con los microorganismos y enzimas más frecuentes para su estudio). A la hora de seleccionar un enzima de restricción para PFGE que genere pocos fragmentos de ADN y estos sean de gran tamaño, debe tenerse en cuenta que ello depende de la longitud y de la secuencia del lugar de restricción del enzima. En general, los enzimas con un lugar de restricción rico en G+C, son adecuados para tratar el ADN bacteriano de especies con genoma rico en A+T y, a la inversa, enzimas que reconocen secuencias A+T, son adecuados para digerir ADN rico en G+C. Sin embargo, en la práctica, es difícil predecir la utilidad de un enzima para estudiar por PFGE una determinada especie bacteriana. Por último, destacar que el estudio por PFGE de un grupo de cepas con un enzima de restricción primero, y con un segundo enzima distinto después, puede mejorar la capacidad de discriminación de la técnica.

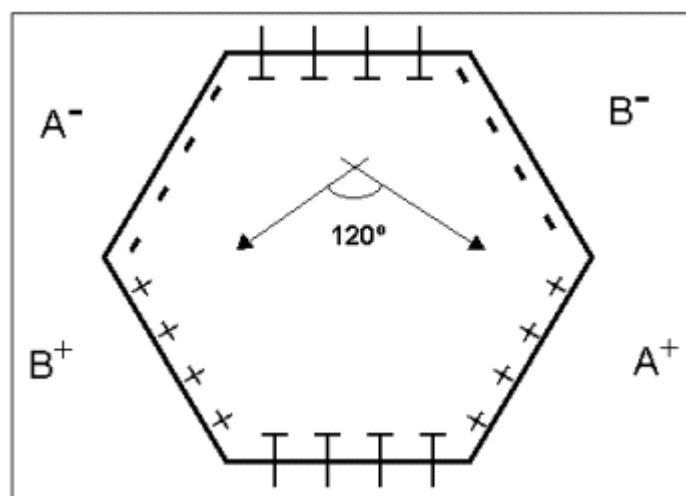
## 6.2. FUNDAMENTOS Y VARIANTES TÉCNICAS

Durante los años 70, se observó que bajo la acción de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se reorientaban y se desplegaban avanzando en dirección al polo positivo. Cuando el campo eléctrico cesaba, las moléculas de ADN se relajaban recuperando su estado inicial. La aplicación de un segundo campo eléctrico, con una orientación distinta del primero, obligaba al ADN a cambiar su conformación y reorientarse de nuevo para poder avanzar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación era dependiente de la longitud de la molécula, esto es de su peso molecular. Tras el cambio de orientación del campo eléctrico, las moléculas grandes tardan más tiempo en alinearse y poder comenzar el avance a través del gel de lo que tardan las moléculas de ADN

más pequeñas. Mientras los campos eléctricos que se alternen tengan la misma intensidad y voltaje, la migración final del ADN se recogerá en forma de línea recta, aunque el patrón final de separación de los fragmentos revelará la suma de todos los avances cortos en "zig-zag" que el ADN ha realizado. Este principio fue el que llevó a Schwartz y Cantor en 1984 a la descripción de las técnicas de PFGE y su utilidad en la separación de moléculas grandes de ADN, del orden de varios cientos de kb.

Desde la descripción original del sistema, se diseñaron distintos aparatos con diferencias en la geometría de los electrodos o en la trayectoria migratoria del ADN. Todos los sistemas eran capaces de separar un amplio rango de moléculas de ADN de diferentes tamaños (entre 1 y 7000 kb), aunque diferían en la velocidad de separación y en la resolución obtenida en un rango de peso molecular dado. De todos los sistemas desarrollados, el más extendido ha sido el CHEF (*clamped homogeneous electric field electrophoresis*). Sus mayores ventajas son la facilidad de manejo y la capacidad de separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos, que hacen mucho más fácil la comparación entre ellos. Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente y fijos a un contorno hexagonal (figura 6).

El voltaje generado por la fuente de electroforesis o generador de corriente se divide entre los electrodos, de manera que se crea un gradiente constante a lo largo de todo el gel. El ángulo de reorientación debe ser superior a 90°, habitualmente se trabaja con ángulos de 120° aunque existen modelos del sistema en el mercado que permiten modificar este parámetro. Por ángulo de reorientación, se entiende el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan y que refleja los grados de reorientación de una molécula de ADN para poder avanzar en la dirección de los campos eléctricos que se apliquen al gel.



**Figura 6.** Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B.

### 6.2.1. Componentes de un sistema de PFGE.

Las técnicas de PFGE normalmente requieren voltajes elevados durante muchas horas, lo cual hace necesaria la recirculación y refrigeración del tampón de electroforesis. Así los cuatro componentes básicos de un sistema de PFGE son los siguientes:

*Unidad de control de pulsos-generador de corriente.* Normalmente, en la misma unidad se reúnen la fuente de electroforesis (generador de 350 V) y el dispositivo que controla los 24 electrodos y la duración de la alternancia de los pulsos eléctricos.

*Cubeta de electroforesis.* Es una cubeta acrílica en la que se encuentran los 24 electrodos distribuidos en forma hexagonal y en cuyo centro se coloca el gel de agarosa, sumergido en el tampón de electroforesis correspondiente. La recirculación del tampón de electroforesis es esencial por dos motivos: 1) para refrigerar y mantener una temperatura constante en la cubeta y en toda la superficie del gel y 2) para mantener la capacidad de tampón de la solución, alterada por el proceso de electrolisis. Por tanto desde la cubeta hay un tubo de salida del tampón hacia una unidad de refrigeración y desde ésta un tubo que conecta de nuevo con la cubeta. La recirculación se lleva a cabo con una bomba.

*Bomba de recirculación del tampón.* Aspira el tampón de electroforesis de la cubeta, lo empuja a través de la unidad de refrigeración y lo devuelve a la cubeta. Es preferible que sea de flujo regulable, recomendándose un flujo de 0,5-1 litro/min.

*Unidad de refrigeración.* Suele ser un aparato de refrigeración portátil. El tampón de PFGE circula a través de un único tubo de aluminio que se encuentra en contacto con la solución de refrigeración. La refrigeración del tampón de electroforesis permite mantener constante la temperatura de la cubeta (generalmente se recomienda 14°C), utilizar voltajes superiores y por tanto electroforesis más rápidas.

#### 6.2.2. Variables que afectan a la resolución del PFGE.

Los resultados de las técnicas de PFGE son muy sensibles a variaciones en prácticamente todos los parámetros electroforéticos. Las condiciones para obtener la mejor resolución por PFGE están, por supuesto, en función del rango de tamaño de las moléculas a separar y del enzima de restricción seleccionado, pero también intervienen variables técnicas como la duración y alternancia de los pulsos eléctricos, el voltaje, la temperatura de la cubeta, el tiempo de electroforesis, el tampón utilizado o el ángulo de reorientación.

*Pulsos: duración y alternancia.* Los sistemas de PFGE consiguen separar fragmentos grandes de ADN al inducir la reorientación de las moléculas mediante cambios periódicos en el campo eléctrico. La duración de los campos eléctricos que se alternan determina el tamaño del ADN que puede separarse. Así pues, denominamos *pulso* al campo eléctrico alternante, y su *duración* o *intervalo* hace referencia a cuánto tiempo está actuando en una dirección u otra. Los pulsos pueden durar fracciones de segundo, para separar moléculas de pocas kb, o

pueden durar algo más de una hora para separar moléculas mayores de 5 Mb. Puesto que nos estamos refiriendo a la aplicación de PFGE en la tipificación bacteriana, el rango de peso molecular que interesa separar suele oscilar entre las 20 kb y las 600-800 kb, lo cual se consigue con tiempos que oscilan entre los 0,5 segundos y los 50-60 segundos. En general, cuanto mayor es la molécula de ADN, mayor tiempo de reorientación se requiere; las moléculas pequeñas, que pueden reorientarse con rapidez invierten gran parte del tiempo del intervalo de pulso en avanzar a lo largo del gel. Como habitualmente interesa separar un rango amplio de fragmentos de ADN con distintos tamaños, los sistemas de PFGE, permiten establecer un incremento progresivo en la duración de los pulsos a lo largo de la duración total de la electroforesis. Por ejemplo, en una electroforesis de 14 horas los pulsos pueden alternarse cada 5 segundos al principio del gel y acabar en la hora 14 con alternancias cada 30 segundos. Los sistemas comerciales de PFGE más utilizados actualmente, establecen una distribución lineal de la duración de los pulsos durante el tiempo de electroforesis. La aplicación de esta distribución lineal mejora la resolución en la separación de fragmentos, pero no garantiza una relación lineal constante entre tamaño y movilidad, de hecho, si se separan las mismas muestras con distintos intervalos de pulsos se obtienen patrones con movilidades muy distintas. Por esta razón es muy importante, colocar en todos los geles de PFGE controles de peso molecular adecuados que faciliten la comparación entre patrones y la identificación de determinados fragmentos de ADN.

*Voltaje.* El gradiente de voltaje es la diferencia entre el potencial eléctrico de los electrodos, este valor representa la fuerza que conduce el ADN a través del gel. Por tanto, el gradiente de voltaje debe expresarse en unidades de voltaje por distancia. Por ejemplo, si la fuente de electroforesis genera un voltaje de 180 V a una cubeta en la que los electrodos están separados 30 cm, el gradiente de voltaje será de 6 V/cm. El tamaño del gel utilizado no modifica este parámetro, siempre que la distancia entre los electrodos o el voltaje aplicado no varíe. El uso de distintos voltajes afecta no sólo la distancia de migración sino también el rango de tamaños que pueden separarse. Así, para obtener una resolución comparable en geles procesados a diferentes voltajes, debe modificarse no sólo el tiempo de electroforesis, sino los intervalos de pulsos para compensar las diferencias en la migración de ADN. Utilizar un voltaje inferior requiere intervalos de pulso más largos para obtener resultados similares. A voltajes bajos, las moléculas de ADN requieren más tiempo para reorientarse y avanzar tras la alternancia del pulso eléctrico.

*Temperatura de electroforesis.* Como se ha mencionado previamente, la recirculación del tampón de electroforesis y el mantenimiento de una temperatura constante son condiciones indispensables para obtener resultados reproducibles. Temperaturas entre 12°C y 15°C son



las más habituales. A medida que la temperatura aumenta, el ADN avanza más rápido pero disminuye la resolución de las bandas en el gel. Por ejemplo, a 24°C el ADN avanza un 50% más rápido de lo que lo haría a 13°C, sin embargo la disminución en la calidad de los patrones de bandas no justifica la reducción del tiempo de electroforesis. Temperaturas más bajas, 8°C-10°C, pueden ser recomendables para microorganismos cuyo ADN se degrada con facilidad (por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* o *Clostridium difficile*), de este modo se obtienen patrones con bandas mejor definidas, para compensar el enlentecimiento de la electroforesis deben, entonces, modificarse otros parámetros como voltaje, duración de la electroforesis, etc.

**Tiempo de electroforesis.** Debe intentarse mantener el tiempo mínimo de electroforesis necesario para obtener una resolución adecuada. En electroforesis largas la presencia de nucleasas residuales puede contribuir a la degradación del ADN, además, las bandas pierden definición en la zona más distal del gel. Para mejorar la resolución de una PFGE, deben intentarse ajustar otras variables, como el intervalo de los pulsos, aumentar el tiempo de electroforesis sólo aumentará el espacio entre las bandas que ya se hubieran separado, no ayudará a separar bandas que migran conjuntamente al inicio del gel.

**Tampón de electroforesis.** En general se recomienda el uso de TBE (x0,5; ver composición en documento técnico correspondiente). En el caso de necesitar separar moléculas de gran tamaño (>2 Mb), se recomienda utilizar TAE (x1), puesto que es más rápido al generar una corriente eléctrica más potente.

**Ángulo de reorientación.** Como se ha mencionado, por ángulo de reorientación, se entiende el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan. Para obtener una resolución adecuada por PFGE se requieren ángulos de reorientación de más de 90°. El estándar, cuando el sistema de PFGE tiene este parámetro fijo, es de 120°. En la actualidad existen modelos que permiten modificar este ángulo, disminuyéndolo, lo cual es útil para separar moléculas de ADN de gran tamaño (> 2 Mb).

### 6.3. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El objetivo final de las técnicas de tipificación molecular aplicadas al análisis de brotes de infección, es el poner de manifiesto que los aislamientos relacionados epidemiológicamente, lo están también genéticamente. Es imprescindible conocer los fundamentos de las técnicas de PFGE y cómo ciertos cambios genéticos pueden alterar los patrones de bandas obtenidos por PFGE, para interpretar correctamente los resultados. En una situación ideal, los patrones de PFGE de los aislamientos que representan una cepa epidémica

deberían ser idénticos y fácilmente diferenciables de los aislamientos epidemiológicamente no relacionados. Sin embargo, con frecuencia cambios genéticos, que ocurren muchas veces de forma aleatoria, alteran el perfil de los patrones de la cepa epidémica en el curso de un brote. A pesar de todo, la comparación e interpretación de los patrones de restricción tiene un importante componente de subjetividad por parte del observador.

Es importante tener en cuenta la naturaleza de la colección de aislamientos que nos proponemos estudiar. Son más fáciles de interpretar los patrones obtenidos de cepas aisladas en un periodo de tiempo corto y que han dado lugar a un brote de infección recortado. En ocasiones, aislamientos no relacionados epidemiológicamente pueden presentar un genotipo idéntico o muy parecido, particularmente si pertenecen a una especie o subtipo con una diversidad genética limitada. Este es el caso de ciertos microorganismos multiresistentes, endémicos en ciertos hospitales o áreas sanitarias (por ejemplo, *S. aureus* resistente a meticilina) o de ciertos subtipos bacterianos que, en una especie dada, se han hecho más prevalentes en todo el mundo (por ejemplo, ciertos serotipos de *Streptococcus pneumoniae*). En estos casos puede ser difícil discernir si las cepas que estamos estudiando pertenecen a un brote, especialmente si la cepa endémica o el genotipo más prevalente son los responsables.

A la hora de interpretar los patrones de PFGE, debe examinarse la colección completa de cepas a estudiar en busca de un patrón epidémico, que sería el más común entre los aislamientos. A continuación todos los otros patrones deben compararse con éste y a la vez entre sí. Es preciso contabilizar el número de fragmentos distintos de cada cepa con todas las demás, fragmento a fragmento (figura 7).

En función del número de diferencias entre dos patrones clasificaremos a los aislamientos en:

**Idénticos.** Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma cepa.

**Genéticamente relacionados.** Cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3. Esto es debido a que un único cambio genético, en el más desfavorable de los casos (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción: creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

**Posiblemente relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos

hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o

deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica. Este número de variaciones puede verse entre aislamientos separados por largos periodos de tiempo (> 6 meses), entre aislamientos que proceden de brotes que han afectado a un gran número de personas o entre aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas. En estos casos, antes de llegar a una conclusión sería interesante analizar las características fenotípicas de los aislamientos, su sensibilidad antibiótica y aplicar otros marcadores genotípicos si fuera necesario.

*No relacionados.* Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica.

Esta clasificación de la relación genética entre microorganismos, pretende ser sólo orientativa. Es preciso individualizar cada situación, tener en cuenta otras características de los microorganismos y sobre todo, la información epidemiológica que deriva de una investigación clínica cuidadosa.

Se pueden también analizar los patrones de PFGE mediante sistemas informáticos que objetivan el número de diferencias entre dos aislamientos y les asignan una "distancia genética". En estos sistemas, se precisa captar la imagen del gel primero, normalizarlo e identificar las bandas que quieren ser incluidas en el análisis. Son sistemas muy útiles para analizar colecciones que incluyen muchos microorganismos.

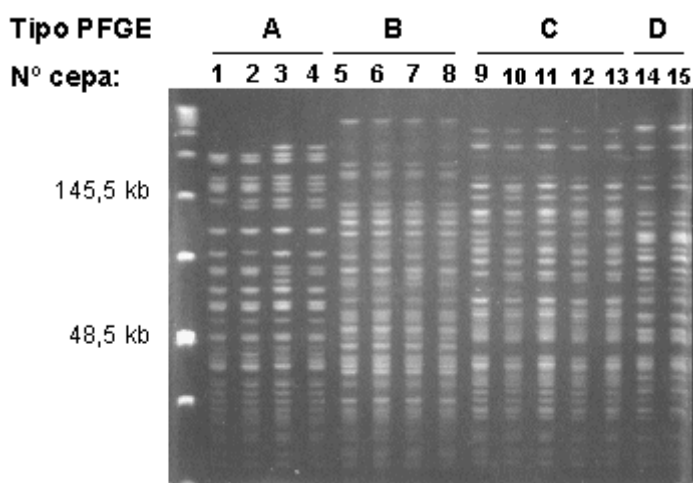
#### 6.4. INDICACIONES

Las técnicas de macrorrestricción y PFGE se han utilizado para la tipificación molecular de un gran

número de especies bacterianas. Son técnicas que exploran la organización del ADN cromosómico bacteriano bajo la acción de la digestión por un enzima, por tanto dan información general sobre el genotipo bacteriano y sus cambios más recientes. En general, sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos aisladas en un periodo de tiempo corto. Al aplicar estas técnicas al estudio de brotes de infección nosocomial endémicos, hay que tener en cuenta que la rentabilidad de la técnica variará en función del momento del brote. Por ejemplo, al principio del brote es probable que la diversidad genética sea baja, mientras que más tarde, al irse acumulando cambios genéticos en las cepas epidémicas/endémicas, se incrementará la diversidad de los patrones de PFGE.

#### 6.5. INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA

Como se ha mencionado previamente, las técnicas de macrorrestricción y PFGE son de utilidad en la mayoría de especies bacterianas, sin embargo en algún caso carecen del suficiente poder de discriminación (por ejemplo para *Salmonella enterica*). Por esta razón, al emplear la técnica sobre alguna especie sobre la que no hay experiencia previa, es necesario elegir cuidadosamente las cepas que utilizaremos como controles (aislamientos no relacionados epidemiológicamente con las cepas a estudiar). También existen algunas especies bacterianas en las que la degradación del ADN cromosómico hace que muchas de sus cepas sean "no tipables" por PFGE. Este es el caso de algunas subespecies de *Salmonella*, algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* o algunos patógenos entéricos (*E. coli*).



**Figura 7.** Electroforesis en campo pulsante del ADN cromosómico, tras restricción con *SmaI*, de 15 cepas de *Acinetobacter baumannii*. Las cepas en las líneas 1 al 4 están genéticamente relacionadas y pertenecen al tipo clonal "A". Las cepas de los clones "B", "C" o "D" son idénticas entre ellas; (kb, kilobases).

Se han publicado algunas modificaciones para disminuir la degradación del ADN y mejorar la resolución de la electroforesis, como por ejemplo, añadir tiourea al tampón de electroforesis o utilizar una formulación que contenga HEPES en lugar de Tris (en este caso es necesario reducir el voltaje a 4 V/cm). Asimismo, se han publicado procedimientos técnicos que permiten obtener resultados en 24-48 h, mejorando otro de los inconvenientes de la técnica. Un inconveniente importante es el derivado de la interpretación de los patrones de bandas obtenidos, que es subjetiva en la mayoría de los casos, y de la ausencia de un sistema normalizado que permita cuantificar uniformemente la distancia genética. Finalmente, debe recordarse que las técnicas de macrorrestricción y PFGE no detectan cambios puntuales en genes ni permiten la observación detallada de ciertos elementos genéticos (plásmidos, transposones, secuencias de inserción, etc.). Por tanto, para abordar algunos problemas epidemiológicos en los que intervengan estas secuencias, se requiere la combinación con otras técnicas.

#### 6.6. BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome sized ADNs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37:67-75.
2. Gautam RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2977-2980.
3. Birren B, Lai E. Pulsed-field gel electrophoresis. En: Birren B, Lai E, editores. Pulsed-field gel electrophoresis. A practical guide. San Diego, CA, EEUU: Academic Press Inc.; 1993.
4. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal ADN restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.

**Tabla 4.** Variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizadas en epidemiología para la tipificación bacteriana.

- 
- A. PCR sin digestión posterior con enzimas de restricción (ER) (Amplificación múltiple)
    - Amplificación múltiple arbitraria:
      - PCR mediante cebadores arbitrarios (AP-PCR, RAPD.....)
    - Amplificación múltiple definida:
      - PCR utilizando como cebadores secuencias repetidas encontradas a lo largo del genoma (REP-PCR; ERIC-PCR, tRNA-PCR; BOX-PCR, IS.....).
  - B. PCR con digestión posterior con ER y comparación de los fragmentos de restricción generados (PCR-RFLP).
    - PCR con digestión posterior con ER.
      - PCR-RFLP de genes específicos.
    - PCR con digestión con ER previa a la amplificación.
      - Amplificación secuencias de ADN que flanquean lugares de restricción infrecuentes (IRS).
      - Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (AFLP).
  - C. PCR y posterior secuenciación
    - Amplificación y secuenciación de varios *loci* genéticos (*Multilocus sequence typing*).
- 

#### 7. ANÁLISIS DEL ADN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN CON PCR

En los últimos años las técnicas basadas en reacciones de amplificación de ADN, especialmente la de PCR, han sido ampliamente utilizadas para la tipificación bacteriana. En general existen tres grupos de variantes de la PCR: 1) Aquellas en las que utilizando cebadores arbitrarios o con cierta especificidad, se amplifican regiones del genoma localizadas entre dos cebadores adyacentes separados por una distancia no superior a la que la *Taq* polimerasa puede amplificar. Estas variantes suelen dar patrones de amplificación constituidos por un número variable de bandas de ADN, 2) Variantes en las que previa o posterior a la amplificación génica se somete el genoma o producto amplificado a digestión con enzimas de restricción, y 3) Aquellas que amplifican regiones internas de ciertos genes y posterior secuenciación (Tabla 4).

En los genomas de todos los organismos se encuentran secuencias de ADN repetidas que pueden ser utilizadas para el diseño de cebadores que amplifiquen la región entre secuencias repetitivas consecutivas. En las células procariontas, las secuencias de ADN repetidas son cortas (<200 pb), no son codificantes, son intragénicas y ampliamente distribuidas a lo largo del genoma. Una de las primeras secuencias de este tipo descritas y estudiadas fue REP (*repetitive extragenic palindrome*) o PU (*palindromic unit*), descritas inicialmente en *Salmonella* y *E. coli*. Otras secuencias repetidas identificadas en enterobacterias, son las secuencias denominadas ERIC (*enterobacterial repetitive intragenic consensus*), también conocidas como IRU (*intergenic repeat units*).

También se ha utilizado para estudios epidemiológicos la amplificación de secuencias arbitrarias, en las que los cebadores no están dirigidos a ninguna región específica. La técnica RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) se basa en la utilización de cebadores de 9 a 10 bases de longitud, que hibridan con suficiente afinidad con ciertas regiones del cromosoma bacteriano a bajas temperaturas, permitiendo amplificar las regiones que se encuentran localizadas entre dos cebadores consecutivos. Si dos cebadores hibridan a una distancia óptima uno de otro y en la dirección apropiada, se obtendrá un producto de PCR con un tamaño correspondiente a la distancia entre los dos cebadores. El número y localización de las regiones reconocidas por los cebadores varía para las cepas de una misma especie bacteriana. Como los cebadores no están dirigidos frente a un locus genético determinado, pueden tener lugar hibridaciones inespecíficas entre los cebadores y el genoma motivo de estudio, por lo que la amplificación es extremadamente sensible a ligeros cambios en la temperatura de hibridación lo que puede conducir a variabilidad en el patrón de bandas. Según la concentración, longitud de los cebadores, así como las condiciones de electroforesis, se han descrito tres variantes: i) DAF (*DNA amplification fingerprinting*); ii) AP-PCR (*arbitrary primed PCR*); iii) RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Aunque estas tres variantes son fáciles de realizar y no es necesario conocer el genoma de la bacteria, la reproducibilidad es normalmente baja.

En el segundo grupo de técnicas (amplificación y posterior digestión con enzimas de restricción) se encuentran aquellas que analizan el polimorfismo de los fragmentos generados. Por lo general posee un bajo poder de discriminación para utilizarse como marcador epidemiológico. Sin embargo, en algunos casos se utilizan para definir especies dentro de un género determinado, por ejemplo para la identificación de las diversas especies del género *Acinetobacter*. También dentro de este grupo se encuentra la PCR con digestión con enzimas de restricción de baja (IRS) o alta (AFLP) frecuencia de corte previa a la amplificación. Finalmente, el tercer grupo incluye la amplificación y posterior secuenciación de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo bacteriano. Las técnicas de PCR con digestión con enzimas de restricción previa a la amplificación (AFLP y IRS), así como la PCR y posterior secuenciación (*Multilocus Sequence Typing* – MLST) se desarrollarán en los apartados correspondientes.

#### 7.1. TRATAMIENTO PREVIO DE LOS MICROORGANISMOS

Se recomienda que la cepa de estudio proceda de un cultivo reciente. Para la obtención del ADN cromosómico podemos partir de un cultivo bacteriano líquido o sólido. Existe un procedimiento muy sencillo que consiste en resuspender una

colonia de la cepa a estudiar en un volumen (25 µl) de agua destilada estéril y someter dicha suspensión a calentamiento en baño maría a 100°C durante 10 minutos. Como alternativa puede utilizarse el propio termociclador. En este caso, la suspensión se realiza en tubo de PCR y se somete 10 minutos a 95°C. Transcurrido el tiempo necesario para la lisis de la bacteria se centrifuga brevemente la suspensión (1 minuto a máxima velocidad en una centrifuga para tubos eppendorf). El principal inconveniente de la utilización de esta metodología de extracción del ADN es que puede generar variabilidad en la intensidad de las bandas que constituyen los patrones de ADN entre cepas pues no ha habido cuantificación previa del ADN.

Un sistema más preciso es la extracción del ADN mediante alguno de los equipos comercializados o mediante un método no comercial, seguido de la cuantificación posterior de este mediante determinación espectrofotométrica a 260 nm.

#### 7.2. FUNDAMENTOS Y VARIANTES TÉCNICAS

Solo se mencionará el fundamento de la REP-PCR, incluida posteriormente en el documento técnico. Sin embargo la sistemática de las metodologías de amplificación múltiple es muy similar y consiste en: **1.** Crecimiento en medio líquido o sólido de las células que deben ser analizadas; **2.** Lisis celular y extracción del ADN; **3.** Amplificación génica utilizando los cebadores y condiciones específicas para cada reacción; y **4.** Separación de los productos de PCR y visualización mediante tinción con bromuro de etidio. Las diferencias entre las variantes anteriormente citadas las encontramos en la secuencia de los cebadores utilizados y en las condiciones de amplificación.

La REP-PCR utiliza cebadores cuya secuencia se ha diseñado en función de las secuencias cromosómicas repetidas. Estas secuencias están presentes en diferentes localizaciones a lo largo del cromosoma bacteriano. Cuando dos secuencias están situadas lo suficientemente cerca, el fragmento de ADN que hay entre ambas es amplificado. Dado que el número y localización de estas secuencias repetidas entre cepas es variable, el número y tamaño de los fragmentos de ADN generados también variará.

#### 7.3. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

En principio los patrones que se obtienen están constituidos por un número de bandas de ADN que permiten una interpretación y comparación fácil entre cepas (figura 8). Sin embargo, puede ocurrir que se observen bandas de ADN de menor intensidad y dado que estas bandas no son muy reproducibles, incluso en experimentos repetidos en el mismo laboratorio, muchos autores no las consideran. Su presencia es probablemente el resultado de la baja temperatura de hibridación utilizada.

#### 7.4. INDICACIONES

La REP-PCR ha sido extensamente utilizada para la tipificación bacteriana, sobre todo en casos en los que se necesita disponer de resultados con cierta rapidez. Esta técnica es más sencilla y rápida que otras que probablemente poseen un mayor poder de discriminación. Por ello, suele utilizarse como primer paso ante la sospecha de un brote epidémico. Sin embargo, se aconseja realizar de manera complementaria otra técnica con un poder de discriminación superior.

#### 7.5. INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA

El principal inconveniente de esta técnica es la falta de reproducibilidad que puede presentar. Puede ser debida a la presencia de bandas de ADN de baja densidad ocasionada por diferencias en la relación de la concentración del ADN molde y del cebador. Algunos estudios demuestran que la reproducibilidad puede incrementarse utilizando concentraciones definidas de ADN purificado en lugar de una suspensión bacteriana hervida.

#### 7.6. BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Lupski JR, Weinstock, A. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 1992; 174: 4525-4529.
2. Stern MJ, Ames GFL, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 1984; 37: 1015-1026.
3. Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1991; 5: 825-834.
4. Bassam BJ, Caetano Anollés G, Gresshof PM. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl Microbiol Biotech* 1992; 38: 70-76.

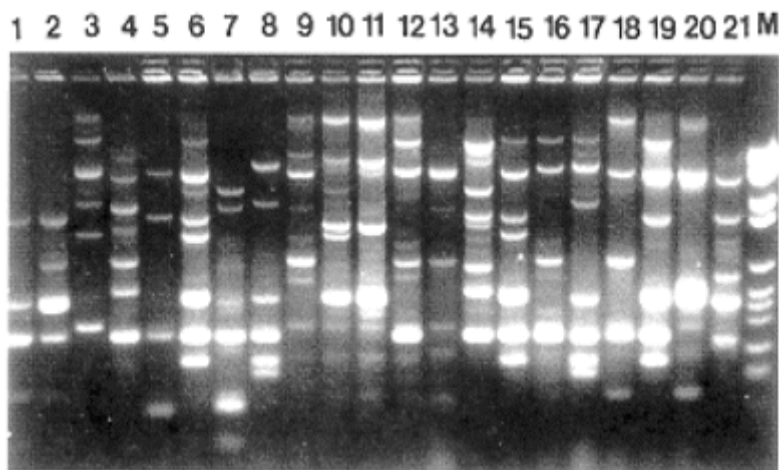
5. Welsh J, McClelland J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7213-7218.
6. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.
7. Wang G, Whittam TS, Berg CM, Berg DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5930-5933.
8. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 11-15.

#### 8. ANÁLISIS DEL ADN POR SECUENCIACIÓN: **MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)**

El MLST es una técnica desarrollada y diseñada para identificar clones y/o líneas clonales, fundamentalmente en poblaciones bacterianas. Es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo (identificación de grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente), aunque ha sido ocasionalmente utilizado para dar respuesta a interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc).

El método está basado en el principio desarrollado en el análisis de isoenzimas (*multilocus enzyme electrophoresis* -MLEE-), en el que se estudia la movilidad electroforética de un número concreto (generalmente entre 15 y 20) de enzimas metabólicas en geles de almidón o poliacrilamida.

Las variaciones observadas en dichas movilidades se corresponden con variaciones en el *locus* o gen codificante de cada enzima. Cada variante es definida como "variante alélica" y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético.



**Figura 8.** Patrones obtenidos mediante REP-PCR en cepas de *Acinetobacter baumannii*. Línea M, Marcadores moleculares de ADN.

Esta medición "indirecta" del polimorfismo genético se convierte en una medición directa en MLST, donde el análisis se basa en la secuencia del ADN de fragmentos internos de genes "*housekeeping*" que codifican enzimas metabólicas. El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidos a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables.

## 8.1. TRATAMIENTO PREVIO DE LOS MICROORGANISMOS

El método fue en principio desarrollado para caracterización de aislados bacterianos. Al ser un método basado en amplificación y secuenciación específica de fragmentos internos de ADN en determinados genes, los elementos críticos van a ser la extracción del ADN cromosómico y la amplificación específica de los fragmentos seleccionados. No es determinante el medio de cultivo y/o las condiciones de incubación de la cepa en cuestión. Desgraciadamente el proceso de selección de los genes, así como de los fragmentos internos de estos no es universal, es decir, este proceso debe ser realizado para cada especie bacteriana de forma individual. El método es de aplicación universal pero no su desarrollo. El método de extracción del material genético, así como los genes seleccionados y por lo tanto los protocolos de amplificación de los fragmentos de estos se adaptan a cada especie de forma individualizada y están accesibles en la página web <http://mlst.net> con un acceso específico para cada una de las especies. En general, se utilizan métodos comerciales de extracción y purificación de ADN.

## 8.2. FUNDAMENTOS Y VARIANTES TÉCNICAS

La técnica MLST caracteriza los aislados detectando polimorfismo de forma directa por secuenciación del ADN en los diferentes genes seleccionados. Esto permite identificar todas las variaciones, no sólo aquellas que produzcan un cambio en la movilidad electroforética del enzima codificante, como sucedía en MLEE.

En general, regiones específicas de los genes son responsables de la mayor parte de la variabilidad observada, mientras que el resto del *locus* presenta un alto grado de conservación. Este hecho ha permitido definir en el desarrollo del MLST que sería suficiente analizar, de cada gen, sólo un fragmento interno de entre 450-500 pb. Así, el nivel de variabilidad combinado entre los genes analizados proporciona un alto grado de discriminación y permite reducir el número de *loci* o genes analizados. Asimismo, la secuenciación permite detectar variantes que supongan tan sólo un cambio en una base en el gen analizado, de forma que se calcula que encontrando una media de 30 alelos diferentes por locus, y estudiando tan sólo 7 genes, se podrían distinguir hasta 30<sup>7</sup> genotipos diferentes. Esta circunstancia ha llevado a consensuar 7 cómo el número de genes que se considera adecuado para el análisis por secuenciación de los fragmentos seleccionados.

Desde su desarrollo inicial para *Neisseria meningitidis*, han aparecido básicamente dos variantes de la técnica, y una tercera que tendrá un desarrollo paralelo al de las micromatrices o *microarrays*:

### 8.2.1. Aplicación directa sobre muestras clínicas en ausencia de cultivo

Al ser un método basado en amplificación y secuenciación de material genético, ha sido adaptado en algunos microorganismos para poder ser aplicado en muestras biológicas (LCR, sangre, suero, exudados, etc.) en ausencia de cultivo. En este caso, la estrategia precisa la realización de una *Nested-PCR* con iniciadores diseñados en las regiones flanqueantes de los fragmentos amplificados en el esquema normal de MLST para cultivos. Los resultados obtenidos muestran como esta estrategia funciona bien en muestras clínicas con neumococo o meningococo. Lógicamente debe funcionar también para el resto de especies en las que se ha desarrollado MLST.

### 8.2.2. Multilocus Restriction Type (MLRT)

En algunas de las especies para las que se ha desarrollado MLST se ha aplicado con aparente eficacia una variante que no requiere secuenciación y consiste en la amplificación inicial de los mismos fragmentos que se utilizan en MLST (utilizando los mismos iniciadores), para digerir posteriormente dichos fragmentos con endonucleasas. Los fragmentos producidos tras la digestión son posteriormente resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa. Desde el punto de vista de compartir datos entre diferentes laboratorios adolece de los mismos problemas que se observan con la utilización de todos los marcadores moleculares basados en la generación de patrones de bandas y comparación en formato de imagen: compartir información es un proceso complejo que implica la formación de amplias redes que permitan la estandarización del método y la implantación de idéntica metodología para el análisis e intercambio de imágenes, lo que complica mucho todo el procedimiento. Sin embargo esta variante se muestra muy útil en el contexto de ondas epidémicas. Una vez identificado el perfil de MLRT con el correspondiente de MLST, el seguimiento de la onda desde el laboratorio central puede ser llevado a cabo sin recurrir a la secuenciación. Sólo en caso de aparición de variantes próximas por MLRT se procedería a la comprobación por secuenciación.

### 8.2.3. Aplicación de MLST mediante tecnología de micromatrices

El desarrollo de micromatrices para la detección rápida de polimorfismo genético en segmentos de ADN ha permitido su aplicación como variante metodológica del MLST. En este caso, y brevemente, los alelos conocidos de los fragmentos seleccionados en los 7 genes *housekeeping* permiten diseñar las sondas que se van a inmovilizar en la matriz (o *chip*). En este caso, las sondas se diseñan para detectar específicamente el cambio en una sola base, por lo que cada alelo va a venir

definido por una reacción positiva en una sola sonda, o bien, por una combinación de reacciones positivas con diversas sondas. La actuación con cada cepa problema vuelve a empezar por la amplificación de los 7 fragmentos con los mismos iniciadores que se utilizan en MLST. Los fragmentos amplificados se marcan con la incorporación de d-UTP marcado con fluoresceína, aunque pueden utilizarse igualmente otras modalidades de marcaje. Se procede posteriormente a la hibridación de los fragmentos marcados y al posterior revelado con estreptavidina. La intensidad de la señal emitida se analiza mediante un *scanner* y de aquí se deduce la secuencia de cada fragmento. Así, el proceso es bastante sencillo una vez desarrollada la matriz. En este momento, la tecnología de secuenciación es bastante más asequible que las micromatrices, especialmente si el laboratorio tiene que diseñar y desarrollar su propia matriz. Si en el futuro las matrices son asequibles comercialmente, esta variante tecnológica podría sustituir rápidamente a la utilización de secuencias de ADN.

### 8.3. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El proceso de análisis (figura 9) por MLST se inicia con la amplificación y posterior secuenciación de los fragmentos variables de los 7 genes seleccionados.

La secuencia de cada uno de los *loci* se alinea con las ya existentes en una base de datos centralizada, asignándose un número que identifica a cada alelo. Si la secuencia coincide, el programa asigna uno de los alelos ya identificados; en caso contrario asigna un nuevo número a ese nuevo alelo.

La secuenciación de ambas hebras de ADN permite autenticar las variaciones encontradas en la secuencia. La identificación de cada uno de los 7 alelos genera un “**perfil alélico**” que consiste en una secuencia de 7 números. A partir de este momento la comparación entre aislados es sencilla, comprobando con facilidad el grado de proximidad entre los aislados, mediante el simple análisis del número de alelos compartidos entre perfiles diferentes. Cada perfil alélico define lo que se conoce como “**tipo de secuencia**” o “*sequence type*” (ST).

Las características propias de Internet permiten la existencia de bases de datos MLST específicas para cada microorganismo, accesibles mediante página web (<http://mlst.net>), realizándose todo el proceso de consultas y análisis así como envío de las propias cepas para inclusión en las bases de datos, con conexión posible desde cualquier lugar del mundo.

Desgraciadamente, el proceso de selección de los genes, así como de los fragmentos internos de estos no es universal, es decir este proceso debe ser realizado para cada especie bacteriana de forma individual, de forma que aunque el método es de aplicación universal, su desarrollo no. Este proceso es lento y laborioso, limitando la aplicación de MLST a aquellas especies en las que ya ha sido desarrollado. El método ya ha sido desarrollado para

11 diferentes especies de bacterias y 1 levadura (ver información en <http://www.mlst.net/databases/default.asp>), y están en proceso de desarrollo un buen número de patógenos de interés en salud pública ([http://www.mlst.net/misc/new\\_schemes.asp](http://www.mlst.net/misc/new_schemes.asp)).

Cuando se completa el proceso de desarrollo de MLST para una nueva especie bacteriana, es preciso organizar una base de datos. La organización y gestión de estas bases de datos se realiza mediante programas informáticos diseñados al efecto que recogen una serie mínima de datos de cada uno de los aislados que forman parte de la misma. Esa serie de datos, clínicos, epidemiológicos y microbiológicos, la definen el grupo o grupos responsables del desarrollo del método en la especie en cuestión.

El sistema está diseñado de forma dinámica, para poder mandar los STs de nuevos aislados, solicitar la inclusión de nuevos alelos y/o perfiles, etc., todo ello gestionado por un administrador especialista en bioinformática, que supervisa los datos suministrados por el usuario. Así, si se envían datos de aislados que corresponden a perfiles ya descritos, sólo es preciso enviar un formato Excel con los datos correspondientes. Si se trata de un alelo nuevo, no incluido en la base de datos, entonces es preciso enviar el archivo en formato “*Chromas*” generado por el secuenciador automático, para poder proceder a su verificación. El programa de gestión de la base de datos permite al usuario realizar consultas de alelos, de perfiles alélicos, de aislados específicos con objeto de conocer su relación con otros aislados incluidos en la base, etc. Adicionalmente, la página web ofrece enlaces con un buen número de programas que permiten el análisis de datos generados por MLST mediante la utilización de diversos algoritmos. Un ejemplo de ello sería la página web correspondiente a *Neisseria meningitidis* (<http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>), que permite de manera interactiva realizar consulta sobre protocolos de extracción del ADN, así como protocolos de amplificación y secuenciación de los fragmentos seleccionados (*Information*), adicionalmente a las consultas ya reseñadas anteriormente.

### 8.4. INDICACIONES

Como ya se ha mencionado, MLST es una técnica diseñada para el seguimiento de clones y/o líneas clonales, fundamentalmente en poblaciones bacterianas. MLST consigue trazar procesos de dispersión, identificando con gran precisión grupos poblacionales específicos con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente.

Por tanto, es un marcador molecular indicado en lo que se conoce como epidemiología global a largo plazo. Ofrece resultados de gran precisión y puede, como en el caso *Neisseria meningitidis*, identificar la presencia de líneas clonales hipervirulentas, prediciendo con cierta antelación la llegada de ondas epidémicas. Asimismo, es un marcador que permite el seguimiento de clones resistentes prediciendo igual que en el caso anterior la evolución a medio

plazo de los niveles de resistencia en el microorganismo analizado.

Este análisis ha ofrecido buenos resultados en el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina o con un patrón de multirresistencia a varios antimicrobianos.

Tanto en meningococo como en neumococo, se ha detectado la posibilidad de fenómenos de recombinación genética que afectan a genes del polisacárido capsular, conocidos como “switching capsular”. Las cepas resultantes expresan un polisacárido diferente al que se expresaba en la cepa original.

La aplicación masiva de vacunas conjugadas altamente eficaces frente a estos dos microorganismos, podría ejercer una selección positiva para las cepas que expresen, por recombinación, un polisacárido no incluido en la vacuna ya que las vacunas desarrolladas protegen sólo frente a un número limitado de serogrupos o serotipos, en dos especies que tienen un alto número de cepas de diferentes serogrupos/serotipos causando enfermedad. La aparición y frecuencia de estos fenómenos debe ser investigada en todo momento, y para ello, MLST se ha mostrado como una herramienta de gran eficacia.

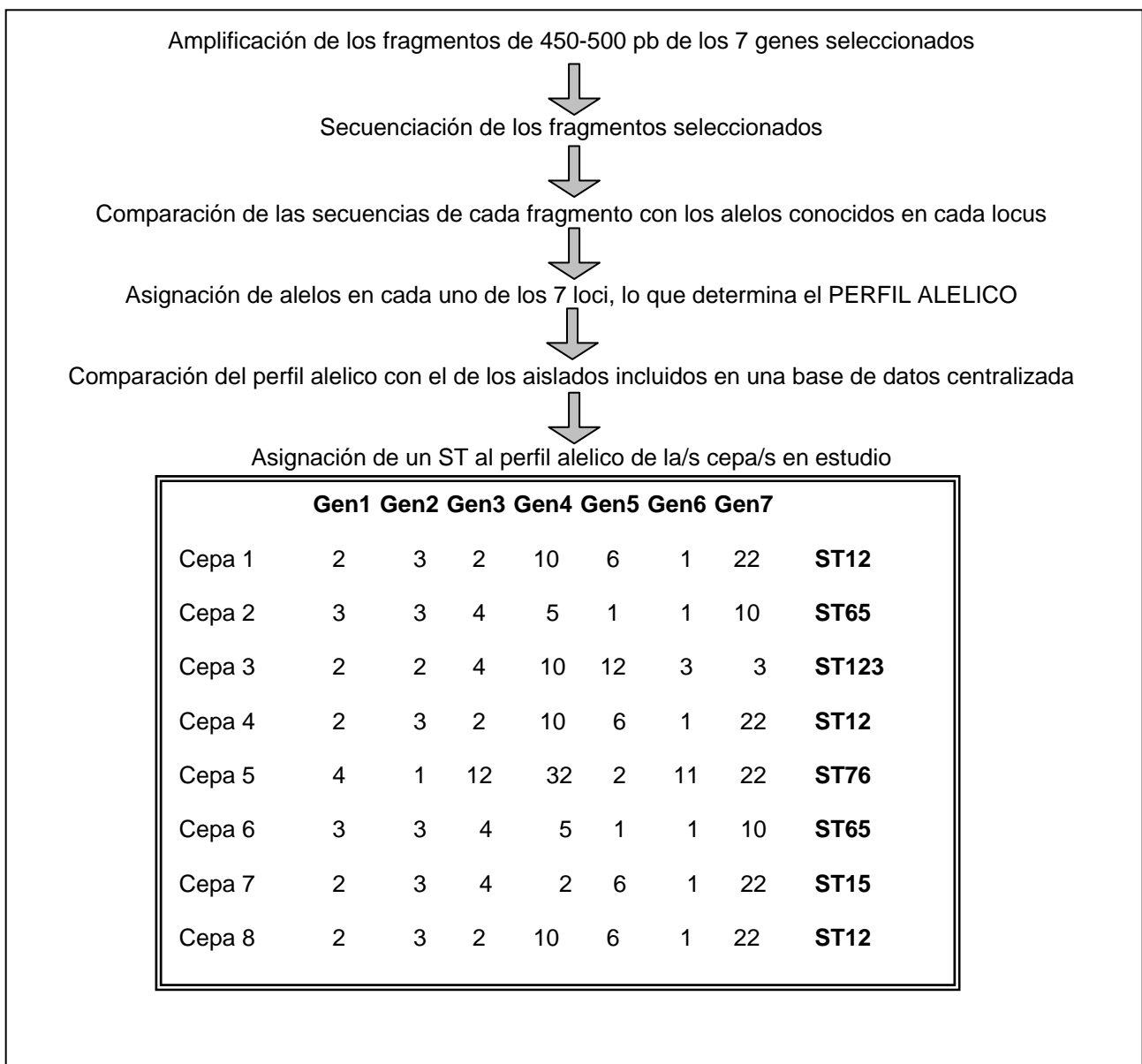


Figura 9. Análisis mediante la técnica de MLST



## 8.6. BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol 1999; 7: 482-487.
2. Enright MC, Knox K, Griffiths D, Crook DW, Spratt BG. Molecular typing of bacteria directly from cerebrospinal fluid. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 627-630.
3. Coenye T, LiPuma JJ. Multilocus restriction typing: a novel tool for studying global epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. J Infect Dis 2002; 185: 1454-1462.
4. Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, de la Fuente L, Vazquez JA. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. J Clin Microbiol 2003; 41: 757-762.
5. Van Leeuwen WB, Jay C, Snijders S, Durin N, Lacroix B, Verbrugh HA, Enright MC, Troesch A, van Belkum A. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology. J Clin Microbiol 2003; 41: 3323-3326.

## 9. OTRAS TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR

### 9.1. AMPLIFICATION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP)

AFLP es un marcador molecular que combina dos estrategias diferentes: digestión del ADN con enzimas de restricción y amplificación selectiva mediante PCR selectiva. Básicamente, se basa en la utilización de adaptadores que “reparan” los fragmentos de ADN obtenidos en la digestión, con una posterior amplificación mediante iniciadores complementarios de la secuencia diseñada en los adaptadores.

Este método, originalmente descrito en 1995, fue diseñado para analizar ADN de cualquier origen y complejidad, aunque posteriormente se han desarrollado variantes técnicas más sencillas para su aplicación en genomas bacterianos.

El método original comienza con la extracción y purificación del ADN mediante la utilización de cualquier método comercial asequible. A continuación el ADN bacteriano se somete a una primera digestión, generalmente con un enzima que reconozca un número intermedio de secuencias de corte, tal como *EcoRI*, y seguidamente a una segunda digestión con otro enzima que reconozca un alto número de puntos de corte, como *MseI* o *TaqI*. Este proceso va a originar fragmentos de ADN cortados en ambos extremos por el mismo enzima, y fragmentos mixtos, cortados en un extremo por *EcoRI* y en el otro por *MseI* o *TaqI*.

El paso siguiente consiste en la unión mediante la acción de ADN-ligasa, de unos oligonucleótidos de doble cadena llamados adaptadores, en los extremos de los fragmentos de ADN. Dichos adaptadores se diseñan de tal forma que van a unirse selectivamente en los fragmentos mixtos, dejando pues al margen todos los fragmentos digeridos en ambos extremos por el mismo enzima. El diseño de los adaptadores incluye algún cambio de base para impedir una nueva digestión tras la acción de la ligasa ya que las reacciones de digestión y de unión de los adaptadores se realizan de forma simultánea.

La presencia entonces de los adaptadores permite la utilización de iniciadores diseñados para reconocer e hibridar en parte de la secuencia de dichos adaptadores. La amplificación se realiza en condiciones de alta selectividad, de forma que una extensión en el extremo 3' de entre 1 y 3 nucleótidos permite obtener un resultado de un menor número de amplicones y simplificar por lo tanto el número de bandas final.

Si el número final de bandas es muy elevado y con tamaños pequeños, el análisis se realizará en geles de poliacrilamida, generalmente con ayuda de un secuenciador automático, que generará patrones exportables y analizables con programas informáticos específicos. La utilización de patrones “digitalizados” y de programas informáticos de análisis comunes permite compartir datos entre diferentes laboratorios con mayor facilidad. En este caso, uno de los iniciadores se marca con un fluorocromo.

Para genomas sencillos, como son los cromosomas bacterianos, se han desarrollado variantes con una sola digestión inicial y una resolución del gel final en agarosa.

Con este método, la variabilidad obtenida se origina por alguna de las siguientes causas:

- Mutaciones en las dianas de restricción de los enzimas utilizados.
- Mutaciones en las secuencias adyacentes a las dianas de restricción y que son complementarias de una parte de los iniciadores
- Inserciones y/o deleciones dentro de los fragmentos amplificados.

### 9.2. BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L, Lenstra JA. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol 1999; 37: 3083-3091.
2. Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R, Piffaretti JC. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. J Clin Microbiol 1995; 33: 1716-1719.

### 9.3. MICROMATRICES DE ADN

Los *microchips*, *microarrays* o micromatrices de ADN son una serie de sondas de ADN unidas a un soporte sólido en una disposición regular y prefijada. Estas sondas pueden ser oligonucleótidos o productos de PCR. El ácido nucleico diana que será detectado puede ser ADN o ARN. La principal ventaja con respecto a otras técnicas de biología molecular como la PCR convencional, la PCR múltiple o la PCR a tiempo real es que podemos detectar en un único proceso miles de genes. Podríamos considerar las micromatrices de ADN como *dot blots* miniaturizados.

Los términos *microchips* de ADN o *microarrays* de ADN se utilizan muchas veces indistintamente. Sin embargo, la diferencia fundamental está en la metodología utilizada para la preparación de ambos. Los *microarrays* de ADN consisten en cientos o miles

de productos de PCR u oligonucleótidos específicos de los genes que queremos detectar, los cuales en una minúscula cantidad (<1 nL) se depositan normalmente encima de un sustrato de cristal (por ejemplo un portaobjetos) mediante la utilización de un robot, mientras que los *microchips* se preparan mediante la síntesis de oligonucleótidos "in situ" sobre un cristal mediante una reacción fotoquímica, parecida a la fotolitografía. Este sistema fue utilizado por primera vez por *Affymetrix*, que acuñó el término de *Genechip*.

El protocolo básico de procesamiento de la muestra es el siguiente:

1. Aislamiento del ARN o ADN que queremos detectar.
2. Marcaje del ARN o ADN. El ARN se marca tras una reacción catalizada por la transcriptasa reversa que lo convierte en ADNc. El marcaje se realiza normalmente con un fluorocromo.
3. Hibridación del ácido nucleico diana marcado con el *microarray* de ADN. Este paso permite la interacción específica entre el ácido nucleico diana a detectar y las sondas depositadas en el *microarray*.
4. Lavados del *microarray* de ADN con soluciones preparadas a diferentes concentraciones de sal y detergentes para minimizar la unión inespecífica.
5. Determinación de la intensidad de la fluorescencia emitida por el fluorocromo mediante un detector que, conectado a un ordenador con un programa determinado, nos permitirá cuantificar la intensidad en cada posición predeterminada donde conocemos la sonda específica que se ha depositado.
6. Análisis de los datos.

Hasta la actualidad la aplicación de los *microarrays* de ADN en el campo de la microbiología clínica es escasa. En líneas generales se han utilizado para:

1. Investigación de la expresión génica. Los genes que constituyen el genoma completo de un microorganismo pueden ser fácilmente representados en un único *microarray* de ADN, por lo que se dispondrá de una visión global de la expresión de todos los genes en unas condiciones determinadas.
2. Búsqueda de regiones desconocidas del genoma de un microorganismo.
3. Análisis de la interacción ADN-proteína.
4. Genotipado de un microorganismo.

Dentro de las aplicaciones específicas en el campo de la microbiología cabe destacar:

1. Determinación de factores de virulencia de ciertos microorganismos.
2. Estudio de la respuesta de la célula hospedadora frente a un microorganismo patógeno o a microorganismos de la microbiota normal.
3. Análisis de la expresión génica tras el tratamiento de la célula con fármacos, como pueden ser antibióticos, o compuestos tóxicos.
4. Diagnóstico de enfermedades infecciosas. Existen pocos trabajos que apliquen los

*microarrays* de ADN para el diagnóstico microbiológico. Los genes más utilizados como sondas para la detección específica de microorganismos son el 16S ARNr y el 23S ARNr, y

5. Análisis de la evolución bacteriana y epidemiología.

En el campo concreto de la epidemiología molecular hasta la actualidad la utilización de los *microarrays* de ADN ha sido limitada, de hecho el único trabajo en la literatura que posee un cierto matiz epidemiológico es el de Kato-Maeda y col. en el que se estudia la evolución de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la utilización de *microarrays* de ADN que contienen la totalidad del genoma de este microorganismo. Los resultados obtenidos demostraban que había habido deleciones importantes en el genoma de algunas cepas y que estas deleciones se asociaban con una menor patogenicidad. Los patrones de deleciones detectados eran idénticos en los mismos clones, pero diferían en los clones diferentes, lo cual sugería que esta metodología podría ser utilizada en estudios epidemiológicos. No obstante se encuentra todavía en fase embrionaria por lo que respecta a su aplicación en el campo de la epidemiología molecular y probablemente su uso no es necesario cuando se pretende definir un brote epidémico ocasionado por un microorganismo en un área geográfica localizada, pues se dispone de otros marcadores epidemiológicos para este tipo de estudios. Sin embargo, para el seguimiento de cepas a nivel mundial probablemente estaría justificado el uso de *microarrays* de ADN por la elevada información proporcionada al analizar el genoma en su totalidad

Es evidente que en un futuro los métodos que permitan el análisis del genoma en su totalidad mediante micromatrices de ADN, o incluso la secuenciación de la totalidad del genoma serán imprescindibles para estudios de taxonomía, filogenia, genética de poblaciones y epidemiología.

#### 9.4. BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Domenech A, Vila J. Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ARN en la microbiología médica. *Enf Infec Microbiol Clin*. 2004; 22: 46-65.
2. DeRisi JL, Iyer V, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. 1997; 278: 680-686.
3. Ye RW, Wang T, Bedzyk L, Croker KM. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J Microbiol Methods*. 2001; 47: 257-272.
4. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, et al. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 49-55.
5. Anthony RM, Brown TT, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 781-788.
6. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, et al. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*. 2001; 11: 547-554.

---

**DOCUMENTO TÉCNICO**

---

**PNT-MMT-01**  
**ANÁLISIS DE ADN EXTRACROMOSÓMICO Y DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS DE TRANSMISIÓN**  
**HORIZONTAL:**  
**ANÁLISIS DE ADN PLASMÍDICO**  
(Métodos de Kado-Liu y Birnboim-Doly)

<b>ELABORADO</b>		<b>REVISADO Y APROBADO</b> <b>Jefe de Servicio</b>	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

<b>EDICIÓN</b>	<b>FECHA</b>	<b>ALCANCE MODIFICACIONES</b>
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N° .....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología	<b>Análisis de ADN extracromosómico y de los elementos genéticos de transmisión horizontal: análisis de ADN plasmídico</b>	Fecha: PNT-MMT-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 2 de 7

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la metodología asociada a diferentes técnicas de análisis de ADN plasmídico.

## 2. FUNDAMENTO

El análisis de ADN extracromosómico plasmídico tiene 2 objetivos principales: 1) establecer las posibles relaciones epidemiológicas entre aislados de la misma especie y 2) reconocer plásmidos comunes o "epidémicos" entre aislados de la misma o de diferentes especie bacterianas.

Cada una de las aplicaciones requiere metodologías diferentes. Dado que todas ellas pueden ser utilizadas en laboratorios de microbiología con un equipamiento medio describiremos los protocolos más representativos de cada una de ellas:

1. Tipificación del perfil plasmídico o análisis del contenido plasmídico total: Extracción de ADN plasmídico por el *Método de Kado y Liu*.
2. Análisis del polimorfismo genético plasmídico ("*plasmid fingerprinting*"): Extracción de ADN plasmídico por el *Método de lisis alcalina de Birnboim y Doly* y posterior digestión enzimática (adaptada para *mini* y *midipreps*).

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Bibliografía correspondiente de cada técnica
- Manual de Seguridad. Laboratorio de Microbiología

## 4. MUESTRAS

Cultivos bacterianos en cultivo puro, aislados en placas de agar sangre o medios no selectivos.

- Cultivos en medio líquido Luria Bertani (Gramnegativos) y caldo infusión-cerebro-corazón (Grampositivos).

(Normalmente, esta técnica se aplica a una serie de aislados – dos o más - entre los que se pretende estudiar su relación genética).

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

La composición de los tampones y soluciones empleadas en este procedimiento figura en el anexo 1.

- Placas de agar sangre
- Caldo de Luria-Bertani (LB)
- Caldo infusión-cerebro-corazón (BHI)
- Buffer de suspensión
- Solución de lisis (*método de Kado y Liu*)
- Solución I (*método de Birboim y Doly*)
- Solución II (*método de Birboim y Doly*)
- Solución III (*método de Birboim y Doly*)
- Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico
- Lisozima
- Lisostafina
- Ribonucleasa (RNasa-A)
- Proteinasa K
- Enzimas de restricción
- TE (Tris-EDTA)
- Etanol 70°C
- Isopropanol
- Bromuro de etidio

- Buffer de electroforesis: (TBE – Tris-Borato-EDTA- concentración 10x)
- Buffer de carga
- Agarosa
- Controles de peso molecular
- Cepas receptoras (cuando se requiere la obtención de transconjugantes)

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Microcentrífuga con capacidad de centrifugar a 12.000 rpm
- Centrífuga con rotores para frascos de 10 mL, 50 mL y 250 mL (Rotores SS34)
- Cubetas de electroforesis horizontal con fuente de alimentación
- Elementos para la confección de geles de agarosa: molde, bandejas y peines
- Agitador orbital
- Cámara fotográfica, transiluminador luz UV
- Baño de incubación
- Regla transparente a la luz UV
- Papel milimetrado
- Vórtex
- Asas bacteriológicas
- Micropipetas de volumen variable (1mL, 20-200 µL, 2-20 µL)
- Puntas pipeta estériles
- Tubos estériles tipo *ependorf* de 1,5 mL
- Tubos de plástico desechables estériles, 10 mL
- Matraces Erlenmeyer de 250-500 mL
- Tubos Falcon 50 MI

## 7. PROCESAMIENTO

### 7.1. EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

#### **Extracción del contenido plasmídico total según el Método de Kado-Liu**

1. Hacer una lista de trabajo asignando números correlativos a cada una de las cepas o aislados a estudiar.
2. Crecer los microorganismos en caldo Luria Bertani 18h a 37°C (28°C para *Yersinia*) con agitación moderada. Alternativamente, los microorganismos a estudiar se pueden inocular en agar sangre o medios no selectivos. No utilizar medios selectivos ya que el rendimiento disminuye notablemente.
3. Transferir 1 mL de cultivo anterior a un tubo *ependorf* de 1,5 mL y centrifugar a 13.000 rpm 5 m. Si se inoculó en placas, resuspender una cantidad equivalente a un asa de cultivo en 100 µL de TE.
4. Añadir 100 µL de solución de lisis y mezclar con agitación suave invirtiendo los tubos 4 ó 5 veces (**Notas 1 y 2**).
5. Incubar a 55°C de 30 a 60 m (35 m para Gramnegativos y 60 m para Grampositivos).
6. Extraer el ADN añadiendo 200 µL de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (1:1:1). Mezclar agitando con vórtex brevemente (5 s) o invirtiendo los tubos 5 ó 6

Servicio de Microbiología	<b>Análisis de ADN extracromosómico y de los elementos genéticos de transmisión horizontal: análisis de ADN plasmídico</b>	Fecha: PNT-MMT-01	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 3 de 7

veces. Se tiene que lograr una solución perfectamente homogénea.

7. Separar las distintas fases por centrifugación a 12.000 rpm durante 5 m-15 m
8. Transferir la fase acuosa superior (100-150µL) a un tubo *ependorf* limpio con una punta de pipeta evitando cualquier aspiración de la fase inferior. Si la fase acuosa no es clara, centrifugar de nuevo.
9. Transferir 40 µL de fase acuosa a un papel parafilm y mezclar con 30 µL de buffer de carga.
10. Cargar un gel de agarosa (**Nota 3**).

### **Extracción de plásmidos según el Método de lisis alcalina de Birnboim & Doly (1979).**

Una vez que hemos determinado por la técnica de Kado y Liu que los plásmidos que sospechamos relacionados epidemiológicamente tienen el mismo o aproximado peso molecular, debemos proceder al análisis de sus polimorfismos genéticos. Para ello es necesario extraer el ADN por una técnica que permita cantidad y calidad suficiente para permitir una correcta digestión enzimática.

La obtención de plásmidos se realiza mayoritariamente aplicando protocolos basados en el método de lisis alcalina. Son protocolos de extracción a pequeña escala ("*minipreps*") y se utilizan para una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Existen numerosas versiones comerciales de los mismos. Estos protocolos funcionan bien pero están limitados a la obtención de plásmidos en alto o medio número de copias y de peso molecular <50kb. Dado que muchos plásmidos de interés suelen ser de elevado peso molecular (ej. plásmidos que contienen genes de β-lactamas de espectro extendido), hemos de recurrir a otros métodos. Los protocolos a gran escala ("*midi y maxipreps*") utilizados en el pasado para la extracción de plásmidos de alto peso molecular y bajo número de copias pueden ser sustituidos por modificación del método de Birnboim y Doly (descrito a continuación) empleando volúmenes mayores y purificación posterior con resinas de intercambio iónico. Existen versiones comerciales que utilizan este procedimiento (QIAGEN Plasmid Midi kit, Maxi, Mega y Giga kits, distribuidos por IZASA en España) y que permiten la extracción de 6-8 muestras en un día de trabajo y la obtención de plásmidos de hasta 150 kb y bajo número de copias.

#### **Minipreps**

1. Crecer los microorganismos en 10 mL de caldo Luria Bertani 18h a 37°C (28°C para *Yersinia*) con agitación moderada.
2. Centrifugar el cultivo bacteriano a 4.000 rpm 10 min a 4°C en un rotor Sorvall SS34.

3. Resuspender el pellet en 200 µL de solución I y transferir la suspensión a un tubo *ependorf* (**Nota 1**).
4. Añadir 400 µL de solución de lisis II y mezclar invirtiendo el tubo 4 ó 5 veces no utilizando el vórtex. Incubar 5 m a temperatura ambiente (**Nota 2**).
5. Añadir 300 µL de solución III y mezclar invirtiendo los tubos 4 ó 5 veces no utilizando el vórtex. Incubar 15 m en hielo.
6. Centrifugar 5-10 m a 12.000 rpm y transferir 600 µL de sobrenadante a un tubo nuevo.
7. *Opcional:* añadir un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (1:1:1). Mezclar con vortex durante unos segundos. Centrifugar a 12.000 rpm 5-15 m en una microcentrífuga y transferir 600 µL de sobrenadante a un tubo nuevo .
8. Añadir 600 µL de isopropanol para precipitar el ADN. Mezclar con vórtex. Dejar a temperatura ambiente 2 m.
9. Centrifugar a 12.000 rpm 5-10 m en una microcentrífuga y eliminar cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta. Eliminar las gotas de alcohol que hayan podido quedar en el tubo invirtiendo éste sobre un papel secante primero, y dejándolo secar a temperatura ambiente unos 10 m después.
10. Lavar el pellet con etanol de 70°C almacenado a 4°C. Eliminar el sobrenadante como en el apartado 9.
11. Disolver el pellet en 30-50 µL de TE, mezclar con vórtex.
12. Mezclar 16 µL de ADN, 2 µL de 10x buffer de reacción, y 2 µL de enzima de restricción (10-20UI) (**Notas 4 y 5**)
13. Incubar a 37°C o a la temperatura adecuada para ese enzima al menos 4 h (normalmente toda la noche). (**Nota 6**)
14. Añadir 5 µL de buffer de carga y cargar un gel de agarosa

#### **Midi y maxipreps**

1. Normalmente se realiza un preinóculo de una colonia en 5mL de caldo LB con antibiótico y se incuba a 37°C hasta llegar a la fase logarítmica. Este cultivo se diluye 1/500-1/1000 veces en el volumen en el que se realice la extracción que se incubara con agitación (300rpm) 12-16h.
2. Difiere de las minipreps en que: i) se requieren volúmenes mayores (25-100mL) que varían dependiendo del tamaño molecular y número de copias del plásmido y ii) la necesidad de purificación posterior que suele realizarse a partir del paso 6 con resinas de intercambio iónico (Qiagen). El protocolo es el mismo en los pasos 1-6 cambiando los volúmenes.

## 7.2. SEPARACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO POR ELECTROFORESIS EN GELES HORIZONTALES DE AGAROSA

### PREPARACIÓN DE LOS GELES DE AGAROSA

- Preparar un gel de agarosa normal en 0,5 x TBE buffer. La concentración de agarosa a utilizar dependerá del tamaño molecular de los fragmentos a separar. Normalmente un gel de agarosa al 0,7-0,8% (peso/volumen) permite una estimación de fragmentos entre 0,5 y 20 kb. Plásmidos pequeños requieren concentraciones más elevadas (ej. 1%) y plásmidos grandes, concentraciones más bajas (0,5%).

Concentración de agarosa (%)	Rango de peso molecular de ADN lineal a separar (kb)
0,3	1,0 – 70,0
0,5	0,7 – 45,0
0,8	0,4 – 20,0
1,0	0,3 – 10,0
1,2	0,2 – 8,0
1,5	0,2 – 6,0
2,0	0,1 – 5,0

- Mezclar los distintos componentes y hervir para disolver la agarosa tomando la precaución de tapar el recipiente con papel de aluminio para evitar la evaporación
- Dejar enfriar la solución en agitación hasta que tenga una Tª de 60 °C
- Seleccionar la bandeja de gel y el peine a utilizar. No existe una medida estándar de los geles de agarosa a emplear para un análisis plasmídico. Los plásmidos de alto peso molecular (>50kb) deben ser separados en geles grandes para optimizar su resolución (50x20 cm) pero los plásmidos de bajo peso molecular (<15kb) pueden separarse en cualquier gel, incluidos pequeños (10x10cm). En cuanto a los peines, deben tener una capacidad de 50-75 µL por pocillo. Esto es especialmente importante en el análisis de contenido plasmídico total ya que ese volumen corresponde a la cantidad que se debe cargar por cada muestra
- Verter cuidadosamente la agarosa y esperar 30 m hasta que solidifique

### Colocación en las cubetas, extracción y tinción del gel

- Preparar 2 L de tampón de electroforesis 0,5x TBE (100 ml 10xTBE en 1900 ml de agua bidestilada) y verter en la cubeta de electroforesis.
- Colocar el molde que contiene el gel y depositar éste en la cubeta asegurándonos que el buffer lo cubre completamente.
- Cargar las muestras colocando en los extremos los controles de peso molecular (**Nota 7**).
- Conectar la fuente de alimentación a un voltaje constante de 90-120 V hasta que el buffer de carga llegue al final (**Nota 8**).

- Abrir la tapa de la cubeta y extraer el gel.
- Colocar el gel en una solución de bromuro de etidio (1µg/mL) durante 30 m, a temperatura ambiente (**Nota 9**).
- Visualizar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y fotografiarlo colocando una regla fluorescente a la luz UV junto a uno de los lados del gel de tal forma que la señal que indica "0 cm" coincida con el pocillo del primer carril del gel (**Nota 10 y 11**).

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

### 8.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR

La determinación del tamaño molecular de plásmidos o de fragmentos lineales de ADN se realiza por comparación de su movilidad electroforética en geles de agarosa con la de moléculas de ADN de tamaño molecular conocido. Para ello, es necesario:

- Calcular la movilidad electroforética: se define midiendo las distancias de migración (en mm) de los fragmentos de ADN sobre la fotografía de los geles o de las imágenes. Anotaremos las distancias recorridas por cada uno de los fragmentos objeto de estudio así como la de los controles de peso molecular que se aprecian en la foto o en la imagen digitalizada del gel realizada con la regla posicionada en uno de sus lados.
- Construir una curva de calibración en la que se representa el log<sub>10</sub> del tamaño molecular (kbp) versus la distancia recorrida (en mm) de los controles utilizados. Posteriormente, se determina el tamaño molecular de los fragmentos correspondientes por interpolación de las distancias recorridas por los mismos sobre la curva de calibración obtenida con los valores de los controles utilizados (**Nota 7**).
- Los nuevos sistemas de captación y análisis de imágenes digitalizadas ampliamente utilizados en la actualidad como el Phoretix™ gel análisis software package (NonLinear Dynamics USA, Newcastle, UK) o el Applied Mathematics (BioRad) permiten el cálculo computerizado de los pesos moleculares aplicando diferentes métodos matemáticos, el análisis de gran número de muestras y la comparación de muestra en distintos geles (**Nota 11**).

### 8.2. DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ENTRE DISTINTOS PLÁSMIDOS

Se realiza por comparación de los patrones de bandas obtenidos tras separación electroforética del extracto crudo plasmídico o tras digestión enzimática del ADN plasmídico.

En el caso que se comparen extractos plasmídicos totales, hay que tener en cuenta que todos los aislados del estudio deben haber sido tratados de igual forma, de lo contrario pueden aparecer diferentes movilidades electroforéticas en un mismo plásmido.

Si el análisis va precedido de digestión enzimática, a diferencia de lo que sucede con el ADN genómico, *no existen criterios que establezcan el número de bandas que deben compartir dos plásmidos para ser considerados idénticos o posiblemente relacionados*. En general, consideramos que dos plásmidos están genéticamente relacionados cuando comparten  $\geq 3$  sitios de restricción para un enzima de restricción determinado y generan el mismo número de bandas de igual peso molecular. Esto suele confirmarse al menos para 2 enzimas diferentes.

## 9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán responsables del procesamiento de los aislados y de la elaboración de la técnica.

El facultativo responsable deberá emitir un informe donde se expresen los resultados de forma clara y comprensible y deberá validar éstos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

**Nota 1.** Este paso puede ser modificado según la bacteria que vayamos a tratar. Las modificaciones incluyen un aumento de la concentración de lisozima (para determinados microorganismos Grampositivos como *Listeria*), de los tiempos de incubación o la adición de enzimas que debilitan la pared celular como lisostafina (necesaria para *Staphylococcus*) o mutanolisina (determinadas cepas de microorganismos Grampositivos). Realizaremos modificaciones siempre que al añadir la solución II no logramos una lisis adecuada.

**Nota 2.** La incubación con la solución de lisis II no debe prolongarse más tiempo del señalado para prevenir una excesiva contaminación con el ADN cromosómico. Es suficiente cuando la solución pasa de turbia a opalescente. Nunca debemos utilizar el vórtex en este punto para minimizar la conversión de las formas CCC (Covalently Closed Circular o moléculas circulares de ADN de doble hebra cerradas covalentemente) a sus otras variantes moleculares alternativas del plásmido: formas OC (Open Circular) o formas L (lineales) que se generan cuando se produce la rotura de una hebra o de las dos hebras de las formas CCC, respectivamente. La presencia de formas OC y L causaría errores en la interpretación de las bandas de los geles dado que cada configuración plasmídica tiene distinta movilidad electroforética (ver figura 1, documento científico).

**Nota 3.** Las muestras de ADN plasmídico CCC deben utilizarse en el día ya que el almacenamiento a 4°C ó 20°C puede provocar un aumento de formas OC haciendo que los resultados de geles posteriores sean difíciles de valorar.

**Nota 4.** No agitar con vórtex las preparaciones que contienen enzimas de restricción ya que pueden inactivarse con la agitación.

**Nota 5.** Convencionalmente, consideramos que 1 UI de ER digiere 1 µg de ADN (generalmente ADN de fago lambda). Sin embargo, la cantidad requerida depende del número de secuencias reconocidas por

el ER. Se suele utilizar 5 UI de ER/µg de ADN para plásmidos con pocos sitios de restricción. Nosotros utilizamos 10-20 UI dado que el número de secuencias diana para los ER utilizados es, de forma general, desconocido.

**Nota 6.** El ADN plasmídico digerido con enzimas de restricción (ADN lineal) y que no haya sido utilizado puede almacenarse a -20 °C. Es importante tener en cuenta que la mayoría de los enzimas de restricción reconocen secuencias asimétricas dando lugar a extremos complementarios y haciendo posible que distintos fragmentos puedan unirse aleatoriamente debido a la formación de puentes de hidrógeno, afectando así al resultado de un segundo gel. Para evitarlo, las muestras se descongelarán y se incubarán a 65° C durante 5 m antes de su análisis.

**Nota 7.** Los controles de peso molecular deben incluir siempre fragmentos de mayor y de menor tamaño molecular a cualquiera de los fragmentos de ADN o plásmidos a analizar. Es adecuado utilizar controles con un número de bandas superior a 10 en el caso de moléculas de ADN lineal y superior a 5 en el caso de plásmidos CCC para obtener las mejores curvas de calibración posibles. Es importante recordar que los fragmentos >20kb no se separan en geles de agarosa de concentración normal (ver tabla del apartado 7.2).

**Nota 8.** Debe tenerse la precaución de terminar el gel antes de que el tampón de carga llegue al final del mismo, puesto que fragmentos pequeños de ADN abierto pueden migrar a mayor velocidad que dicho tampón y se podrían perder.

**Nota 9.** El bromuro de etidio (1µg/mL) **no debe incorporarse** a los geles de agarosa cuando se analizan **plásmidos CCC** ya que al intercalarse con el ADN las moléculas son extremadamente sensibles a su rotura con la luz UV. Los geles de agarosa para el análisis de ADN plasmídico lineal pueden prepararse con y sin bromuro de etidio ya que el efecto de este agente sobre la migración del ADN lineal es inapreciable.

**Nota 10.** Si al visualizar los geles con luz UV apreciamos una baja resolución de los fragmentos obtenidos, el gel puede volver a ser colocado en la cubeta y prolongar el tiempo de electroforesis cuanto sea necesario. Esto no es posible para geles de plásmidos CCC por las razones expuestas en la nota anterior.

**Nota 11.** La precisión en la determinación de los tamaños moleculares depende en gran medida de una buena resolución de los fragmentos de ADN. El tiempo y el voltaje aplicados así como los controles de peso molecular utilizados para realizar las curvas de calibración son factores determinantes. El tiempo depende del tamaño molecular de los fragmentos o plásmidos a separar; debe ser mayor cuanto mayor es el tamaño de los fragmentos a estudiar. La aplicación de un bajo voltaje suelen determinar una mejor resolución. Los controles de peso molecular serán elegidos dependiendo del tipo de ADN y del tamaño que se quiere analizar. Cuando se desconozca el tamaño de los pesos moleculares

Servicio de Microbiología	<b>Análisis de ADN extracromosómico y de los elementos genéticos de transmisión horizontal: análisis de ADN plasmídico</b>	Fecha: PNT-MMT-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 6 de 7

objeto de estudio, será conveniente correr un gel inicial para aproximar el tamaño de los fragmentos o plásmidos a estudiar y por tanto los controles y las condiciones más adecuadas a utilizar.

### 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Dada la ausencia de criterios de interpretación, es importante tener en cuenta los siguientes aspectos:

- La digestión enzimática de plásmidos y el posterior análisis de los patrones de bandas obtenidos no resultan necesarios para plásmidos de muy diferente peso molecular. Tampoco es necesario analizar todos los plásmidos de igual peso molecular en una situación de brote epidémico.
- La presencia de diferentes formas plasmídicas en una preparación puede dificultar la identificación de sus correspondientes bandas. Las formas OC suelen ser muy frecuentes en preparaciones almacenadas durante largo tiempo y en plásmidos de alto peso molecular. En numerosas ocasiones es difícil establecer si una banda corresponde a una forma CCC o OC, lo cual puede complicarse al comparar preparaciones de plásmidos diferentes. Idealmente, se recomienda analizar preparaciones preparadas al mismo tiempo y en las mismas condiciones.
- Idénticos elementos de transmisión horizontal como transposones o integrones localizados en diferentes plásmidos pueden generar fragmentos de similar peso molecular siendo en estos casos difícil decidir si los plásmidos están o no relacionados. Por ello es importante considerar siempre la posibilidad de que existan

genes en otros elementos "epidémicos" de ADN extracromosómico.

- La hibridación cruzada de un plásmido con otro se ha utilizado para determinar la identidad entre los mismos. Este análisis ha de ser interpretado con precaución ya que una hibridación positiva en fragmentos de alto peso molecular puede deberse a una homología en regiones mucho más pequeñas contenidas en los mismos. Para evitar interpretaciones erróneas, es conveniente obtener patrones de un gran número de bandas.

### 12. BIBLIOGRAFIA

1. Sambrook J. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor press.
2. Threlfall EJ, Woodford N. Plasmid profile typing and plasmid fingerprinting, 1995. p. 225-236, *In* J. Howard, and D.M. Whitcombe (ed.), *Methods in Molecular Biology*. Vol 46; Diagnostic bacteriology protocols, Humana Press Inc, Totowa, NJ.
3. Murray BE, Hodel-Christian SL. 1991. Bacterial resistance: Theoretical and practical considerations, characterization of R plasmids, and detection of plasmid-specified genes. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in Molecular Medicine*.
4. Platt DJ, Chesham JS, Brown DJ, Kraft CA, Taggart J. Restriction enzyme fingerprinting of enterobacterial plasmids: a simple strategy with wide application. *J Hyg (Lond)* 1986; 97:205-210.
5. Rochelle PA, JC Fry, MJ Day, Bale MJ. An accurate method for estimating sizes of small and large plasmids and DNA fragments by gel electrophoresis. *J Gen Microbiol* 1985; 132:53-59.



Servicio de Microbiología	<b>Análisis de ADN extracromosómico y de los elementos genéticos de transmisión horizontal: análisis de ADN plasmídico</b>	Fecha: PNT-MMT-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 7 de 7

## ANEXO 1. COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

Todas las soluciones que se exponen a continuación deben ser autoclavadas antes de ser utilizadas.

### 1. Medio de Luria Bertani (LB)

Para 1 L: Disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y ajustar a 1 L con agua destilada.

### 2. Buffer de suspensión :

50 mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA pH=8,0

### 3. Solución de lisis (Método de Kado y Liu):

3% SDS, 50mM Tris (pH =12,6).

Para 100 mL: 3 g SDS + 0,605 g Tris + 98,4 mL de H<sub>2</sub>O. Añadir 1,6 mL de 2 N NaOH. No es necesario ajustar el pH utilizando estos componentes. Esta solución debe ser siempre preparada en el momento.

### 4. Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico: (1:2:1)

Para 100 mL: 50 g de cristales de fenol, 48mL de cloroformo, 2 mL de alcohol isoamílico, 10mL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH =8,0). Almacenar en botella topacio a 4°C.

### 5. Ribonucleasa (RNAsa-A, Sigma Aldrich Cat# 5503).

Preparar una solución stock de 10mg/mL en agua destilada hirviendo durante 15 min para eliminar cualquier resto de actividad DNAsa. Dejar enfriar a temperatura ambiente, alícuotar y congelar.

### 6. Bromuro de etidio. 5 mg/mL stock

Almacenar en frascos color topacio, o frascos cubiertos con papel de aluminio para evitar la fotoinactivación

Diluir a 1 µg/mL para teñir los geles. Una solución de trabajo se prepara con 100 µL de solución stock en 500 mL de agua destilada.

Atención: las soluciones de BrEt han de manejarse con precaución ya que es un potente agente mutágeno. Siempre han de ser utilizadas con guantes. El BrEt ha de inactivarse antes de desecharse.

### 7. Buffer de electroforesis: (TBE concentración 10x):

890 mM Tris, 890 mM Acido bórico, 20 mM EDTA pH= 8

Para 1 L: 108 g Tris base, 55 g ácido bórico y 40 ml EDTA 0,5 M pH= 8. Autoclavar en alícuotas de 500 mL ó 1 L.

### 8. Buffer de carga: 0,25% de azul de bromofenol en 60% de sacarosa.

### 9. Solución I.

Para Gramnegativos: 25 mM Tris (pH = 8), 50 mM glucosa, 1 mM EDTA, 5 mg/mL lisozima

Para Gram positivos: 10 mM Tris (pH = 8), 1 mM EDTA suplementado de 25% (peso/volumen) sacarosa y 10 mg/mL de lisozima.

### 10. Solución II (solución de lisis)

1 % SDS, 0,2 NaOH (preparada en el momento de un stock 10N)

### 11. Solución III (solución de precipitación)

5 M acetato potásico (60 mL), ácido acético glacial (11,5 mL) y agua destilada (28,5 mL). La solución es 5 M respecto al acetato y 3 M respecto al potasio.

### 12. TE: 10 mM Tris-HCl (pH= 8), 1mM EDTA (pH= 8)

Para 1 L: 10 ml Tris 1M (pH 7,5), 2 ml EDTA 0,5M (pH= 8,0), 988 ml agua bidestilada.

Autoclavar en alícuotas de 500 ml ó 1 L

### 13. Controles de peso molecular

Para ADN lineal :

- Marcador II (Roche): para fragmentos entre 0,2 and 23,1 kb (mezcla de 8 fragmentos: 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, y 23130 bp)
- Marcador X (Roche): para fragmentos entre 0,07 y 12 kb (mezcla de fragmentos de 1018 bp y sus multímeros)

Para ADN cerrado covalentemente (análisis de plásmidos sin digerir):

- Supercoiled ladder (Gibco BRL) para ADN supercoiled de tamaño molecular entre 2 y 16 kbp.
- Plásmidos de tamaño molecular conocido. Los dos controles más utilizados son cepas de *Escherichia coli* que contienen distintos plásmidos: *E. coli* NCTC 50192 (cuatro plásmidos de 7, 36,2, 63,8 y 148,5 kb, respectivamente) y *E. coli* V517 (ocho plásmidos de peso molecular comprendido entre 2,1 y 54,2 kb). Estas cepas están disponibles en la Colección Española de Cultivos Tipo (<http://www.cect.org>). Las cepas con plásmidos de peso molecular conocido pueden obtenerse a través del Plasmid Reference Laboratory, Department of Microbiology de la Universidad de Standford, Palo Alto, California (EEUU).

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-MMT-02**  
**ANÁLISIS DEL ADN MEDIANTE PROCEDIMIENTOS DE RESTRICCIÓN E HIBRIDACIÓN: ANÁLISIS DEL**  
**POLIMORFISMO DE RESTRICCIÓN ASOCIADO A IS6110**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA Nº. ....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación: análisis del polimorfismo de restricción asociado a IS6110</b>	Fecha: PNT-MMT-02	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 2 de 9

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la metodología necesaria para el estudio epidemiológico de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* mediante detección del polimorfismo de restricción asociado a la secuencia de inserción IS6110.

## 2. FUNDAMENTO

El estudio del polimorfismo genético asociado a la secuencia de inserción IS6110 tiene como objeto reconocer la relación entre aislados de *M. tuberculosis* vinculados epidemiológicamente (esto es que forman parte de una cadena de transmisión reciente) y, a la vez, diferenciar aislados no relacionados. Mediante esta técnica determinamos el número de copias de IS6110 presentes en el genoma de las cepas de *M. tuberculosis* a estudiar, e indirectamente, el contexto genético en el que se encuentran estos elementos. La IS6110 contiene un lugar de restricción para el enzima *PvuII* en su secuencia, y se utiliza éste para la digestión del ADN cromosómico de *M. tuberculosis* como paso previo a la hibridación con una sonda complementaria de IS6110. De forma general, el presente procedimiento consta de las siguientes fases: 1) extracción del ADN cromosómico de *M. tuberculosis*, 2) restricción del ADN con el enzima *PvuII*, 3) separación de los fragmentos mediante electroforesis, 4) transferencia de los fragmentos de restricción a un soporte sólido (membrana) mediante *Southern blot*, 5) hibridación de la membrana con una sonda complementaria del IS6110 y 6) revelado por autoradiografía.

Mediante este procedimiento se consigue un patrón de bandas característico de cada cepa de *M. tuberculosis* (polimorfismo asociado a la IS6110) que permite la comparación fácil entre aislados.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manuales de funcionamiento específicos de los aparatos utilizados en este procedimiento
- Bibliografía correspondiente de cada técnica
- Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología

## 4. MUESTRAS

Cultivos bacterianos en cultivo puro, aislados en medio de Lowenstein-Jensen.

(Normalmente, esta técnica se aplica a una serie de aislados –dos o más- entre los que se pretende estudiar su relación genética).

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medio de Lowenstein-Jensen
- Trizma base
- Ácido bórico
- EDTA
- Lisozima
- SDS
- Proteinasa K
- NaCl
- ClH

- NaOH
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - Citrato sódico
  - Glicerol al 50%
  - CTAB (N-cetil-N,N,N-trimetil bromuro de amonio)
  - Solución de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
  - Etanol 70%
  - Bromuro de etidio
  - Reactivos de hibridación: sistema ECL *Direct System*, (Amersham Biosciences)
  - Agarosa para geles
  - Cepa control Mt14323
  - Control de peso molecular (*lambda-HindIII*, *PhiX174-HaeIII*, *Supercoiled DNA ladder-PvuII*)
  - Enzima de restricción *PvuII*
  - Enzima de restricción *AluI*
  - Revelador fotográfico Agfa
  - Fijador fotográfico Agfa
- La composición de los reactivos y soluciones de trabajo se especifica en el Anexo 1.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

### 6.1. APARATOS

- Centrífuga para tubos eppendorf.
- Termociclador
- Cubeta de electroforesis
- Fuente de electroforesis
- Transiluminador
- Unidad de transferencia
- Bomba de vacío para transferencia de geles
- Tubos de hibridación
- Horno de hibridación
- Digitalización de geles:
  - Cámara de vídeo
  - Programa BiImage Whole Band Analyzer

### 6.2. OTRO MATERIAL

- Asas bacteriológicas.
- Pipetas de volumen variable
- Puntas pipeta estériles
- Cassete fotográfico (Hypercassete RPN-3643, Amersham)
- Película fotográfica (Hyperfilm ECL, Amersham)
- Tubos estériles tipo *eppendorf* de 1,5 ml
- Cabina de Bioseguridad tipo IIA

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. OBTENCIÓN DEL ADN GENÓMICO DE *M. TUBERCULOSIS*

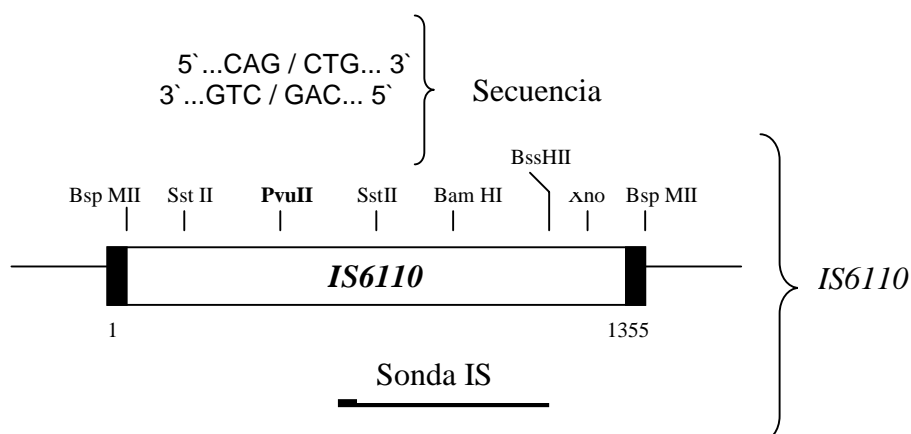
1. Inocular la cepa de *M. tuberculosis* en medio Lowenstein-Jensen e incubar a 37°C hasta obtener un crecimiento claramente visible.
2. Transferir como mínimo una asa de cultivo a un tubo que contenga 400 µl de TE 1x
3. Inactivar las células 20 minutos a 80°C y enfriar a temperatura ambiente.
4. Adicionar 50 µl de lisozima 10mg/ml, mezclar con vortex e incubar como mínimo una hora a 37°C (mejor toda la noche)
5. Adicionar 70 µl de SDS/ 5µl proteinasa K 10% (precalentar la proteinasa K a 65°C), mezclar e incubar 10 minutos a 65°C
6. Adicionar 100 µl de NaCl 5M, mezclar

7. Adicionar 100 µl de solución CTAB/NaCl 5M (calentar previamente a 65°C), mezclar hasta obtener una solución "lechosa" e incubar 10 minutos a 65°C
8. Adicionar 750 µl de cloroformo/alcohol isoamílico, mezclar un minuto y centrifugar a temperatura ambiente 5 minutos a 12.000 rpm
9. Transferir la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo nuevo
10. Adicionar 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar por inversión 3 o 4 veces
11. Congelar 30 min a -20°C (mejor toda la noche)
12. Centrifugar 15 minutos a temperatura ambiente a 12.000 rpm
13. Descartar el sobrenadante (el *pellet* ha de quedar aproximadamente en 20µl)
14. Adicionar 1ml de etanol al 70% (conservado a -20°C). Mezclar por inversión 4 o 5 veces
15. Centrifugar 5 minutos a 12.000 r.p.m. Descartar todo el sobrenadante, quedando únicamente el *pellet* (sin restos de etanol)
16. Secar el *pellet* (a temperatura ambiente, o 30 minutos en estufa a 37°C o 5 minutos en *Speed Concentrator*)
17. Disolver de nuevo el *pellet* con un volumen conveniente de TE 1X (según la cantidad de ADN precipitado) a 37° durante toda la noche. El ADN se puede guardar a 4°C

#### Observaciones

- El paso número 6 es muy importante ya que a concentración de sales inferiores a 0,5 M y a temperatura ambiente, los ácidos nucleicos precipitan con CTAB.
- El tratamiento con CTAB permite eliminar los restos de la pared celular, proteínas desnaturalizadas y polisacáridos que forman complejos con el CTAB, quedando los ácidos nucleicos en solución.
- Con cloroformo/alcohol isoamílico los complejos CTAB – proteína/polisacárido quedan en forma de una interfase claramente visible después de centrifugar.

## 7.2. DIGESTIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO



## Estimación de la concentración de ADN para la digestión

1. Hacer el blanco con 100 µl de TE 1X
2. Diluir todas las muestras 1:100 con TE 1X (se necesitan 100µl)
3. Leer la absorbancia a 260 nm. La concentración de ADN se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración ADN } (\mu\text{g/ml}) = [\text{absorbancia muestra} - \text{absorbancia blanco}] \times 50$$

4. Calcular el volumen correspondiente a 4,5 µg de ADN para digerir con la enzima de restricción, según la siguiente fórmula:

$$4500 / \text{concentración ADN (ng/ml)} = \mu\text{l ADN para la digestión}$$

### Digestión del ADN cromosómico

La enzima utilizada para la digestión del ADN es *PvuII* que reconoce la secuencia siguiente que solo se encuentra representada una vez dentro de la IS6110

1. Digerir 4,5µg de ADN de cada una de las muestras y de la cepa control Mt14323 con *PvuII* en un volumen final de 20µl.

$$X \mu\text{l ADN} + 2 \mu\text{l tampón } 10\text{X} + Y \mu\text{l agua destilada} + 1,0 \mu\text{l } PvuII (15\text{U}/\mu\text{l}) = 20\mu\text{l}$$

El volumen de enzima adicionado nunca ha de ser superior al 10% del volumen final (el glicerol utilizado para la conservación del enzima puede alterar la reacción).

1. Incubar como mínimo 1 hora a 37°C.
2. Realizar un gel de comprobación para calcular por intensidad la cantidad de ADN a cargar en la electroforesis.

## 7.3. SEPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN POR ELECTROFORESIS

### Procedimiento

1. Preparar una solución de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X (150ml para un gel de 16x20 cm). Disolver la agarosa en el microondas y dejar enfriar en un baño a 65°C
2. Adicionar bromuro de etidio a una concentración final de 0,5µg/ml
3. Dejar solidificar en el soporte adecuado

4. Colocar en una cubeta de electroforesis con tampón TBE 0,5X
5. Adicionar 5 µl de [tampón muestra 5X + marcadores internos] a los 20 µl de muestra, quedando a una concentración final de tampón muestra 1X
6. Cargar en el primer pocillo, 5 µl de [fago lambda digerido con *HindIII* + tampón muestra].
7. En el segundo pocillo cargar el volumen correspondiente a ~ 2µg de ADN digerido de la cepa Mt14323
8. A partir del tercero y hasta el carril final, cargar el volumen correspondiente a ~ 2 µg de ADN de cada una de las muestras las cuales contienen los marcadores internos
9. Iniciar la electroforesis a 100 V los primeros 10 minutos y pasar después a ~ 25 V durante toda la noche (la resolución en la separación de los fragmentos disminuye a medida que se aumenta el voltaje)
10. Controlar la migración mediante luz ultravioleta [Transiluminador UVP].

Para homogenizar todos los geles, es conveniente que la banda de 2 kb del Fago lambda-*HindIII* quede a una distancia aproximada de 7 cm del pocillo

#### **Marcadores Moleculares**

##### Fago lambda-*Hind III*:

Las bandas obtenidas del fago λ, una vez digerido con *Hind III*, sirven para monitorizar la migración del ADN durante la electroforesis. Se prepara como sigue:

- 30µl fago λ (0,25µg/µl) + 3µl *Hind III* (15U/µl) + 4µl tampón de 10X + 3µl agua
- Incubar al menos 2 horas a 37°C

##### Tampón de muestra 5X más marcadores internos:

Los marcadores internos de pesos moleculares son una mezcla de *supercoiled DNA ladder-PvuII* + *PhiX174-HaeIII* [Gibco BRL]. Al añadirlo a cada una de las muestras, hay una migración conjunta del ADN problema y de estos marcadores, se pueden visualizar al rehibridar la membrana por segunda vez con *supercoiled DNA ladder* + *PhiX174-Hae III* como

sonda. Ello permite el cálculo preciso de peso molecular de cada una de las bandas y constituye un punto crítico para el análisis posterior de los patrones de bandas mediante *software* específico. Este tampón se prepara de la siguiente forma:

Precipitar el ADN durante toda la noche a -20°C

50µl *supercoiled ADN* (200 ng/µl)

150µl TE 1X

25 µl NaCl 5M

500 µl de etanol absoluto

Centrifugar a 12.000rpm durante 15 minutos

Secar el *pellet* y disolver el ADN en 40 µl TE 1X durante 2 horas a 37°C.

Digerir con *PvuII* e incubar a 37°C al menos 2 horas

40µl ADN *supercoiled* en TE 1X

5µl tampón 10X

5µl *PvuII*

Comprobar el estado del ADN en un gel de agarosa 0,8%

Mezclar:

7ml tampón muestra 5X

35µl *Supercoiled DNA ladder-PvuII* 1

ng/µl de la digestión anterior (200ng/µl)

7µl *PhiX174-HaeIII* (0,5 ng/µl)

#### 7.4. TRANSFERENCIA DE ADN (SOUTHERN BLOTTING)

Para facilitar esta transferencia, tanto la exposición a la luz UV como el tratamiento con HCl permiten romper el ADN en fragmentos pequeños. Con el tratamiento ácido se produce una despurinización parcial de determinados puntos, los cuales posteriormente, con el tratamiento alcali se romperán dando lugar a fragmentos más pequeños (~1kb) que se transfieren con mucha más eficacia.

1. Colocar el gel durante 5 minutos sobre luz UV en el transiluminador
2. Bañar el gel durante 10 minutos en 500ml de HCl 0,25 M

**Tabla 1. Pesos moleculares de los fragmentos de los diferentes marcadores.**

<b>Lambda-<i>HindIII</i></b> <b>(kb)</b>	<b>PhiX174-<i>HaeIII</i></b> <b>(pb)</b>	<b>Supercoiled DNA ladder-<i>PvuII</i></b> <b>(kb)</b>	<b>Mt 14323-<i>PvuII</i></b> <b>tras hibridación IS6110</b> <b>(kb)</b>
23,130	1353	16,210	14,4
9,419	1078	14,174	7,2
6,557	872	12,138	7,0
4,371	603	10,098	4,4
2,322	310	8,066	3,6
2,028	281/271	7,048	3,0
0,564	234	6,030	2,3
0,125	194	5,012	2,0
	118	3,990	1,8
	72	2,972	1,5
		2,067	1,4
			1,0

Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación: análisis del polimorfismo de restricción asociado a IS6110</b>	Fecha: PNT-MMT-02	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 5 de 9

3. Lavar con agua destilada
4. Colocar el gel durante 20 minutos en 500ml de NaOH 0,4 M
5. Lavar con agua destilada
6. Repetir paso número 4.
7. Volver a lavar con agua destilada
8. Colocar una papel 3MM [Whatman] de igual tamaño que el gel, humedecido con agua destilada sobre el soporte poroso de la unidad de transferencia al vacío
9. Poner encima una membrana Hybond N-plus [Amersham], del mismo tamaño que el gel, también humedecida con agua destilada
10. Poner a continuación un soporte impermeable con una ventana que se sobreponga 0,5 cm por encima de la membrana
11. Colocar el gel y secar el exceso de humedad con papel
12. Poner 5 µl del tampón marcador en el segundo y penúltimo pocillos
13. Sellar los pocillos y los costados del gel con agarosa al 1%
14. Cubrir el gel con SSPE 10X
15. Ajustar la bomba de vacío a 60 mB, aplicando el vacío durante 30 minutos
16. Para la fijación del ADN a la membrana, colocarla sobre un papel 3MM mojado por capilaridad en NaOH 0,4M. Dejarla dos minutos.
17. Lavar la membrana con SSC 5X durante 5 minutos
18. La membrana se puede utilizar directamente para la hibridación o conservarla envuelta con plástico a 4°C.
19. Para comprobar si la transferencia del ADN ha estado completa, se puede teñir el gel de agarosa en una solución de TBE 0,5X con 0,5µg/ml de bromuro de etidio. Si la transferencia ha sido correcta, no se observará ADN bajo luz ultravioleta

#### 7.5. OBTENCIÓN DE SONDA IS6110 POR PCR

Preparar la mezcla de amplificación:

Tampón 10X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	5 µl
Iniciador INS-1 (50ng/µl)	5 µl
Iniciador INS-2 (50ng/µl)	5 µl
DNTPs (10mM; 2,5mM cada uno)	4 µl
Taq Expand [Roche] (3,5U/µl)	0,36 µl
Agua	21,64 µl

Añadir 25 µl de ADN aislado de Mt14323 (12 ng/µl), obteniéndose un volumen final de reacción de 50µl  
Programar el termociclador de la siguiente manera:

Desnaturalización total del ADN	3min 96°C
25 ciclos	Desnaturalización 1min 96°C
	Hibridación 1min 65°C
	Polimerización 2min 72°C
Extensión final	6min 72°C
Conservación	4°C

La primera etapa asegura una desnaturalización total del ADN. La última etapa de extensión asegura que

todos los fragmentos de ADN están en forma de cadena doble.

Comprobar los productos de PCR en un gel de agarosa al 0,8% (2 µl PCR + 6 µl agua destilada + 2 µl tampón muestra 5X). Se ha de obtener una banda de 236 pb.

Purificar los productos de PCR mediante columnas *QIAquick PCR Purification kit* [Qiagen; Izasa], siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Determinar la concentración mediante espectrofotómetro [Gene Quant, Pharmacia] en una dilución 1:10 de la muestra.

Iniciadores utilizados:

**INS -1** 5`CGTGAGGGCATCGAGGTGGC (desde 631 pb hasta 650 pb)

**INS -2** 5`GCGTAGGCGTCGGTGACAAA (desde 856 pb hasta 875 pb)

#### 7.6. HIBRIDACIÓN CON SONDA COMPLEMENTARIA AL IS6110 Y DETECCIÓN.

Para la hibridación y detección se utiliza el kit *ECL™ Direct System* [Amersham] basado en el marcaje de la sonda con peroxidasa y la detección por quimioluminiscencia. Este marcaje se consigue desnaturalizando completamente la sonda y obteniendo por tanto cadenas sencillas de ADN cargadas negativamente. La enzima peroxidasa, formando complejo con un polímero cargado positivamente, se une al ADN por atracción de cargas primero y, posteriormente, de forma covalente mediante gluteraldehído. Esta sonda marcada se une específicamente durante la hibridación a los fragmentos de ADN homólogos fijados en la membrana. Durante el proceso de detección, la peroxidasa cataliza la oxidación del luminol que, en presencia de un elemento químico intensificador, emite luz que se puede detectar mediante de una película radiográfica.

##### **Marcaje de la sonda**

1. Diluir la sonda con agua destilada hasta una concentración de 10 ng/µl. Para una membrana de 320 cm<sup>2</sup> (gel de 16 x 20 cm) se necesitan ~200 ng de sonda. La cantidad mínima a marcar será de 200 ng/20 µl.

2. Hervir la sonda durante 5 minutos y colocarla rápidamente en hielo durante 5 minutos

3. Adicionar el mismo volumen de ADN *labelling reagent*

4. Adicionar el mismo volumen de gluteraldehído

5. Centrifugar pocos segundos a 12.000 x g e incubar 10 minutos a 37°C

##### **Hibridación y detección**

1. Colocar la membrana enrollada dentro de un tubo de hibridación (evitar la formación de burbujas de aire entre el tubo y la membrana ya que dificulta el contacto de la sonda con la membrana)

2. Para la prehibridación, adicionar 15 ml de tampón de hibridación e incubar a 42°C un mínimo de 20 minutos en un horno de hibridación a 6 rpm (es aconsejable 1 h)

Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación: análisis del polimorfismo de restricción asociado a IS6110</b>	Fecha: PNT-MMT-02	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 6 de 9

3. Para la hibridación adicionar la sonda marcada al tampón de hibridación (se recomiendan 20ng/ml de tampón de hibridación). Para evitar el contacto directo de la sonda concentrada con determinadas regiones de la membrana, es mejor hacer la mezcla de la sonda y el tampón en un recipiente aparte

4. Incubar toda la noche a 42°C un horno de hibridación a 6 rpm (a temperaturas mas elevadas se inactiva la peroxidasa)

5. Descartar el tampón de hibridación y hacer dos lavados de 20 minutos cada uno con el tampón de lavado 1 en el horno de hibridación a 42°C

6. Sacar la membrana del tubo y colocarla en una bandeja con 500 ml de tampón de lavado 2. Lavar durante 5 minutos con agitación y eliminar el líquido

7. Repetir el procedimiento anterior

En una habitación oscura (solo con luz roja)

8. Mezclar 12 ml de ECL *detection reagent* 1 con 12ml de ECL *detection reagent* 2

9. En una bandeja del tamaño de la membrana bañar esta membrana exactamente un minuto

10. Colocar la membrana en un cassette [Hypercassete RPN-3646, Amersham]. Poner delante de ella un elemento que permita el paso de la luz (como por ejemplo un plástico de transparencia) e impida el contacto directo con la película fotográfica

11. Poner la película fotográfica [Hyperfilm ECL, Amersham] y cerrar el cassette

12. Después de unos 30 o 40 minutos revelar la película

- Sumergir la película en líquido de revelado hasta observar que aparecen bandas. Sacar la película y pasar a la fijación

- Para fijar se debe sumergir la película en líquido fijador y dejarla hasta que pierda su color inicial (blanco) y quede completamente transparente

- Una vez fijada la película proceder a lavar en una cubeta con agua destilada o SSC 5X, dejar secar y guardar. En función del resultado, colocar una nueva película el tiempo que se considere conveniente

#### 7.7. HIBRIDACIÓN CON SONDA COMPLEMENTARIA A LOS MARCADORES INTERNOS

Una vez finalizada la detección con la sonda IS6110, la misma membrana se utiliza para repetir los procesos de hibridación y detección descritos anteriormente, pero, utilizando como sonda una mezcla de los marcadores internos. Esto da como resultado la obtención de una segunda película fotográfica con los fragmentos correspondientes a este marcador, la cual se puede sobreponer a la obtenida con la IS6110 gracias a los marcadores de pocillos (se observan en las dos películas). Es un paso imprescindible para poder comparar los patrones mediante un *software* específico

#### Preparación de la sonda

8 µl *PhiX174-Hae III* (0,5 µg/µl)

17µl *Supercoiled DNA ladder* (200 ng/µl)

475 µl agua destilada

Adicionar 20 µl por tubo de hibridación (15 ml de tampón de hibridación)

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

### 8.1. ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE BANDAS

Se recomienda el uso de un *software* que permita calcular los pesos moleculares de las bandas de cada canal del gel a partir de los marcadores internos del mismo canal. El *software* debe permitir así mismo comparar los patrones de bandas de las distintas cepas en función de estos pesos moleculares. Para la comparación de patrones se analizará el grado de divergencia existente entre cada dos patrones mediante el coeficiente de similitud de Dice ( $S_D$ ). Todos los coeficientes de similitud darán lugar a una matriz de similitud que se representará gráficamente en un dendrograma mediante el algoritmo *unweighted pair group method of averages* (UPGMA)

### 8.2. INTERPRETACIÓN

Se considera que dos o más patrones forman parte de una agrupación o cluster (cadena de transmisión reciente) cuando son idénticos tanto en el número como en la posición de las bandas. Con diferencias de una o dos bandas los patrones se considerarán muy relacionados y es conveniente su análisis con un segundo marcador (como por ejemplo el RFLP asociado a PGRS) para establecer su grado de relación.

## 9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán responsables del procesamiento de los aislados y de la elaboración de la técnica.

El facultativo responsable deberá emitir un informe donde se expresen los resultados de forma clara y comprensible y deberá validar éstos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La manipulación de cultivos de *M. tuberculosis* se realizará en una cabina de bioseguridad de tipo IIA con las medidas de protección de barrera adecuadas (mascarilla, bata y guantes) y en el contexto de un laboratorio de bioseguridad de tipo 3 con presión negativa, expulsión del aire al exterior y doble puerta de entrada.

El bromuro de etidio es considerado un compuesto mutagénico por contacto. Es necesario trabajar con esta sustancia en áreas designadas específicamente para ello y deshacerse de las soluciones utilizadas utilizando lo previsto en el Manual de Seguridad del Laboratorio o en el documento sobre el manejo de sustancias tóxicas correspondiente.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El estudio del polimorfismo asociado al IS6110 solamente tiene validez para analizar epidemiológicamente cepas de *M. tuberculosis*.

Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación: análisis del polimorfismo de restricción asociado a IS6110</b>	Fecha: PNT-MMT-02	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 7 de 9

El estudio del polimorfismo asociado al IS6110 no es discriminativo en las cepas con menos de 6 copias de esta secuencia. En este caso deberán utilizarse marcadores alternativos.

En poblaciones con alta incidencia de tuberculosis y un importante recambio de cepas, el polimorfismo asociado al IS6110 tiene capacidad de discriminación para detectar las cadenas de transmisión reciente, no obstante, en poblaciones con baja incidencia de tuberculosis y escaso recambio de cepas (por ejemplo, áreas rurales) cepas que compartan el mismo RFLP pueden pertenecer a distintas cadenas de transmisión.

Las diferencias entre patrones de una sola banda pueden ser debidas a microevolución del marcador dentro de una cadena de transmisión, por lo que se recomienda su estudio con un segundo marcador antes de considerar a estas cepas como independientes.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31:406-409.
2. Kanduma E, McHugh TD, Gillespies, SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. J Appl Microbiol. 2003; 94:781-791.



Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación: análisis del polimorfismo de restricción asociado a <i>IS6110</i></b>	Fecha: PNT-MMT-02	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 8 de 9

## ANEXOS

### Anexo 1: Composición de reactivos y soluciones

#### 1. Tampón 10X TE

100 mM Trizma base [Sigma] / HCL [Panreac], pH= 8,0

10 mM EDTA [Sigma]

Disolver en agua destilada, autoclavar y conservar a temperatura ambiente menos de un año

#### 2. Lisozima

10 mg lisozima [Sigma] / ml de agua destilada

Conservar en alícuotas a -20°C menos de un año

#### 3. SDS 10%

10 g SDS [Sigma] / 100ml de agua destilada.

Si es necesario, disolver a 65°C. No autoclavar. Conservar a temperatura ambiente menos de un año

#### 4. Proteínasa K

10 mg proteínasa K [Boehringer Mannheim] / ml de agua destilada

Conservar en alícuotas a -20°C menos de un año

#### 5. SDS/Proteínasa K

Se debe preparar al momento. Cantidad necesaria para una muestra:

5 µl proteínasa K 10 mg/ml (antes de adicionarla ponerla al baño 65°C durante 2 minutos)

70 µl SDS 10%

#### 6. NaCl 5M

29,22 g NaCl [Sigma]

Completar hasta 100 ml con agua destilada. Autoclavar y conservar a temperatura ambiente menos de un año.

#### 7. Solución CTAB/NaCl

Disolver 4,1 g de NaCl en 80 ml de agua destilada, cuando se haya disuelto y mientras se esta agitando adicionar lentamente 10 g CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide) [Merck]. Si es necesario calentar a 65°C.

Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada. Conservar a temperatura ambiente menos de 6 meses.

#### 8. Cloroformo / alcohol isoamílico 24:1

Mezclar 24 volúmenes de cloroformo [Merck] con un volumen de alcohol isoamílico [Sigma]. Conservar a temperatura ambiente menos de un año.

#### 9. Etanol 70%

Mezclar 7 volúmenes de etanol [Merck] con 3 volúmenes de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente menos de un año.

#### 10. Tampón muestra 5X:

50% glicerol (v/v) [Merck] 50ml

50 mM Trizma base/HCl pH 7.5 5ml 1M Trizma/HCl pH 7.5

5 mM EDTA 5ml 100mM EDTA

0.05% Azul de bromofenol [LKB] 0.05g

#### 11. Fag Lambda-Hind III + tampón muestra:

Fag Lambda-Hind III 40 µL

TE 1X 120 µL

Tampón muestra 5X 40µL

Conservar a 4°C menos de un año

#### 12. TBE 1X (Tampón Tris-borato-EDTA) pH 8,2

89 mM Trizma base

89 mM ácido bórico [Sigma]

2,5 mM EDTA

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente menos de un año.

#### 13. Bromuro de Etidio 500 µg/ml

Disolver 50 mg de bromuro de etidio [Sigma] en 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C en una botella oscura (proteger de la luz) menos de un año.

#### 14. HCl 1M

Adicionar 85,5 ml de HCl concentrado (37% p.a) a 914,6 ml de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente.

#### 15. NaOH 4M

Disolver 160g de NaOH [Panreac] en 800ml de agua destilada. Ajustar el volumen final a 1000 mL. Conservar a temperatura ambiente menos de 3 meses.

#### 16. Tampón marcador de pocillos

35µl de ADN cromosómico de *M. tuberculosis* (1 µg/ng)

5 µl de NaOH 4M

10µl (tampón muestra 5X mas marcadores internos)

Conservar a 4°C

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación: análisis del polimorfismo de restricción asociado a <i>IS6110</i></b>	Fecha: PNT-MMT-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

**17. SSPE 10X**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O [Merck] 26,81 g/L  
NaCl 1,8 M 105,12 g/L  
EDTA 10 mM 3,7 g/L

Ajustar pH a 7,4, autoclavar. Conservar a temperatura ambiente menos de un año.

**18. SSC 20X**

NaCl 3 M 175,3 g/L  
Na-citrato 0,3M [Amresco] 88,2 g/L

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5 M, autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

**19. Tampón Hibridación (kit ECL *Direct System*, Amersham) (500ml)**

Adicionar 14,6 g de NaCl para obtener una concentración final de 0,5 M. Una vez disuelto, añadir muy lentamente 25 g del agente bloqueante. Para facilitar la disolución se puede calentar a 42°C. Conservar en alícuotas de 15ml a -20°C.

**20. Tampón de lavado 1**

360g Urea [sigma]  
4g SDS  
25ml SSC 20X

Ajustar a 1000 ml con agua destilada. No autoclavar (preparar justo antes de utilizar)

**21. Tampón de lavado 2**

Mezclar 100 ml de SSC 20X con 900 ml de agua destilada.

**22. SSC 20X**

NaCl 3M 175,3 g/L  
Na-citrato 0,3M 88,2 g/L

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH. Conservar a temperatura ambiente menos de un año

**23. Revelador [Agfa]**

Diluir 1:10 con agua destilada. Conservar en una ampolla oscura menos de un mes

**24. Fijador [Agfa]**

Diluir 1:10 con agua destilada. Conservar en una ampolla oscura menos de un mes

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-MMT-03**  
**ANÁLISIS DEL ADN CROMOSÓMICO MEDIANTE MACRORRESTRICCIÓN:**  
**TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL ADN CROMOSÓMICO MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO**  
**PULSANTE (PFGE)**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N°.** .....**ASIGNADA A**.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)	Fecha: PNT-MMT-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la metodología necesaria para el estudio epidemiológico de microorganismos mediante macrorrestricción del ADN cromosómico y electroforesis en campo pulsante (PFGE). Este procedimiento se describe según la metodología del sistema de PFGE CHEF-DRII (o DRIII) de BioRad. La utilización de otros sistemas de PFGE requeriría la adaptación del procedimiento a las normas de funcionamiento y a los componentes del sistema correspondiente.

## 2. FUNDAMENTO

La tipificación molecular de microorganismos mediante PFGE tiene como objeto reconocer la relación epidemiológica entre aislados y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo ancestral común. A la vez debe diferenciar aislados no relacionados, independientemente, de que pertenezcan a la misma especie microbiológica o taxón. Mediante esta técnica separamos fragmentos de ADN cromosómicos de elevado tamaño mediante una técnica especial de electroforesis, en la que se aplican campos eléctricos de incidencia pulsante. Este procedimiento consta de varias fases:

1. Extracción del ADN cromosómico bacteriano.
2. Restricción del ADN, utilizando enzimas de restricción de baja frecuencia de corte.
3. Separación de los fragmentos obtenidos mediante PFGE.

Mediante este procedimiento se consigue dividir el cromosoma bacteriano en patrones sencillos (de 10-20 bandas), lo cual facilita la comparación de unos aislados con otros, permitiendo establecer grados de similitud genética entre las bacterias estudiadas.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de funcionamiento correspondiente al sistema de PFGE
- Bibliografía correspondiente de cada técnica
- Manual de Seguridad. Laboratorio de Microbiología

## 4. MUESTRAS

- Cultivos bacterianos en cultivo puro, aislados en placas de agar sangre.
- (Normalmente, esta técnica se aplica a una serie de aislados –dos o más- entre los que se pretende estudiar su relación genética).

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

(La composición de los tampones empleados en este procedimiento figura en los anexos 1 y 2)

- Placas de Agar sangre
- Agarosa para geles y agarosa de bajo punto de fusión
- EDTA
- Acido bórico

- Cloruro sódico
- Deoxicolato sódico
- Sarcosyl
- Tris
- Brij-58
- Lisozima
- Lisoestafina
- Mutanolisina
- Proteinasa-K
- RNAsa-A
- Enzimas de restricción (Anexo 3)
- Bromuro de etidio
- Controles de peso molecular para PFGE

## 6. APARATOS Y MATERIAL

### 6.1. APARATOS

- Equipo CHEF-DRIII (o similar) compuesto de: controlador de pulsos, cubeta de electroforesis, sistema de refrigeración y bomba de recirculación de tampón
- Elementos para la confección de geles de agarosa: molde, bandejas y peines
- Agitador orbital
- Baño maría
- Cámara fotográfica, transiluminador luz UV
- Centrífuga de sobremesa
- Vórtex
- Espectrofotómetro y cubetas desechables de 1,5 ml
- Calentador/Agitador
- Termobloque

### 6.2. OTRO MATERIAL

- Asas bacteriológicas
- Pipetas de volumen variable
- Puntas pipeta estériles
- Moldes para la solidificación de bloques de agarosa (suministrados por BioRad o similares)
- Tubos estériles tipo *ependorf* de 1,5 ml
- Tubos de plástico desechables estériles de 4-6 ml

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. EXTRACCIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO

#### **Determinar el inóculo del microorganismo**

- Hacer una lista de trabajo asignando números correlativos a cada una de las cepas a estudiar
- Rotular tubos *ependorf* de 1,5 ml con los números de cepa asignados y dispensar 500 µl del tampón PIV (Anexo 1) en cada tubo *ependorf*
- Añadir, aproximadamente, una asa blanca del cultivo y homogeneizar mediante el vórtex
- Centrifugar 3 minutos en la microcentrífuga de sobremesa a 13.000 rpm
- Eliminar el sobrenadante, primero por decantación, luego con punta amarilla. Dejar el pellet lo más seco posible

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)</b>	Fecha: PNT-MMT-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

- Resuspender el pellet en 200µl de PIV, cuidadosamente, utilizando puntas amarillas (suspensión de trabajo)
- Preparar las cubetas del espectrofotómetro con 1 ml de PIV, rotular y añadir 5 µl de la suspensión de trabajo obtenida en el punto anterior
- Medir la densidad óptica (OD<sub>620</sub>) en el espectrofotómetro y calcular el volumen de PIV necesario para la dilución, de acuerdo con la siguiente ecuación:  $Vol_{dil} = (OD_{620} \times 40 \times 210) - 210$
- Añadir el volumen de PIV necesario para la dilución a la suspensión de trabajo (suspensión de trabajo diluida)

#### **Preparar moldes de agarosa**

- Mantener una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% fundida, con la ayuda de un baño maría adecuado (>40°C)
- En nuevos tubos *ependorf*, convenientemente rotulados, mezclar 100µl de la solución de trabajo diluida y 100µl de la solución de agarosa fundida. Vortear, evitando que se enfríe en exceso
- Rellenar los moldes para la solidificación de la mezcla (sirven los suministrados por BioRad, u otros similares)
- Conservar 5 m a -20°C y, como mínimo, 10 m a temperatura ambiente

#### **Lisis**

- Preparar tantos ml de tampón de lisis (ST) como microorganismos se estén analizando. Para obtener la solución de lisis, al ST deben añadirse determinados enzimas (ver Anexo 2) en función de la especie bacteriana a estudiar. En tubos de plástico estériles desechables, convenientemente rotulados, dispensar 1 ml de dicha solución.
- Una vez transcurridos, como mínimo, 10 m a temperatura ambiente, los bloques de agarosa se habrán solidificado. Empujarlos cuidadosamente (con la ayuda de un asa de cultivo o de la pestaña específica para ello, en caso de utilizar los moldes de BioRad) hasta introducirlos en el correspondiente tubo estéril de plástico que contiene 1 ml de la solución de lisis. Todos los bloques obtenidos del mismo microorganismo deben depositarse en el mismo tubo
- Incubar a 37°C durante 5 horas

#### **Tratamiento con proteinasa-K**

- Decantar la solución de lisis y sustituirla por 1 ml de una solución (ES) de proteinasa-K (1 mg/ml) recién preparada
- Incubar 18 h (hasta el día siguiente) a 50°C

#### **Lavados**

- Decantar la solución de proteinasa-K y sustituirla, llenando completamente el tubo, por tampón TE. Disponer los tubos horizontalmente en un agitador orbital y mantenerlos en agitación suave durante 30-45 m. Al cabo de este tiempo, decantar el TE y sustituirlo por uno nuevo repitiendo el proceso. Es necesario repetir este proceso durante 4 ó 5 veces

- Finalizados los lavados los discos se conservan en TE a 4°C

#### **7.2. DIGESTIÓN DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

- Seleccionar los bloques de las cepas a estudiar y hacer una lista de trabajo asignando números correlativos a cada una de las cepas
- Numerar correlativamente tubos *ependorf* de 1,5 ml con los números de cepa asignados y depositar en su interior una porción de un tamaño similar de cada uno de los bloques (para ello depositar cada bloque en una placa de Petri vacía y seccionarlos utilizando el borde de un cubreobjetos; para transferirlos a los tubos correspondientes se pueden utilizar asas bacteriológicas azules)
- Preparar la solución de restricción. Esta reacción se llevará a cabo en un volumen de 40µl del tampón de restricción (1x) específico de cada enzima, al que se le añadirá el enzima de restricción y albúmina bovina sérica (BSA) si la reacción lo precisa. Para la preparación de la solución de restricción consultar en el Anexo 3 cuál es el enzima de restricción más adecuado para el microorganismo en estudio, así como: i) cuántas unidades por reacción son necesarias; ii) la necesidad de añadir albúmina bovina sérica (BSA) y iii) la temperatura de incubación
- Añadir 40µl de la solución de restricción en cada uno de los tubos *ependorf* conteniendo el disco correspondiente, asegurándose de que el disco queda inmerso en la solución
- Incubar a la temperatura adecuada (Anexo 3) durante 18 horas, en un termobloque.

#### **7.3. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE)**

##### **Preparación del gel de agarosa al 1%**

- Preparar un gel de agarosa normal al 1% en 0,5xTBE. Mezclando los siguientes componentes e hirviendo durante 5-10 m.

Volumen final	Agarosa	10xTBE	Agua bidestilada
100 ml (16 pocillos)	1 g	5 ml	95 ml
150 ml (30 pocillos)	1,5 g	7,5 ml	142,5 ml

- Dejar enfriar la solución en agitación durante 30 m
- Preparar el molde de ECP de BioRad (u otro similar, en función del sistema que se utilice), encajando la bandeja en el soporte. Seleccionar el peine correspondiente –16 ó 30 pocillos- y colocar consecutivamente en cada uno de los dientes el bloque correspondiente, siguiendo el orden establecido al inicio del proceso de restricción. Es recomendable la colocación en los extremos de sendos controles de peso molecular. Colocar el peine ya cargado con los discos en las ranuras del molde de PFGE

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)</b>	Fecha: PNT-MMT-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

- Verter cuidadosamente la agarosa, evitando que ésta arrastre alguno de los bloques, y esperar 30 m hasta que la agarosa solidifique.

#### **Colocación en el sistema CHEF-DRIII**

- Preparar 2 L de tampón de electroforesis 0,5xTBE (100 ml 10xTBE en 1900 ml de agua bidestilada) y verter en la cubeta de electroforesis.
- Poner en marcha el sistema de acuerdo a los siguientes parámetros:
- Controlador de pulsos, sus condiciones se programarán de acuerdo con el anexo 3, a excepción de: voltaje (*voltios/cm*) que siempre se mantiene en 6,00 y ángulo (*included angle*) que se mantiene en 120°.
- Bomba de recirculación del tampón de electroforesis (botón naranja). Debe programarse a una velocidad aproximada de 1L /m (posición 70, en el regulador de la velocidad).
- Refrigerador, cuya temperatura deberá ajustarse según el ciclo de PFGE (Anexo 3).
- Desmontar el molde que contiene el gel y depositarlo, sujeto a la bandeja, en la cubeta de PFGE. Comprobar que la cubeta contiene el marco adecuado para la bandeja, ajustar ésta en el espacio correspondiente y cerrar la tapa de la cubeta.
- Conectar los electrodos y poner en marcha el sistema (tecla "Start run" del controlador de pulsos).

#### **Extracción del gel y tinción**

- Una vez finalizados los ciclos del PFGE en la pantalla del controlador aparece el mensaje "Off". Abrir la tapa de la cubeta y extraer el gel sujeto a la bandeja.
- La cubeta debe vaciarse del tampón de electroforesis, utilizando el conector designado para ello, y lavarse con agua bidestilada, si no se va a volver a utilizar inmediatamente.
- Desprender el gel de la bandeja y sumergirlo en una solución de bromuro de etidio durante 30 m, a temperatura ambiente.
- Visualizar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y fotografiarlo.

### **8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS**

La lectura e interpretación de los resultados se hará sobre la foto tomada del gel. Esta técnica se aplica para comparar la similitud genética de una serie de aislados (dos o más), por tanto, para interpretar los patrones de bandas obtenidos debe compararse cada aislado con todos los demás de la serie. En general, cuando dos microorganismos difieran en más de tres bandas se le asignarán "genotipos" propios expresados mediante un número; si la diferencia estriba en tres o menos bandas, se considerarán "subtipos" de un precursor común y ésto se expresará utilizando subíndices numéricos (ej. genotipo 1.1, significa "genotipo 1, subtipo 1") . Para una revisión en detalle de la interpretación de

esta técnica, se recomienda consultar el artículo de Tenover *et al* (*Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produce by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. J Clin Microbiol.1995 33: 2233-2239) así como el documento científico de este procedimiento.

### **9. RESPONSABILIDADES**

Los técnicos de laboratorio serán responsables del procesamiento de los aislados y de la elaboración de la técnica.

El facultativo responsable deberá emitir un informe donde se expresen los resultados de forma clara y comprensible y deberá validar éstos.

### **10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO**

El sistema CHEF-DRIII utiliza voltajes y corrientes elevadas y, por tanto, debe ser manejado con extremo cuidado mientras está en funcionamiento. Se deben mantener las siguientes precauciones:

- Para evitar descargas eléctricas, el sistema debe funcionar en una zona con superficies secas.
- El sistema contiene cierres de seguridad que no deben violarse mientras el sistema está conectado, asegurarse de desconectarlo de la corriente eléctrica antes de manipular cualquiera de sus componentes (cambios de electrodos, de fusibles, desconexión del circuito de refrigeración, etc.).
- Cuando se interrumpa una electroforesis, es preciso que la corriente descienda hasta 0 mA ó aparezca el mensaje *OFF* antes de abrir la tapa de la cubeta de electroforesis y manipular su interior.
- Aunque el refrigerador está aislado y prácticamente no circula corriente en el tampón de electroforesis a su paso por el refrigerador, debe evitarse desconectar los tubos por los que afluye el tampón de electroforesis al refrigerador mientras el sistema está funcionando.

El bromuro de etidio es considerado un compuesto mutagénico por contacto. Es necesario trabajar con esta sustancia en áreas designadas específicamente para ello y deshacerse de las soluciones utilizadas utilizando lo previsto en el Manual de Seguridad del Laboratorio o en el documento sobre el manejo de sustancias tóxicas correspondiente.

### **11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

- Este procedimiento ha sido redactado para la utilización del sistema de ECP CHEF-DRII (o DRIII) de BioRad. La utilización de cualquier otro sistema requeriría la adaptación del procedimiento a las normas de funcionamiento y a los componentes del sistema correspondiente.
- En esta técnica se describe el procesamiento necesario para el análisis del ADN cromosómico en bacterias exclusivamente.

### **12. BIBLIOGRAFIA**

1. Soll DR, Lockhart SR, Pujol C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. En:

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)</b>	Fecha: PNT-MMT-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Arbeit RD, Goering RB, Mickelsen BA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Manual of Clinical Microbiology. 8ª Edición. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003; pp 139-161.

2. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RB, Mickelsen BA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produce by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-2239

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)</b>	Fecha: PNT-MMT-03	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

### Anexo 1. Composición de las soluciones tampón y enzimas modificantes

**ATENCIÓN:** Todas las soluciones que se exponen a continuación deben ser autoclavadas antes de ser utilizadas.

**1. PIV:** 0,01mM Tris-HCl (pH= 8); 1M NaCl

(Para 1 L mezclar: - 10 ml Tris 1M pH8  
- 200 ml NaCl 5M  
- 790 agua bidestilada)

Autoclavar en alícuotas de 250 ó 500 ml)

**2. ST (solución básica de lisis):**

6 mM Tris-HCl (pH= 8); 1 M NaCl; 0.1 M EDTA (pH= 8); 0.2% Desoxicolato sódico; 0.5% Sarcosyl

(Para 100 ml mezclar: - 0,6 ml Tris pH=8  
- 20 ml NaCl 5M  
- 20 EDTA 0,5M pH= 8  
- 2 ml Desoxicolato sódico 10%  
- 5 ml Sarcosil 10%)

Autoclavar en alícuotas de 100 ó 200 ml)

**3. ES (solución para la incubación con proteinasa-K):**

0,5 M EDTA (pH= 9), 1% Sarcosil

(Para 100 ml mezclar: - 90 ml EDTA 0,5M pH 8  
- 10 ml Sarcosil 10%)

Autoclavar en alícuotas de 100 ó 200 ml)

**4. TE:**

10 mM Tris-HCl (pH= 8), 1mM EDTA (pH= 8)

(Para 1 L mezclar: - 10 ml Tris 1M pH= 7,5  
- 2 ml EDTA 0,5M pH= 8  
- 988 ml agua bidestilada)

Autoclavar en alícuotas de 500 ml ó 1 L)

**5. TBE (10x):**

890 mM Tris, 890 mM Acido bórico, 20 mM EDTA pH= 8

(Para 1 L mezclar: - 108 gr. Tris base  
- 55 g. Acido bórico  
- 40 ml EDTA 0,5 M pH= 8)

Autoclavar en alícuotas de 500 ml ó 1 L)

**6. preSma:**

6 mM Tris pH8, 20 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>

(Para 100 ml mezclar: - 0,6 ml Tris pH 8  
- 2 ml KCl 1M  
- 0,6 ml MgCl<sub>2</sub>)

Autoclavar en alícuotas de 100 ó 200 ml)

**ATENCIÓN:** Inmediatamente antes de su utilización añadir 2-mercaptoetanol hasta alcanzar una concentración 6 mM (p. ejemplo: para 7,5 ml de preSma añadir 3,15 µl de 2-mercaptoetanol).



Servicio de Microbiología Hospital.....	Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)	Fecha: PNT-MMT-03	
		Edición Nº 01	Página 7 de 8

## Anexo 2. Composición de la solución de lisis

El volumen de enzimas modificantes a añadir, por ml de ST, se especifica en la siguiente tabla (la concentración de partida de los enzimas modificantes figura bajo la tabla):

	ST (ml)	RNasa (10mg/ml)	Lisozima (50mg/ml)	Lisoestafina (10mg/ml)	Brij 58 (10%)
Bacilos gramnegativos	1ml	5µl	2µl	-	-
<i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> <i>S. pneumoniae</i>	1ml	5µl	2µl	-	50µl
Estafilococos	1ml	5µl	2µl	5µl	50µl
<i>S. pyogenes</i>	1ml	5µl	2µl	-	50µl
Enterococos resistentes a la solución básica de lisis	1ml	5µl	2µl	-	50µl
<i>C. difficile</i>	1ml	5µl	20µl	-	50µl

**RNasa-A:** Solución de 10 mg/ml en agua bidestilada autoclavada. Debe hervirse durante 5 m antes de repartir en alicuotas de 600 µl en tubos tipo *ependorf* (1,5 ml).

**Lisozima:** Solución de 50 mg/ml en agua bidestilada autoclavada. Se reparte en alicuotas de 300 µl en tubos tipo *ependorf* (1,5 ml).

**Lisoestafina:** Solución de 10 mg/ml en agua bidestilada autoclavada. Se reparte en alicuotas de 600 µl en tubos tipo *ependorf* (1,5 ml).

**Brij-58:** Solución al 10% en agua bidestilada.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)	Fecha: PNT-MMT-03	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

### Anexo 3. Relación de microorganismos, enzimas de restricción, condiciones de restricción y condiciones de PFGE

MICROORGANISMO	RESTRICCIÓN (*)				PFGE		
	Enzima	Unidades/reacción	BSA	T <sup>a</sup>	Pulsos	T <sup>a</sup>	Horas
<i>S. aureus</i> Estafilococos coagulasa negativa	<i>SmaI</i> (*)	10	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	1-30 s	14°C	23 h
<i>S. pneumoniae</i>	<i>SmaI</i> (*)	10	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	1-30 s	11°C	23 h
<i>S. pneumoniae</i>	<i>ApaI</i>	10	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	1-30 s	11°C	23 h
<i>E. faecalis</i>	<i>SmaI</i> (*)	24	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	5-35 s	11°C	26 h
<i>E. faecalis</i>	<i>ApaI</i>	30	-	25°C	0,5-15 s	11°C	18 h
<i>E. faecium</i>	<i>SmaI</i>	24	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	0,1-15 s	11°C	24 h
<i>E. gallinarum</i>	<i>SmaI</i> (*)	24	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	0,1-10 s	11°C	20 h
<i>S. pyogenes</i>	<i>SfiI</i>	30	-	50°C	20-70 s	14°C	24h
<i>C. difficile</i>	<i>SmaI</i> (*)	20	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	1-30 s	11°C	23 h
<i>E. coli</i>	<i>XbaI</i>	40	0,8 µl (200µg/ml)	37°C	1-30 s	14°C	23 h
<i>E. aerogenes</i>	<i>XbaI</i>	40	0,8 µl (200µg/ml)	37°C	1-30 s	14°C	23 h
<i>K. pneumoniae</i>	<i>XbaI</i>	40	0,8 µl (200µg/ml)	37°C	1-30 s	14°C	23 h
<i>S. enteritidis</i>	<i>SpeI</i>	2,5	0,4 µl (100µg/ml)	37°C	1-30 s	11°C	23 h
<i>S. enteritidis</i>	<i>XbaI</i>	40	0,8 µl (200µg/ml)	37°C	1-30 s	11°C	23 h
<i>S. enteritidis</i>	<i>SpeI</i> + <i>XbaI</i>	2,5+40	0,8 µl (200µg/ml)	37°C	0,5-25	11°C	33h
<i>P. aeruginosa</i>	<i>SpeI</i>	2,5	0,4 µl (100µg/ml)	37°C	0,5-15 s	14°C	20 h
<i>B. cepacia</i>	<i>XbaI</i>	40	0,8 µl (200µg/ml)	37°C	1-30 s	14°C	23 h
<i>A. baumannii</i>	<i>SmaI</i> (*)	10	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	0,5-15 s	14°C	20 h
<i>A. baumannii</i>	<i>ApaI</i>	20 (incubar 5 horas)	0,8 µl (200µg/ml)	25°C	1-30 s	14°C	23 h

(\*) El tampón más adecuado para la restricción en cada caso, es el que viene suministrado por el fabricante. Sin embargo, en la restricción con el enzima *SmaI*, utilizamos preparamos un tampón de restricción (pre*Sma*) (ver anexo 1).

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-MMT-04**  
**ANÁLISIS DEL ADN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN CON PCR:**  
**TIPIFICACIÓN MOLECULAR UTILIZANDO TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ADN RELACIONADO CON**  
**SECUENCIAS REP (*repetitive extragenic palindrom*)**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N°. ....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante amplificación con pcr: Tipificación molecular utilizando técnicas de amplificación de ADN relacionado con secuencias rep (<i>repetitive extragenic palindrom</i>)</b>	Fecha: PNT-MMT-04	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 2 de 5

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Descripción de una metodología derivada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para estudios de epidemiología molecular

## 2. FUNDAMENTO

El campo de aplicación de la REP-PCR (*repetitive extragenic palindrom*) se encuentra limitado a bacilos Gram-negativos; de hecho se ha utilizado para la tipificación de *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium* y *Acinetobacter baumannii* entre otros.

La técnica se basa en la utilización de cebadores diseñados frente a secuencias palindrómicas repetidas a lo largo del cromosoma bacteriano, que permiten amplificar regiones del genoma localizadas entre dos cebadores adyacentes.

Las fases de la metodología son las siguientes: i) Extracción del ADN del microorganismo, ii) Reacción en cadena de la polimerasa y iii) Separación de los productos de PCR o amplicones.

El número de bandas de ADN que se observan en los patrones de REP-PCR oscila de 3 a 10 con tamaños variables, lo que permite su fácil interpretación.

Esta metodología se utiliza cuando se necesita disponer de resultados rápidos de tipificación bacteriana para la definición de un posible brote epidémico o para conocer si estamos delante de una reinfección o recidiva. Los resultados se pueden obtener en el mismo día.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manuales de funcionamiento correspondientes a los aparatos empleados (termociclador)
- Bibliografía correspondiente de cada técnica
- Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología

## 4. MUESTRAS

Cultivo bacteriano puro crecido en placas de agar sangre.

(Normalmente, esta técnica se aplica a una serie de aislados –dos o más- entre los que se pretende estudiar su relación genética).

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

(La composición de los tampones empleados en este procedimiento figura en el anexo 1)

- Placas de agar sangre
- Medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB)
- Agua destilada estéril.
- Dinucleótidos (ddNTPs).
- Cebadores
  - REP-1 5' IIIGCGCCGICATCAGGC 3'
  - REP-2 5' ACGTCTTATCAGGCCTAC 3'
- *Taq* polimerasa (Este enzima viene con el tampón de pH adecuado para su óptima actividad, comprobar que el Mg<sup>2+</sup> venga incorporado en la solución tampón)

- Aceite mineral.
- Agarosa
- Bromuro de etidio, se utiliza a una concentración de 0,5 mg/L
- Marcador de peso molecular: 100 bp Ladder (Invitrogen - Ref. 15628019)
- Tris base
- EDTA
- Azul de bromofenol
- Sacarosa
- Lisozima
- Proteinasa K
- RNasa
- SDS
- Cloruro de Magnesio
- Cloruro de Potasio
- Acido acético glacial
- Fenol
- Cloroformo-isoamilalcohol
- Acetato amónico
- Etanol absoluto

## 6. APARATOS Y MATERIAL

### 6.1. APARATOS

- Termociclador (Existen en el mercado un gran número de termocicladores de diversas casas comerciales. En principio cualquiera de ellos puede servir).
- Microcentrífuga para tubos eppendorf.
- Cubetas para electroforesis en gel de agarosa.
- Fuente de electroforesis.
- Elementos para la confección de geles de agarosa: molde, bandejas y peines.
- Transiluminador de luz ultravioleta y cámara fotográfica o analizador de imágenes.
- Termobloque

### 6.2. OTRO MATERIAL

- Asas bacteriológicas.
- Tubos eppendorf de 1, 5 ml.
- Pipetas de volumen variable y puntas estériles.
- Tubos de PCR de 0,6 ml.
- Soporte de tubos eppendorf.

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. EXTRACCIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO

**Opción 1. Purificación del ADN.** La ventaja de este procedimiento es que permite la cuantificación posterior del ADN purificado, favoreciendo de esta manera la estandarización de la técnica. Si bien existe una amplia variedad de sistemas comercializados de extracción de ADN cromosómico bacteriano nosotros utilizamos la metodología que se cita a continuación.

1. Obtener por centrifugación (13.000 rpm durante 10 minutos) el sedimento de células de un cultivo de toda la noche (1,5 ml). El medio de cultivo utilizado es caldo LB.
2. Añadir al sedimento 500 µl de Tris 50 mM pH= 8,0 + sacarosa 25%

Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante amplificación con pcr: Tipificación molecular utilizando técnicas de amplificación de ADN relacionado con secuencias rep (<i>repetitive extragenic palindrom</i>)</b>	Fecha: PNT-MMT-04	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 3 de 5

3. Centrifugar 1 minuto en una microcentrífuga a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender las células en 50 µl de Tris 50 mM pH= 8,0 – 1 mM EDTA – sacarosa 25% con 10 mg/ml de lisozima (*Solución I* en Anexo 1) e incubar a 37°C durante 30 minutos.
5. Añadir 150 µl de Tris-HCl 50 mM – 1 mM EDTA – 1% SDS – proteinasa K 1 mg/ml (*Solución II* en Anexo 1) e incubar a 50°C durante 60 minutos.
6. Añadir 200 µl de TE. Fenolizar con un volumen de fenol-TES y un volumen de cloroformo-isoamilalcohol. Agitar por inversión, centrifugar 5 minutos y recoger la fase acuosa. Repetir este paso hasta que la fase quede limpia, normalmente tres veces.
7. Añadir 2 volúmenes de cloroformo-isoamilalcohol. Agitar, centrifugar y recoger la fase acuosa.
8. Añadir RNasa (stock 5 mg/ml) a una concentración final de 40 µg/ml (3 µl/400 µl) e incubar 15 minutos a 37°C.
9. Añadir 1/3 de volumen de Acetato amónico 7,5 M (125 µl) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (800 µl).
10. Precipitar a –20°C toda la noche.
11. Centrifugar 20 minutos y lavar con 100 µl etanol al 70%.
12. Secar y resuspender en 50 µl de TE.
13. Diluir 1:100 la solución de ADN y determinar la densidad óptica a 260 nm. La solución obtenida se diluye hasta obtener una concentración de 100 µg/ml, siendo esta la solución de trabajo.

**Opción 2. Lisis de colonia.** Este es un sistema mucho más sencillo que el presentado en la opción 1.

1. Una colonia del microorganismo a analizar crecido en agar sangre se resuspende en 25 µl de agua destilada estéril depositada en un tubo de PCR (0,6 ml) y se hierve durante 10 minutos.
  2. Centrifugar durante 30 segundos a 13.000 x rpm en una microcentrífuga.
- 7.2. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.
14. Coger un tubo de PCR (0,6 ml) y añadir 2,5 µl de la solución de ADN (100 µg/ml) y 22,5 µl de agua destilada estéril.
  15. Añadir 25 µl de una solución que contiene 20 mM Tris-HCl (pH= 8,8), 100 mM KCl, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % p/v de gelatina (Esta solución de tampón de pH viene con la *Taq* polimerasa a una concentración 10X y se diluye 1:5 para obtener una concentración 2X), 400 µM ddNTPs, 1 µM de cada cebador y 2,5 Unidades de *Taq* polimerasa.
- (En la opción 2 esta misma solución se añade a los 25 µl de la suspensión de la colonia lisada)
16. Añadir dos gotas de aceite mineral. Hay termocicladores en los que no es necesario

añadir estas gotas de aceite mineral sobre la mezcla de reacción.

17. Las condiciones de amplificación son las siguientes:

Treinta ciclos a:

- 94°C durante 1 minuto.
- 40°C durante 1 minuto
- 65°C durante 8 minutos.
- Extensión final a 65°C durante 16 minutos.

### 7.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

La separación de los productos de PCR (amplicones) obtenidos se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

*Preparación del gel:*

1. Se pesan 2 gr de agarosa y se disuelven en 100 ml de TAE ( se trabaja a 1X), para ello es menester calentar la mezcla a punto de ebullición, hasta que quede transparente. Generalmente se utiliza un horno microondas.
2. Deja enfriar, hasta que es posible cogerlo con la mano.
3. Añadir el bromuro de etidio (5 µ), y verter sobre el lecho (este se habrá sellado con anterioridad, disponiendo en él, los peines necesarios (uno, dos, ...). En el supuesto de que el lecho fuese de otra capacidad se respetará este protocolo alterando los volúmenes en función de la misma a fin de trabajar con las mismas concentraciones.

*Preparación de la muestra:*

1. Cuando el gel se ha solidificado, se ubica en la cámara electroforética (tras retirar los elementos de sellado y los peines)
2. Seguidamente, se mezclan 20 µl de muestra con 5 µl de tampón de carga al 4% y cuidadosamente se depositan en el correspondiente pocillo del gel, procediéndose así hasta culminar la carga de las muestras.

*Condiciones de electroforesis:*

En líneas generales se utiliza un voltaje de 6 V/cm (considerando la distancia existente entre los polos de la cámara electroforética), en una cámara estándar de 10 cm, serían 60 V. Eventualmente pueden usarse otros voltajes. Así un voltaje inferior resultará en un mayor tiempo de electroforesis. Mientras que uno superior resultaría en una mayor rapidez (aún cuando a veces supone una merma en la calidad de los resultados). Dado que se precisa una buena separación de las bandas, es aconsejable que el frente de electroforesis al menos corra 3/4 partes del gel, lo que puede costar alrededor de un par de horas en condiciones estándar. El tampón de electroforesis es TAE (1X).

### 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Tras la visualización del gel y su posterior impresión fotográfica o mediante papel térmico si se dispone de sistema de análisis de imágenes se compararán los

Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante amplificación con pcr: Tipificación molecular utilizando técnicas de amplificación de ADN relacionado con secuencias rep (<i>repetitive extragenic palindrom</i>)</b>	Fecha: PNT-MMT-04	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 4 de 5

patrones de bandas, definiendo para cada patrón diferente una nomenclatura que puede ser numérica (Ej, I, II, etc..) o mediante letras (Ej: a, b, c.....). Si los patrones sólo difieren en una banda se considerarán como subtipos, aunque este es un aspecto que no ha sido evaluado en profundidad.

## 9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán responsables del procesamiento de los aislados y de la elaboración de la técnica.

El facultativo responsable deberá emitir un informe donde se expresen los resultados de forma clara y comprensible y deberá validar éstos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Dado el fundamento de esta técnica no se precisa la restricción de los productos obtenidos tras PCR. El resultado de la amplificación por PCR será una serie de fragmentos de ADN de tamaño variable, consecuencia de la amplificación parcial de las secuencias espaciadoras entre las secuencias REP.

**Control de calidad.** En cada procesamiento del grupo de cepas a estudiar se incluirá una cepa control con patrón de REP-PCR conocido. Además en la electroforesis se incluirá un carril con marcadores de peso molecular que facilitarán el cálculo del tamaño de los diferentes fragmentos.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Esta técnica de tipificación es solo aplicable a bacilos Gram negativos, dada la naturaleza de la secuencia REP.

Para la tipificación por PCR de otros microorganismos, es preciso buscar otras secuencias repetitivas a lo largo del ADN genómico

Mediante esta técnica resulta difícil comparar patrones de cepas obtenidos en laboratorios distintos, a menos que se fijen con cuidado las condiciones y se compartan cepas control, para establecer la reproducibilidad de la técnica.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Vila J, Ruiz J, Navia M, Becerril B, Garcia I, Perea S, Lopez-Hernandez I, Alamo I, Ballester F, Planes AM, Martinez-Beltran J, de Anta TJ. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol* 1999; 37:758-761.
- Gallardo F, Ruiz J, Marco F, Towner KJ, Vila J. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *J Med Microbiol* 1999; 48:367-374.
- Horcajada JP, Vila J, Moreno-Martinez A, Ruiz J, Martinez JA, Sanchez M, Soriano E, Mensa J. Molecular epidemiology and evolution of resistance to quinolones in *Escherichia coli* after prolonged administration of ciprofloxacin in patients with prostatitis. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 55-59.
- Navia M, Ruiz J, Ribera A, Jimenez de Anta MT, Vila J. Analysis of the mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 743-748.

Servicio de Microbiología	<b>Análisis del ADN mediante amplificación con pcr: Tipificación molecular utilizando técnicas de amplificación de ADN relacionado con secuencias rep (<i>repetitive extragenic palindrom</i>)</b>	Fecha: PNT-MMT-04	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 5 de 5

## ANEXO 1. Composición de las soluciones tampón utilizadas en este procedimiento

### A) Composición de las soluciones para la extracción del ADN genómico

#### Solución stock Tris-HCl 1 M pH= 8,0

12,114 g Tris  
80 ml de agua Mili-Q  
Ajustar a pH= 8,0 con NaOH  
Ajustar hasta 100 ml con agua Mili-Q  
Autoclavar

#### Solución stock EDTA 0,5M pH= 8,0

18,612 g EDTA  
80 ml de agua Mili-Q  
Ajustar a pH= 8,0 con NaOH  
Ajustar hasta 100 ml con agua Mili-Q  
Autoclavar

#### Tris 50 mM + sacarosa 25% (Preparación de 20 ml)

1 ml de Tris-HCl 1M pH= 8,0  
5 g de sacarosa  
19 ml de agua Mili-Q estéril

#### TE (Preparación de 1 L)

10 ml Tris 1M pH= 7,5  
2 ml EDTA 0,5M pH= 8  
988 ml agua bidestilada  
Autoclavar

#### Solución I. (1 ml)

1 ml de solución de Tris-sacarosa 25% pH= 8,0  
2 µl EDTA 0,5 M pH= 8,0  
10 mg lisozima

#### Solución II. (1 ml)

50 µl Tris-HCl 1M pH= 8,0  
2 µl EDTA 0,5M pH= 8,0  
100 µl SDS 10%  
798 µl agua milliQ estéril  
50 µl proteinasa K (20 mg/ml)

### B) Composición de las soluciones necesarias para la electroforesis

**Tampón TAE (50X):** 242 g. de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA (0,5M, pH= 8) añadir agua Mili-Q hasta 1 litro.

**Tampón de carga:** la misión del mismo es la facilitar la carga de la muestra en los pocillos, aumentando su densidad. Asimismo, sirve como indicador de la posición del frente de la electroforesis. Se pueden utilizar diversas fórmulas, como por ejemplo: 0,25% de azul de bromofenol en 40% w/v de sacarosa disuelta en agua (volumen final 100 ml).

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-MMT-05**  
**ANÁLISIS DEL ADN POR SECUENCIACIÓN:**  
**MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) EN *Neisseria meningitidis***

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N°.** .....**ASIGNADA A**.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.



Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Análisis del ADN por secuenciación: Multilocus sequence typing (MLST) en <i>Neisseria meningitidis</i></b>	Fecha: PNT-MMT-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la metodología necesaria para el estudio epidemiológico de *Neisseria meningitidis* mediante *multilocus sequence typing* (MLST). El procedimiento que se describe aquí está adaptado para meningococo, para estudios de cualquier otro microorganismo se requeriría la adaptación de este procedimiento.

## 2. FUNDAMENTO

La técnica de MLST consiste en el análisis mediante secuenciación del ADN de fragmentos internos de un número determinado de genes codificantes de distintas enzimas metabólicas bacterianas (*housekeeping genes*). La comparación de estas secuencias entre distintos aislados permite establecer identidades o diferencias clonales de utilidad en el análisis epidemiológico bacteriano. El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidos a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables. Por lo tanto, MLST es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo.

Para cada especie bacteriana, es preciso establecer un grupo de genes metabólicos a estudiar. El esquema de MLST desarrollado para cepas de meningococo utiliza fragmentos internos de los siguientes genes: *abcZ* (transportador ABC), *adk* (adenilato kinasa), *aroE* (sikimato deshidrogenasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *pdhC* (piruvato deshidrogenasa), *pgm* (fosfoglucomutasa).

El procedimiento consta de las siguientes fases:

- i) Extracción ADN
- ii) Amplificación de los genes metabólicos
- iii) Reacción de secuenciación

En el caso de *N. meningitidis*, los iniciadores que se utilizan para la amplificación son diferentes a los que se utilizan en la secuenciación. En otros casos, como neumococo o estafilococos, los iniciadores son los mismos en ambos procesos.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manuales de funcionamiento correspondientes a los aparatos empleados en este procedimiento
- Bibliografía correspondiente de cada técnica
- Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología

## 4. MUESTRAS

- Cultivos bacterianos en cultivo puro, aislados en placas de agar sangre.

Esta técnica puede aplicarse en aislados individualmente ya que la pertenencia a complejos clonales se establece por comparación de los resultados obtenidos con los almacenados en base de datos mediante Internet.

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Placas de agar sangre
- Agua destilada estéril
- Dinucleótidos (dNTPs)
- *Taq* polimerasa (Viene con el tampón adecuado para su óptima actividad, comprobar que no contenga  $Cl_2Mg$  y que éste venga por separado. De lo contrario, debe ajustarse su concentración a lo especificado en el procedimiento)
- Iniciadores: Los iniciadores utilizados para amplificación o secuenciación en meningococo se recogen en la tabla 1.
- Agarosa
- Bromuro de etidio. Se utiliza a una concentración de 0,5 mg/L
- Marcador de peso molecular
- PEG 8000
- Cloruro de Sodio
- Etanol 70%
- Acetato amónico
- Reactivos de secuenciación, en este procedimiento se describe la secuenciación utilizando el sistema de "Bigdye terminator v3.1" de Applied Biosystem

## 6. APARATOS Y MATERIAL

### 6.1. APARATOS

- Termociclador (Existe un gran número de termocicladores de diversas casas comerciales. En principio cualquiera de ellos puede servir).
- Sistema de secuenciación, en este procedimiento se hace referencia al sistema de secuenciación utilizando el modelo ABI PRISM 3100
- Microcentrífuga para tubos eppendorf.
- Cubetas para electroforesis en gel de agarosa.
- Fuente de electroforesis.
- Elementos para la confección de geles de agarosa: molde, bandejas y peines.
- Transiluminador de luz ultravioleta y cámara fotográfica o analizador de imágenes.
- Termobloque.
- Baño de ebullición.

### 6.2. OTRO MATERIAL

- Asas bacteriológicas.
- Tubos eppendorf de 1, 5 ml.
- Tubos de PCR de 200  $\mu$ l.
- Pipetas de volumen variable y puntas estériles.

## 7. PROCESAMIENTO

### 7.1. EXTRACCIÓN DE ADN

- Rotular un tubo eppendorf con el número correspondiente al aislado que se este estudiando.
- Añadir en el tubo 500  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada.
- Añadir, aproximadamente, un asa azul del cultivo y homogeneizar mediante el vórtex.
- Introducir el eppendorf durante 10 minutos en baño de ebullición o termobloque a 100°C.
- Colocar el eppendorf a -20°C dos minutos.
- Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm.

Tabla 1. Iniciadores de amplificación o secuenciación para MLST en *Neisseria meningitidis*

	<b>Iniciador delantero o forward 5' 3'</b>	<b>Iniciador opuesto o reverse 5' 3'</b>
<b>• INICIADORES DE AMPLIFICACIÓN</b>		
<i>abcZ</i>	AATCGTTTATGTACCGCAGG	GTTGATTTCTGCCTGTTCCGG
<i>adk</i>	ATGGCAGTTTGTGCAGTTGG	GATTTAAACAGCGATTGCC
<i>aroE</i>	ACGCATTTGCGCCGACATC	ATCAGGGCTTTTTTCAGTT
<i>fumC</i>	CACCGAACACGACACGATGG	ACGACCAGTTCGTCAAACCTC
<i>gdh</i>	ATCAATACCGATGTGGCGCGT	GGTTTTCATCTGCGTATAGAG
<i>pdhC</i>	GGTTTCCAACGTATCGGCGAC	ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
<i>pgm</i>	CTTCAAAGCCTACGACATCCG	CGGATTGCTTTGATGACGGC
<b>• INICIADORES DE AMPLIFICACIÓN</b>		
<i>abcZ</i>	AATCGTTTATGTACCGCAGG	GAGAACGAGCCGGGATAGGA
<i>adk</i>	AGGCTGGCACGCCCTTGG	CAATACTTCGGCTTTCACGG
<i>aroE</i>	GCGGTCAA(C/T)ACGCTGATT	ATGATGTTGCCGTACACATA
<i>fumC</i>	TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG	TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC
<i>gdh</i>	CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC	GCGCACGGATTCATATGG
<i>pdhC</i>	TCTACTACATCACCTGATG	ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
<i>Pgm</i>	CGGCGATGCCGACCGCTTGG	GGTGATGATTTCCGTTGCGCC

- Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf convenientemente rotulado.
- Preparar las cubetas del espectrofotómetro con 1 ml de agua destilada y añadir 10µl del sobrenadante obtenido en el punto anterior.
- Medir en la cubeta la absorbancia a 260 nm y determinar la concentración aplicando la fórmula  $A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución (1:100)}$ .

## 7.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES METABÓLICOS

### **Condiciones de amplificación de los fragmentos seleccionados**

- Considerando que cada reacción de amplificación de cada uno de los genes se llevará a cabo en 100 µl se utilizarán las siguientes cantidades de reactivos y soluciones tampón:

H<sub>2</sub>O            46,5 µl  
Tampón 10X    10,0 µl

Iniciador 1\*    10,0 µl (de una solución 10 µM)  
Iniciador 2\*    10,0 µl  
Cl<sub>2</sub>Mg            6,0 µl (de una solución 25mM)  
dNTPs            16,0 µl (cada dNTP se maneja a una dilución de trabajo que consiste en 125 µl de una solución 10mM más 500 µl de H<sub>2</sub>O)

Taq polimerasa    0,5 µl (2,5U de enzima)

**TOTAL            99,0 µl**

(Los iniciadores 1 y 2 dependen de cada uno de los genes a amplificar y su secuencia viene especificada en el punto 5 "Medios, reactivos y productos" de este procedimiento)

- Multiplicar las cantidades señaladas por el número de reacciones de PCR que se vayan a realizar más

una, para que los volúmenes no queden excesivamente ajustados (mezcla matriz)

- Dispensar 99 µl de la mezcla matriz en tubos de 200 µl de tapa plana de PCR. No hay que olvidar contabilizar un control negativo en el que no se añadirá ADN, que será sustituido por la misma cantidad de agua destilada.

ADN molde            1,0 µl (aproximadamente 50ng/µl) en cada tubo

- Los tubos se colocan en el termociclador, aplicándose las siguientes condiciones de amplificación:

Incubación inicial de 94°C durante 2 minutos  
29 ciclos de:    94°C,    1 minutos para desnaturalización  
                          55-60°C, 1 minuto para alineamiento de los iniciadores (\*)  
                          72°C, 2 minutos para elongación

Incubación final de 72°C durante 2 minutos  
Refrigerar a 4°C sin límite de tiempo para mantener las muestras refrigeradas hasta que se recojan  
(\* Las temperaturas de alineamiento, deben optimizarse en cada laboratorio y para cada juego de iniciadores)

- Tras la amplificación se comprobará si ésta ha tenido éxito realizando una electroforesis en gel de agarosa de 5 µl de cada muestra.

### **Purificación de los productos amplificados**

- El ADN se purifica utilizando el sistema QIAquick (Qiagen)

## 7.3. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES METABÓLICOS

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Análisis del ADN por secuenciación: Multilocus sequence typing (MLST) en <i>Neisseria meningitidis</i></b>	Fecha: PNT-MMT-05	
		Edición Nº 01	Página 4 de 5

La secuenciación puede realizarse en tubos de PCR o alternativamente en placas de microtitulación.

Los iniciadores utilizados para secuenciación en meningococo, están descritos en el punto 5 "Medios, reactivos y productos" de este procedimiento.

De cada uno de los genes que nos proponemos secuenciar derivarán dos reacciones de secuenciación, que prepararemos en dos tubos de PCR distintos. Cada tubo contendrá uno de los iniciadores y el ADN obtenido en el proceso de amplificación del gen en cuestión. De este modo se secuenciarán, por separado –una en cada tubo- las dos hebras de ADN obtenidas en el proceso de amplificación del gen.

#### **Condiciones de secuenciación en tubos de PCR**

- Los iniciadores se utilizan a una dilución final 0.5 mM, por lo tanto se hará una dilución 1:15 con agua destilada a partir de la solución de almacenamiento que está en una concentración 10mM (ver condiciones de PCR). En cada reacción de secuencia se utilizarán 2 µl en cada tubo de PCR.
- Se añadirán a continuación 2 µl de la mezcla *BigDye Ready Reaction Termination Mix* (PE ABI) en cada tubo.
- Finalmente, 1 µl por tubo de cada producto de PCR que se quiera secuenciar, mezclando bien los tres componentes ya mencionados. Esta cantidad supone ¼ del volumen final recomendado en el manual de secuencia del reactivo comercial (*ABI BigDye sequencing manual*).
- A continuación se someten las muestras al siguiente programa en el termociclador:

24 ciclos de: 96°C, 10 segundos  
50°C, 5 segundos  
60°C, 4 minutos

Refrigerar a 4°C sin límite de tiempo para mantener las muestras refrigeradas hasta que se recojan

- Una vez finalizada la reacción de secuencia se lleva el volumen hasta los 20 µl recomendados, con la adición de 15 µl de agua destilada.
- Se procede entonces a añadir 2 µl de una solución 3M de NaOAc pH= 4,6 y 50 µl de etanol en un tubo eppendorf de 1,5 ml, añadiendo entonces los 20 µl de cada reacción de secuencia. Tras mezclar suavemente se incuba 15 minutos a temperatura ambiente.
- Seguidamente, se centrifugan los tubos a máxima velocidad durante 15-30 minutos y se descarta el sobrenadante con ayuda de una pipeta.
- Se lava el sedimento con 500 µl de etanol repitiéndose la centrifugación durante 10 minutos. Eliminar de nuevo el sobrenadante, recogiendo todo el etanol que sea posible.
- Secar el sedimento en un desecador al vacío y almacenar a -20°C hasta que sea analizado en gel de secuencia. En el momento de cargar el gel, cada

sedimento se resuspende en 3-4 µl de tampón de lectura.

#### **Condiciones de secuenciación en placas de microtitulación**

- El primer paso consiste en marcar con rotulador de tinta indeleble la esquina superior izquierda de la placa, para poder identificar las muestras a lo largo del proceso. Individualmente, pueden elegirse métodos alternativos de marcaje.
- Los distintos volúmenes se dispensarán preferiblemente con pipeta multicanal.
- Los iniciadores se utilizan a una dilución final 0,5 mM, por lo tanto se hará una dilución 1:15 con agua destilada a partir de la solución de almacenamiento que está en una concentración 10 mM (ver condiciones de PCR), utilizando en cada reacción 2 µl en cada pocillo que vaya a ser utilizado en la placa.
- Se añadirán a continuación 2 µl por pocillo de la mezcla *BigDye Ready Reaction Termination Mix* (PE ABI).
- Finalmente, 1 µl por tubo de cada producto de PCR que se quiera secuenciar, mezclando bien los tres componentes ya mencionados. Esta cantidad supone ¼ del volumen final recomendado en el manual de secuencia del reactivo comercial (*ABI BigDye sequencing manual*).
- Se tapa entonces la placa microtiter con papel adhesivo y se introducen las muestras en el termociclador, donde serán sometidas a las siguientes condiciones:  
24 ciclos de: 96°C, 10 segundos  
50°C, 5 segundos  
60°C, 2 minutos  
Refrigerar a 4°C sin límite de tiempo para mantener las muestras refrigeradas hasta que se recojan
- Una vez finalizada la reacción de secuencia se lleva el volumen hasta los 20 µl recomendados, con la adición de 15 µl de agua destilada.
- A continuación, se mezclarán 7,0 ml de etanol con 280 µl de una solución 3M de NaOAc, pH= 4,6 en un recipiente apropiado, dispensándose entonces con la pipeta multicanal 52 µl de esta mezcla en cada pocillo. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- Centrifugar la placa a 4°C durante 60 minutos a 2750xg. Quitar la tapa de papel adhesivo y volcar la placa sobre papel de filtro o similar (un pañuelo de papel puede ser suficiente) para eliminar el sobrenadante de cada pocillo. Colocaremos entonces la placa invertida sobre un papel Watman 3MM centrifugándose así 1 minuto a 500xg, lo que eliminará los posibles restos de etanol.
- Con ayuda de la pipeta multicanal, se dispensarán 150 µl de etanol al 70% en cada pocillo, centrifugándose una vez más a 2750xg durante 10 minutos y repetir el proceso de eliminación de sobrenadante y residuos de etanol ya reseñado.

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Análisis del ADN por secuenciación: Multilocus sequence typing (MLST) en <i>Neisseria meningitidis</i></b>	Fecha: PNT-MMT-05	
		Edición Nº 01	Página 5 de 5

- Secar el sedimento de los distintos pocillos de la placa en un secador de vacío. Almacenar a -20°C hasta que sean analizados en gel de secuencia. En el momento de cargar el gel, cada sedimento se resuspende en 3-4 µl de tampón de lectura.

### 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La secuencia de cada uno de los *loci* se alinea con las secuencias que están localizadas en una base de datos centralizada. Si la secuencia coincide, el programa informático utilizado asigna uno de los alelos ya identificados; en caso contrario, se asigna un nuevo número a ese nuevo alelo. Para que la asignación de los alelos se realice de forma inequívoca, se secuencian ambas hebras de ADN, por lo que las variaciones en la secuencia de ADN son de esta forma “autenticadas”.

Una vez asignado un número a cada alelo, puede generarse un perfil alélico que será la expresión de la combinación de los 7 alelos ya asignados. Tras la definición de los perfiles alélicos, la comparación entre las cepas es sencilla, pudiéndose comprobar de un vistazo el grado de proximidad entre los aislados, simplemente comprobando el número de alelos compartidos entre perfiles diferentes.

La existencia de bases de datos para cada microorganismo en el que se ha desarrollado MLST, accesibles mediante página web (<http://mlst.net>) funciona como nexo común para todos los posibles participantes, pudiendo realizarse todo el proceso de consultas y análisis así como enviar las propias cepas para inclusión en las bases de datos, con conexión posible desde cualquier lugar del mundo. El sistema está diseñado de forma dinámica, para poder mandar los de nuevos aislados, solicitar la inclusión de nuevos alelos y/o perfiles, etc., todo ello gestionado por un administrador especialista en bioinformática, que supervisa los datos suministrados por el usuario. Así, si se envían datos de aislados que corresponden a perfiles ya descritos, sólo es preciso enviar un formato Excel con los datos correspondientes. Si se trata de un alelo nuevo, no incluido en la base de datos, entonces es preciso enviar el archivo en formato “Chromas” generado por el secuenciador automático, para poder proceder a su verificación.

El programa de gestión de la base de datos permite al usuario realizar consultas de alelos, de perfiles alélicos, de aislados específicos con objeto de conocer su relación con otros aislados incluidos en la base, etc. Adicionalmente, la página web ofrece enlaces con un buen número de programas que permiten el análisis de datos generados por MLST mediante la utilización de diversos algoritmos.

### 9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán responsables del procesamiento de los aislados y de la elaboración de la técnica.

El facultativo responsable deberá emitir un informe donde se expresen los resultados.

### 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Para la amplificación por PCR de los genes metabólicos de meningococo descritos, las temperaturas de alineamiento y concentraciones de Cl<sub>2</sub>Mg deben optimizarse en cada laboratorio y para cada juego de iniciadores. Aunque los iniciadores están diseñados para una temperatura óptima de hibridación entre 55 y 60°C, las condiciones que se exponen en este procedimiento son sólo indicativas.
- Tras la amplificación de los genes es preciso comprobar si la reacción de PCR ha generado el producto de PCR esperado: una sola banda del tamaño previsto. La pureza del amplificado se comprobará mediante una electroforesis en gel de agarosa (como se indica en el procedimiento técnico)

### 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento descrito aquí solo tiene utilidad para la tipificación epidemiológica de *N. meningitidis* por MLST. Para estudiar cualquier otro microorganismo se precisa el análisis de un grupo de genes distintos. Algunos microorganismos tienen elaborado el protocolo (disponible en <http://www.mlst.net>) y otros se encuentran aún en fase experimental.

### 12. BIBLIOGRAFIA

1. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol 1999; 7: 482-487.
2. Vázquez JA, Berrón S. Multilocus Sequence Typing: El marcador molecular de la era de Internet. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2004; 22: 113-120.