

TÉCNICAS MOLECULARES
DE DETECCIÓN DE
PATÓGENOS Y DE SUS
FACTORES DE VIRULENCIA

TÉCNICAS MOLECULARES: VENTAJAS

- 1- RAPIDEZ
- 2- SENSIBILIDAD
- 3- NO NECESITAN MICROORGANISMO VIABLE
- 4- DETECTAN MICROORGANISMOS INDETECTABLES
POR LAS TÉCNICAS CONVENCIONALES
- 5- RESULTADO NO ESTÁ SUJETO A LA EXPRESIÓN
FENOTÍPICA
- 6- ESPECIFICIDAD

TÉCNICAS MOLECULARES: INCONVENIENTES

- 1- LA PRESENCIA DE ACIDO NUCLEICO NO ES SINÓNIMO DE ENFERMEDAD INFECCIOSA
- 2- ALTA SENSIBILIDAD FAVORECE CONTAMINACIONES Y FALSOS POSITIVOS EN ALGUNAS TÉCNICAS (PCR)
- 3- NECESIDAD DE CONOCER BIEN EL GENOMA DEL MICROORGANISMO PARA CONSEGUIR UN RESULTADO VÁLIDO
- 4- REALIZADAS POR PERSONAL NO ESPECIALIZADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR PUEDEN DAR RESULTADOS NO FIABLES
- 5- INTERPRETACIÓN POR EL CLÍNICO Y VALORACIÓN DE SU SIGNIFICADO EN EL PACIENTE

TÉCNICAS MOLECULARES

- 1- **ANÁLISIS DE PLÁSMIDOS:** detección de plásmidos de virulencia y estudios epidemiológicos.
- 2- **HIBRIDACIÓN CON SONDAS:** detección de genes específicos con una alta sensibilidad.
- 3- **DNA ARRAYS:** hibridación simultánea con cientos de sondas en un microchip.
- 4- **PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS:** técnica estándar de tipado genético o *DNA-fingerprinting*.
- 5- **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA:** detección muy rápida y sensible de secuencias predeterminadas.
- 6- **SECUENCIACIÓN:** técnica de resultado definitivo.
- 7- **MULTILOCUS SEQUENCE TYPING:** detección de variaciones alélicas en genes específicos.

TECNICAS DE HIBRIDACIÓN CON SONDAS

PRINCIPIO BASICO DEL ENSAYO DE HIBRIDACION:

- 1- DESNATURALIZACIÓN DEL DNA DIANA Y FIJACIÓN A UN SOPORTE
- 2- MARCAJE DE UNA SONDA MONOCADENA
- 3- HIBRIDACIÓN: MEZCLA Y RENATURALIZACIÓN
- 4- DETECCIÓN DE LOS HÍBRIDOS

SOPORTES DE HIBRIDACION

1- FASE LIQUIDA: en tubo, placa de microtitulación

2- SOPORTE SOLIDO: filtro de nylon
DOT-BLOT y SLOT-BLOT
SOUTHERN BLOT
NORTHERN BLOT

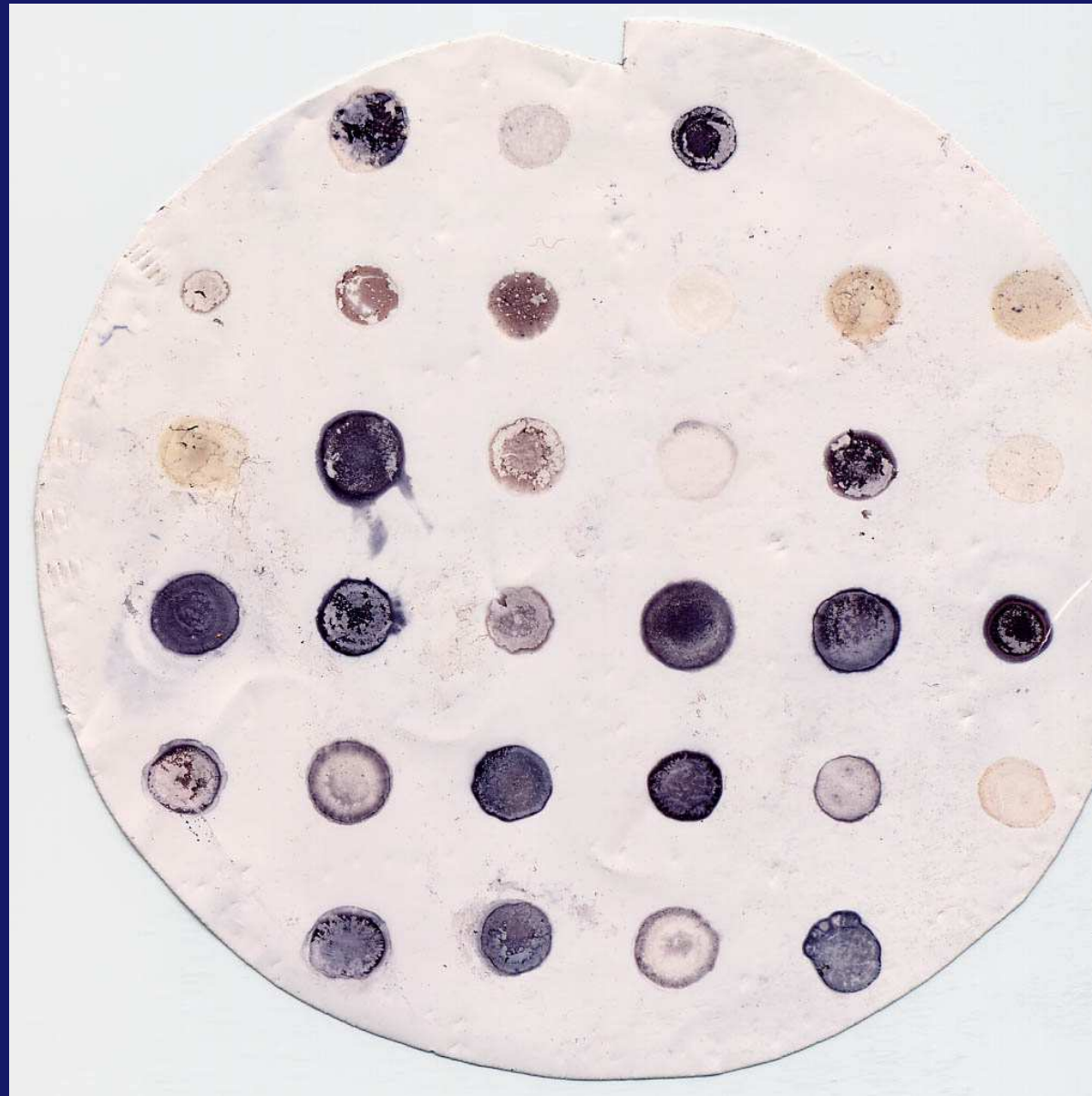
3- IN SITU: portaobjetos

CLASES DE SONDAS

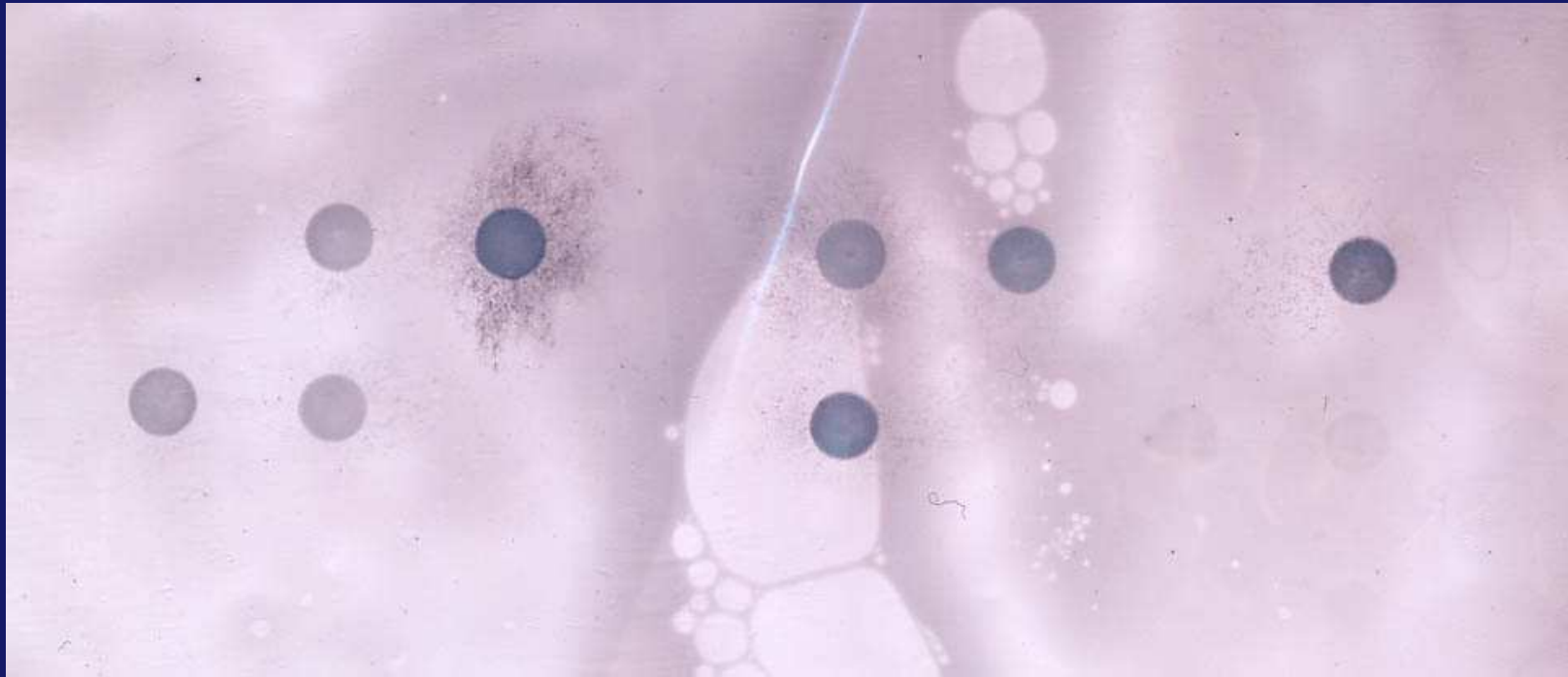
- TIPOS DE SONDAS: DNA, RNA, NUCLEÓTIDOS.
- MARCAJES: DIGOXIGENINA, BIOTINA, FLUOROCROMO, PEROXIDASA, FOSFATASA ALCALINA, ISÓTOPOS RADIOACTIVOS.
- MÉTODO DE OBTENCIÓN: DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS, CLONACIÓN, PCR, SÍNTESIS QUÍMICA

pBR322: SONDA DE LA BETALACTAMASA TIPO TEM

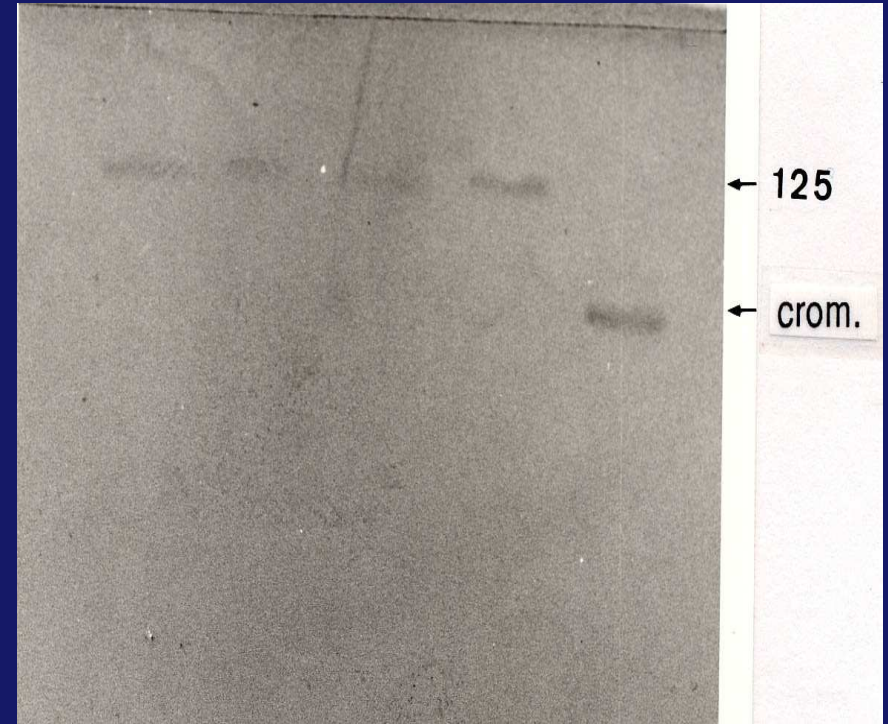
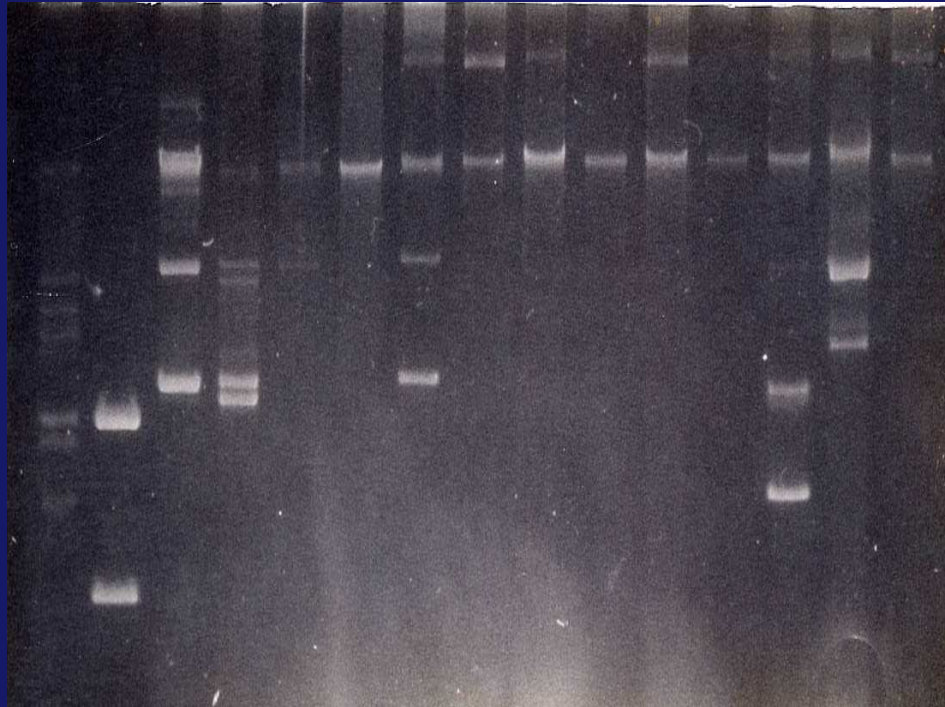
10 20 30
 MetSerIleGlnHisPheArgValAlaLeuIleProPhePheAlaAlaPheCysLeuProValPheAlaHisProGluThrLeuValLysValLysAsp
 AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCACCCAGAAACGCTGGTAAAGTAAAGAT
 220 240 260 280 300
 TCATACTCATAAGTTGTAAGGCACAGCGGGAATAAGGGAAAAACGCCGTAACGGAAGGACAAAAACGAGTGGGCTTTTGCACCCTTCATTTTCTA
 40 50 60
 AlaGluAspGlnLeuGlyAlaArgValGlyTyrIleGluLeuAspLeuAsnSerGlyLysIleLeuGluSerPheArgProGluGluArgPheProMetMet
 GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATG
 320 340 360 380 400
 CGACTTCTAGTCAACCCACGTGCTCACCCAATGTAGCTTGACCTAGAGTTGTCGCCATTCAGGAACCTCAAAGCGGGGCTCTTGCAAAAAGGTTACTAC
 70 80 90 100
 SerThrPheLysValLeuLeuCysGlyAlaValLeuSerArgValAspAlaGlyGlnGluGlnLeuGlyArgArgIleHisTyrSerGlnAsnAspLeuVal
 AGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCATACACTATTCAGAAAGACTTGGTT
 420 440 460 480 500
 TCGTGAAAATTTCAAGACGATACACCGGCCATAATAGGGCACAACGCGGCCCTCTCGTTGAGCCAGCGGCGTATGTGATAAGAGCTTACTGAACCAA
 520 540 560 580 600
 GluTyrSerProValThrGluLysHisLeuThrAspGlyMetThrValArgGluLeuCysSerAlaAlaIleThrMetSerAspAsnThrAlaAlaAsnLeu
 GAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGAACACTGCGGCCAATCTA
 620 640 660 680 700
 CTCATGAGTGGTCAAGTCTTTTCTGAGAAATGCCACCTGCTGCTTCTTAATACGTCACGACGGTATTGGTACTCACTATTGTGACCGCGGTTGAAT
 720 740 760 780 800
 LeuLeuThrThrIleGlyGlyProLysGluLeuThrAlaPheLeuHisAsnMetLysAspHisValThrArgLeuAspArgTrpGluProGluLeuAsnGlu
 CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCGCTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
 820 840 860 880 900
 GAAGACTGTTGCTAGCCTCCTGGCTTCTCGATTGGCGAAAAACGTTGTACCCCTAGTACATTGAGCGGAACAGCAACCTTGGCTCGACTTACTT
 920 940 960 980 1000 1020
 AlaIleProAsnAspGluArgAspThrThrMetProAlaAlaMetAlaThrIhrLeuArgLysLeuLeuThrGlyGluLeuLeuThrLeuAlaSerArgGln
 GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTCAGCAATGGCAACACGTTGGCAAACATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAA
 CGGTATGGTTTGTGCTCGCACTGTGGTGTACGGACGCTGTTACCGTTGTGCAACGCGTTTGATAATTGACCGCTGATGATGAGATCGAAGGGCGGCT
 1040 1060 1080 1100
 GlnLeuIleAspTrpMetGluAlaAspLysValAlaGlyProLeuLeuArgSerAlaLeuProAlaGlyTrpPheIleAlaAspLysSerGlyAlaGlyGlu
 CAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTCCGCGCTGGCTGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAG
 1120 1140 1160 1180
 GTTAATTATCTGACCTACCTCCGCTATTTCAACGCTCTGGTGAAGACGCGAGCCGGGAAGGCGGACCGACCAATAACGACTATTTAGACCTCGGCCACTC
 1200 1220 1240 1260 1280
 ArgGlySerArgGlyIleIleAlaAlaLeuGlyProAspGlyLysProSerArgIleValValIleTyrThrThrGlySerGlnAlaThrMetAspGluArg
 CGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCBTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
 1300 1320 1340 1360 1380 1400
 GCACCCAGAGCGCCATAGTAACGTCGTGACCCCGGTACCATTCGGGAGGCATAGCATCAATAGATGTGCTGCCCTCAGTCCGTTGATACCTACTTGCT
 1420 1440 1460 1480 1500
 AsnArgGlnIleAlaGluIleGlyAlaSerLeuIleLysHisTrp
 AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAGTATTAGCAATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGA
 1520 1540 1560 1580 1600 1620
 TTATCTGCTAGCGACTCTATCCACGGAGTGACTAATTCGTAACCATTGACAAGTCTGTTCAAATGAGTATATATGAAATCT



HIBRIDACIÓN EN COLONIAS CON UNA SONDA TEM MARCADA CON DIGOXIGENINA



HIBRIDACIÓN EN DOT-BLOT CON UNA SONDA TEM MARCADA CON DIGOXIGENINA



HIBRIDACIÓN SOUTHERN-BLOT CON UNA SONDA TEM MARCADA CON DIGOXIGENINA

SONDA TEM1 (Gln 37)

5'-ACCCA**ACTG**ATCTTCAG-3'

SONDA TEM2 (Lys 37)

5'-ACCCA**ACTT**ATCTTCAG-3'

SONDAS TEM DE OLIGONUCLEÓTIDOS
PARA IDENTIFICAR MUTACIONES

```

SerIleGlnHisPheArgV.   AlaGluAspGlnLeuGlyA
AGTATTCAACATTTCCGTG   GCTGAAGATCAGTTGGGGT
                220                320
TCATAAGTTGTAAGGCAC   CGACTTCTAGTCAACCCAC

MetSerIleGlnHisPheArgValAlaLeuIleProPhePheAlaAlaPheCysLeuProValPheAlaHisProGluThrLeuValLysValLysAsp
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTCGCCATTTTGCCTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGAT
                220                240                260                280                300
TCATACTCATAAGTTGTAAGGCACAGCGGGAATAAGGGAAAAAACGCCGTAACCGGAAGGACAAAAACGAGTGGGCTTTTGGCACCCTTTCATTTTCTCA

AlaGluAspGlnLeuGlyAlaArgValGlyTyrIleGluLeuAspLeuAsnSerGlyLysIleLeuGluSerPheArgProGluGluArgPheProMetMet
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCGGAAGACGTTTTCCAAATGATG
                320                340                360                380                400
CGACTTCTAGTCAACCCACGTCGTCACCAATGTAGCTTAGACCTAGAGTTGTGCCATTCTAGGAACTCTCAAAAAGCGGGGCTTTTGCAAAAGGTTACTAC

SerThrPheLysValLeuLeuCysGlyAlaValLeuSerArgValAspAlaGlyGlnGluGlnLeuGlyArgArgIleHisTyrSerGlnAsnAspLeuVal
AGCAGCTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCATACACTATCTCAGAATGACTTGGTT
                420                440                460                480                500
TCGTGAAAATTTCAAGACGATACACCGCGCCATAATAGGGCAACTGCGGCCGTTCTCGTTGAGCCAGCGGGGTATGTGATAAGAGTCTTACTGAACCAA

GluTyrSerProValThrGluLysHisLeuThrAspGlyMetThrValArgGluLeuCysSerAlaAlaIleThrMetSerAspAsnThrAlaAlaAsnLeu
GAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGA(AACACTGCGGCCAACTTA
                520                540                560                580                600
CTCATGAGTGGTCAGTGTCTTTTCGTAGAATGCCTACCGTACTGTCTTCTTAATACGTCACGACGGTATTGGTACTCACTATTGTGACCGCGGTTGAAT

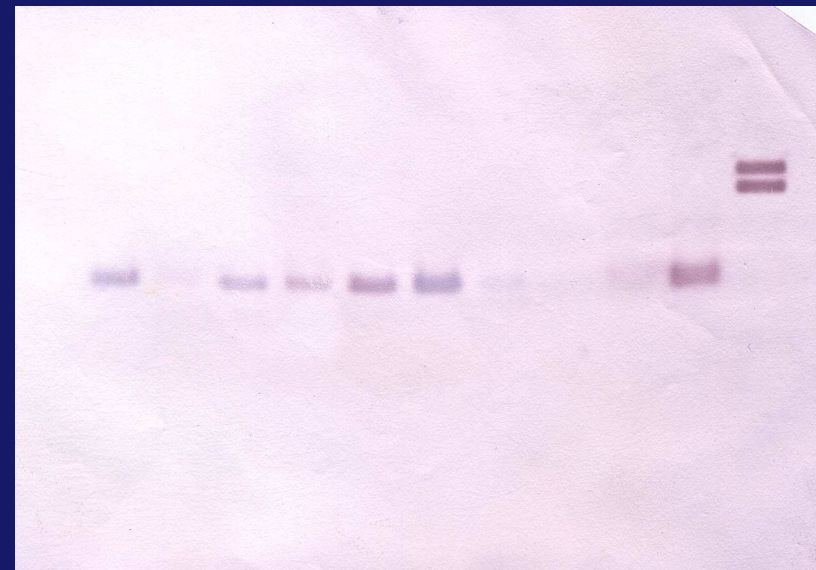
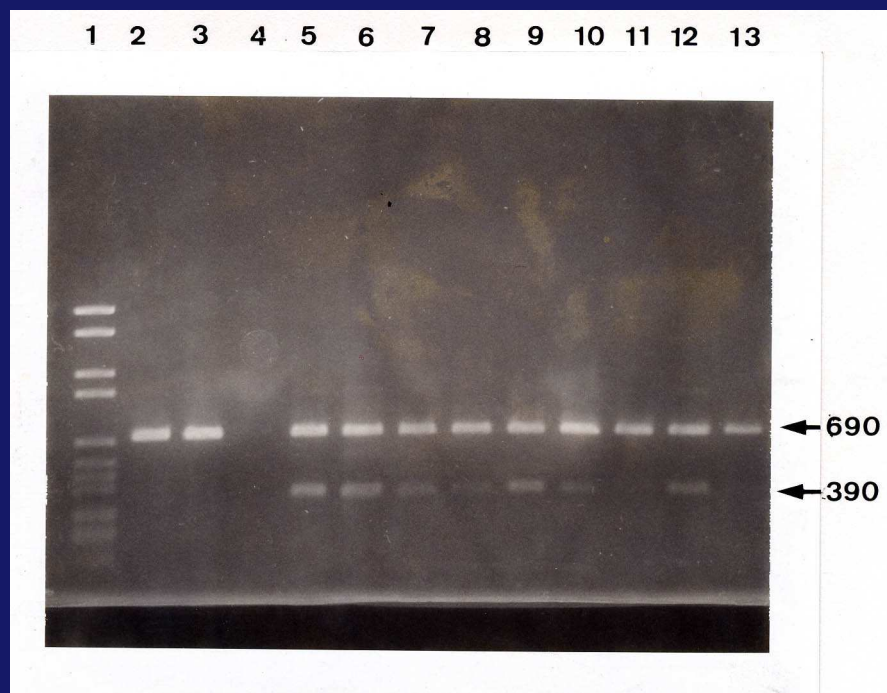
LeuLeuThrThrIleGlyGlyProLysGluLeuThrAlaPheLeuHisAsnMetGlyAspHisValThrArgLeuAspArgTrpGluProGluLeuAsnGlu
CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
                620                640                660                680                700
GAAGACTGTTGCTAGCCTCCTGGCTTCTCGATTGGCGAAAAAACGTTGTACCCCTAGTACATTGAGCGGAACTAGCAACCCCTGGCCCTCAGCTTACTT

AlaIleProAsnAspGluArgAspThrThrMetProAlaAlaMetAlaThrIleLeuArgLysLeuLeuThrGlyGluLeuLeuThrLeuAlaSerArgGln
GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGGCAAACCTAATACTGGCGAACCTACTTACTAGCTCCCGGCAA
                720                740                760                780                800
CGGTATGGTTTGTGCTGCTGCACTGTGGTGTACGGACGTCGTTACCGTTGTTGCAACCGGTTTGATAATTGACCGCITGATGAATGAGATCGAAGGGCCGTT

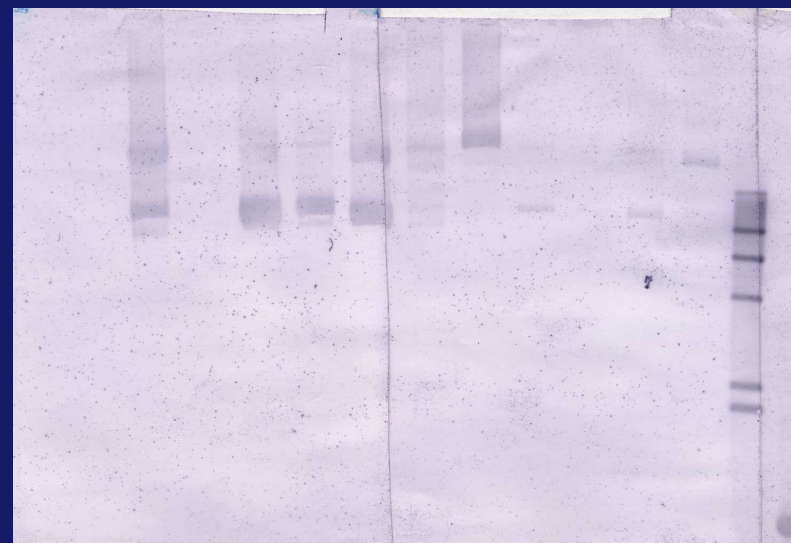
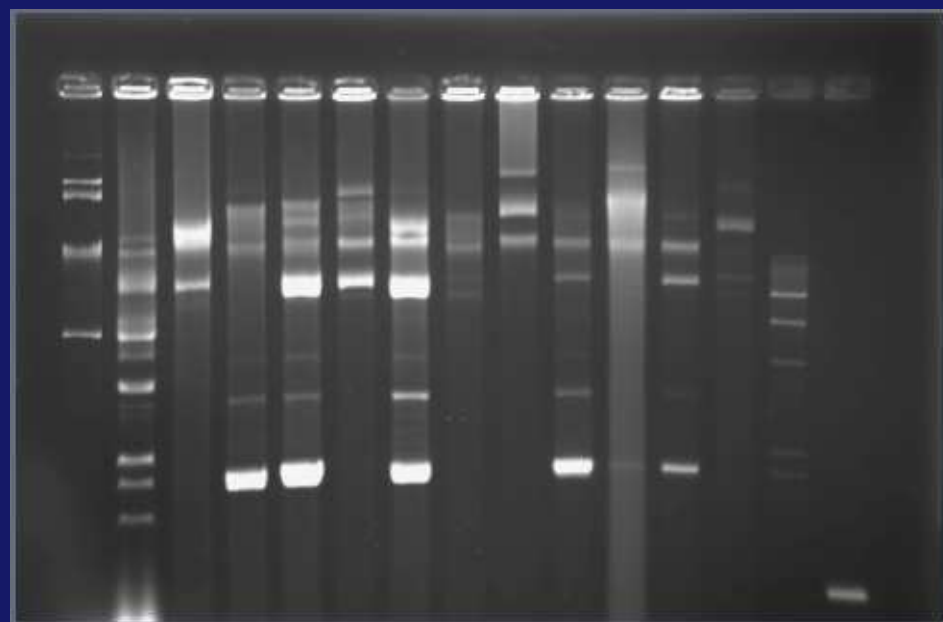
GlnLeuIleAspTrpMetGluAlaAspLysValAlaGlyProLeuLeuArgSerAlaLeuProAlaGlyTrpPheIleAlaAspLysSerGlyAlaGlyGlu
CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCCCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGA
                820                840                860                880                900
GTTAATATCTGACCTACCTCCGCCTATTTCAACCTCCTGGTGAAGACGCGAGCCGGGAAGGCCGACCGACCAAAATAACGACTATTAGACCTCGGCCACT

GlyTrpPheIleAlaAspL
GGCTGGTTTATTGCTGATA
                900
.CCGACCAAAATAACGACTAT

```

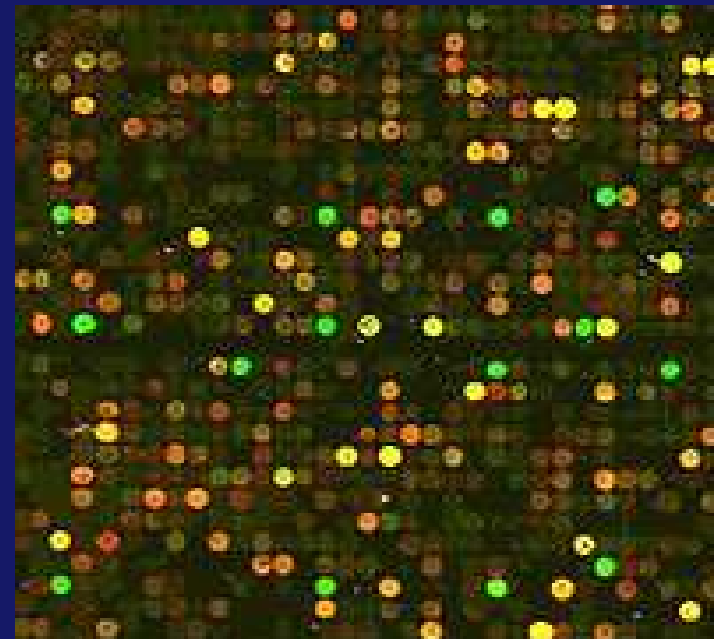


HIBRIDACIÓN SOUTHERN-BLOT CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS TEM-1 Y TEM-2 PARA IDENTIFICAR MUTACIONES



HIBRIDACIÓN SOUTHERN-BLOT CON UNA SONDA DE LA CARBAPENEMASA OXA-40 EN EXTRACCIONES DE PLÁSMIDOS DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *A. baumannii*

DNA MICROARRAYS



DNA MICROARRAYS/BIOCHIP/DNA CHIP/GENE ARRAY

-UTILIDAD: ANALIZAN EL GENOMA COMPLETO DE UN MICROORGANISMO

-FUNDAMENTO: HIBRIDACIÓN CON SONDAS

-SOPORTE: PLACAS MICROTITULACIÓN O MEMBRANAS DE BLOTTING

-FABRICACIÓN: PUEDEN SER CREADOS EN EL LABORATORIO O USANDO ROBÓTICA

MACROARRAY: SEÑALES > 300 MICRAS

MICROARRAY: POCILLOS < 200 MICRAS

APLICACIONES

1. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS (GENES, MUTACIONES..)

2. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA

1. DESCUBRIMIENTO DE GENES

2. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES

3. FARMACOGENÓMICA: DESARROLLO DE FÁRMACOS

4. TOXICOGENÓMICA: INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA

DISEÑO

1. **SONDA:** cDNA (500-500 pb), oligonucleótido (20-80 mer)
2. **FABRICACIÓN DEL CHIP**
3. **MUESTRA MARCADA (RNA, DNA)**
4. **EXPERIMENTO:** Hibridación, Fluorimetría, Real-Time PCR....)
5. **LECTURA DEL RESULTADO**
6. **ANÁLISIS INFORMÁTICO**

TÉCNICAS DE TIPADO GENÉTICO O DNA- *fingerprinting*

- 1.- ANÁLISIS DE PLÁSMIDOS (ver temas 2 del Nivel básico y 8 del Nivel específico .
- 2.- RIBOTIPADO: hibridación con sondas de rDNA. Técnica clásica de escasa utilización actual.
- 3.- PCR-*FINGERPRINTING*: técnica de screening rápido pero que no permite comparaciones interlaboratorios.
- 4.- PFGE (*PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS*): técnica considerada el estándar internacional.
- 5.- *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING*: muy útil para identificar variaciones alélicas

DNA-fingerprinting: utilidades

1. DELIMITAR EL ORIGEN Y EXTENSION DE UN BROTE INFECCIOSO (CONOCER SI UN GRUPO DE AISLAMIENTOS TIENE UN ORIGEN COMUN O SI REPRESENTAN CASOS ESPORADICOS NO RELACIONADOS ENTRE SI)
2. ESTABLECER SI EXISTE INFECCION CRUZADA ENTRE PACIENTES
3. MOSTRAR LA EVOLUCION DE LA INFECCION A LO LARGO DEL TIEMPO (PERSISTENCIA DE LA MISMA BACTERIA, EMERGENCIA DE NUEVAS MAS VIRULENTAS)
4. EVALUAR LA EFICACIA DE UN TRATAMIENTO ANTIBIOTICO, LA APARICION DE RESISTENCIAS EN EL ORGANISMO Y LA RESPUESTA INMUNE DEL PACIENTE

ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

- **OBJETIVO DE LA TÉCNICA:** SEPARAR Y CALCULAR EL TAMAÑO DE MOLÉCULAS GRANDES DE DNA

-**RANGO DE SEPARACIÓN:** 50-12.000 Kb.

-**DESCRITO POR:** SCHWARTZ Y CANTOR (1984)

-**RELEVANTE PARA:**

-ANÁLISIS COMPARATIVOS DE PATRONES DE RESTRICCIÓN CROMOSÓMICOS

-CONSTRUCCIÓN DE MAPAS CROMOSÓMICOS

-TOPOLOGÍA Y TAMAÑO DE CROMOSOMAS

- ANÁLISIS DE ELEMENTOS EXTRACROMOSÓMICOS DE PESO MOLECULAR ALTO

FUNDAMENTO TEÓRICO

-HASTA 30-50 Kb EL DNA MIGRA CON LA MISMA MOVILIDAD SIN DEPENDER DEL TAMAÑO (BANDA DIFUSA EN EL GEL)

-SI EL DNA SE FUERZA PARA QUE CAMBIE DE DIRECCIÓN LOS FRAGMENTOS DE LA BANDA DIFUSA SE SEPARAN

- CON CADA REORIENTACIÓN DEL CAMPO ELÉCTRICO EL DNA MÁS PEQUEÑO SE MUEVE EN LA NUEVA DIRECCIÓN MÁS RÁPIDAMENTE QUE EL DE GRAN TAMAÑO

INSTRUMENTACIÓN



PARAMETROS DE SEPARACIÓN

1.- PREPARACION DE LA MUESTRA

2.- PARAMETROS DE SEPARACIÓN:

- VOLTAGE
- PULSOS
- ANGULO DE REORIENTACION
- BUFFER
- TIPO DE AGAROSA Y CONCENTRACIÓN
- TEMPERATURA DE LA CAMARA
- TIPO DE ESTANDARES
- CANTIDAD DE DNA INCLUIDO EN LAS MUESTRAS

APLICACIONES (I)

1.- PATRONES DE RESTRICCIÓN CROMOSÓMICOS: ANÁLISIS COMPARATIVO

- DNA FINGERPRINTING MEDIANTE ESTUDIO DE PERFILES DE DIGESTIÓN USANDO ENZIMAS DE SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO LARGAS (INFRECIENTES A LO LARGO DEL GENOMA)
- TÉCNICA DE REFERENCIA

2.- ANÁLISIS FILOGENÉTICO

- ANÁLISIS DEL DNA MITOCONDRIAL
- COMPARACIÓN DE rRNA 16S

3.- MAPAS GENÉTICOS Y FÍSICOS Y TOPOLOGÍA CROMOSÓMICA

- COMBINAN PATRONES DE RESTRICCIÓN Y TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN
- ELABORACIÓN DE BASES DE DATOS DE MAPAS CROMOSÓMICOS

APLICACIONES (II)

4.- DETERMINAR TAMAÑO EXACTO DE CROMOSOMAS

- TÉCNICAS CLÁSICAS (COLORIMETRÍA, CINÉTICAS DE RENATURALIZACIÓN, ELECTROFORESIS BI-DIMENSIONAL, SUMA DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN): NO APORTAN DATOS EXACTOS Y VARÍAN SEGÚN LA TÉCNICA UTILIZADA

5.- ELEMENTOS EXTRACROMOSÓMICOS DE ALTO PESO MOLECULAR

- MEGAPLÁSMIDOS: PFGE HA PUESTO EN EVIDENCIA QUE NO SON TAN RAROS COMO SE CREÍA

CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN

PATRONES DE RESTRICCIÓN:

AISLAMIENTOS RELACIONADOS: PATRONES IGUALES

AISLAMIENTOS NO RELACIONADOS: PATRONES DISTINTOS

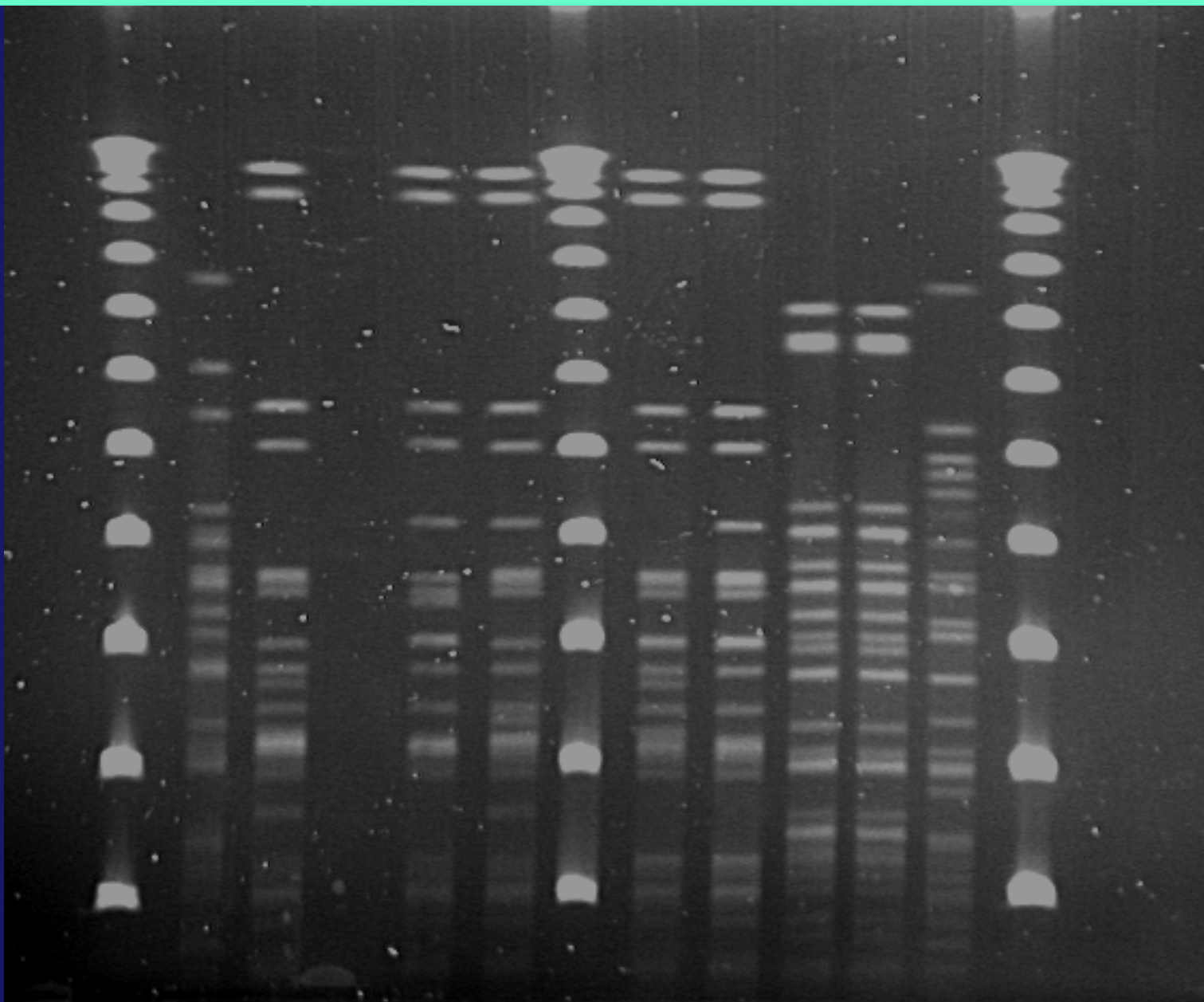
ALTERACIONES DEL PATRON DURANTE EL BROTE:

- * MUTACIONES PUNTUALES
- * INSERCIONES
- * DELECCIONES

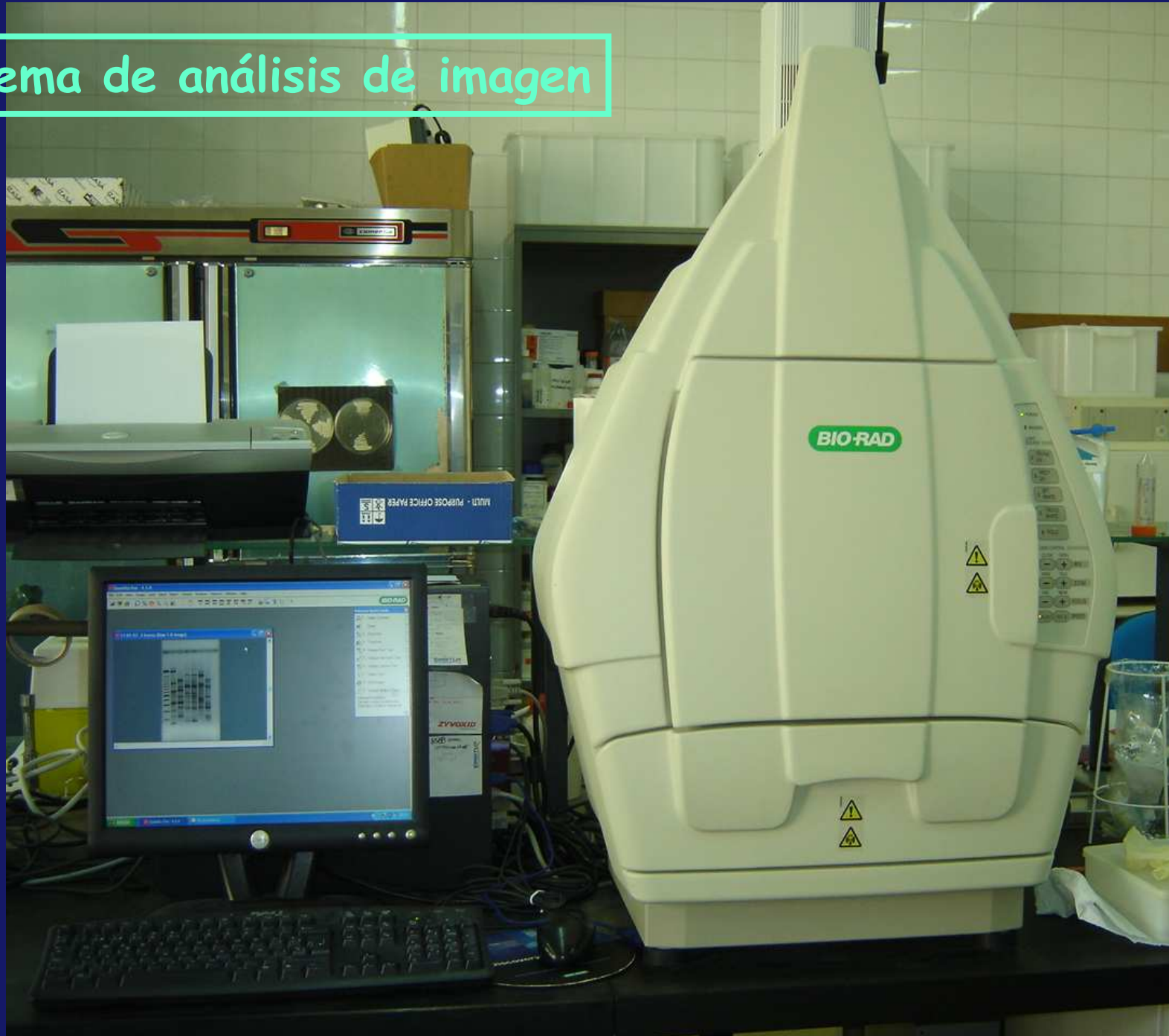
CATEGORÍAS DE RELACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

1. **INDISTINGUIBLE:** no hay diferencias genéticas ni fragmentos diferentes con lo que el aislamiento forma parte del brote.
2. **MUY RELACIONADO:** 1 diferencia genética y 2-3 fragmentos diferentes
3. **POSIBLEMENTE RELACIONADO:** 2 diferencias genéticas y 4-6 fragmentos diferentes
4. **NO RELACIONADO:** 3 o más diferencias genéticas y 7 o más fragmentos diferentes.

PFGE de aislamientos de *A. baumannii* digeridos con *Apa* I



Sistema de análisis de imagen



MULTILOCUS SEQUENCE TYPING

DEFINICIÓN: TÉCNICA DE TIPADO QUE ANALIZA LAS VARIACIONES DE LOS GENES "HOUSEKEEPING"

-BASE DE DATOS ACCESIBLE VIA INTERNET

-RECOMENDABLE VALIDAR LOS DATOS POR OTRAS TÉCNICAS (PFGE)

-**MLVA:** SECUENCIAS REPETITIVAS EN TANDEM (EL NÚMERO DE UNIDADES REPETITIVAS ES DISTINTO EN CADA AISLAMIENTO)

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA



REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

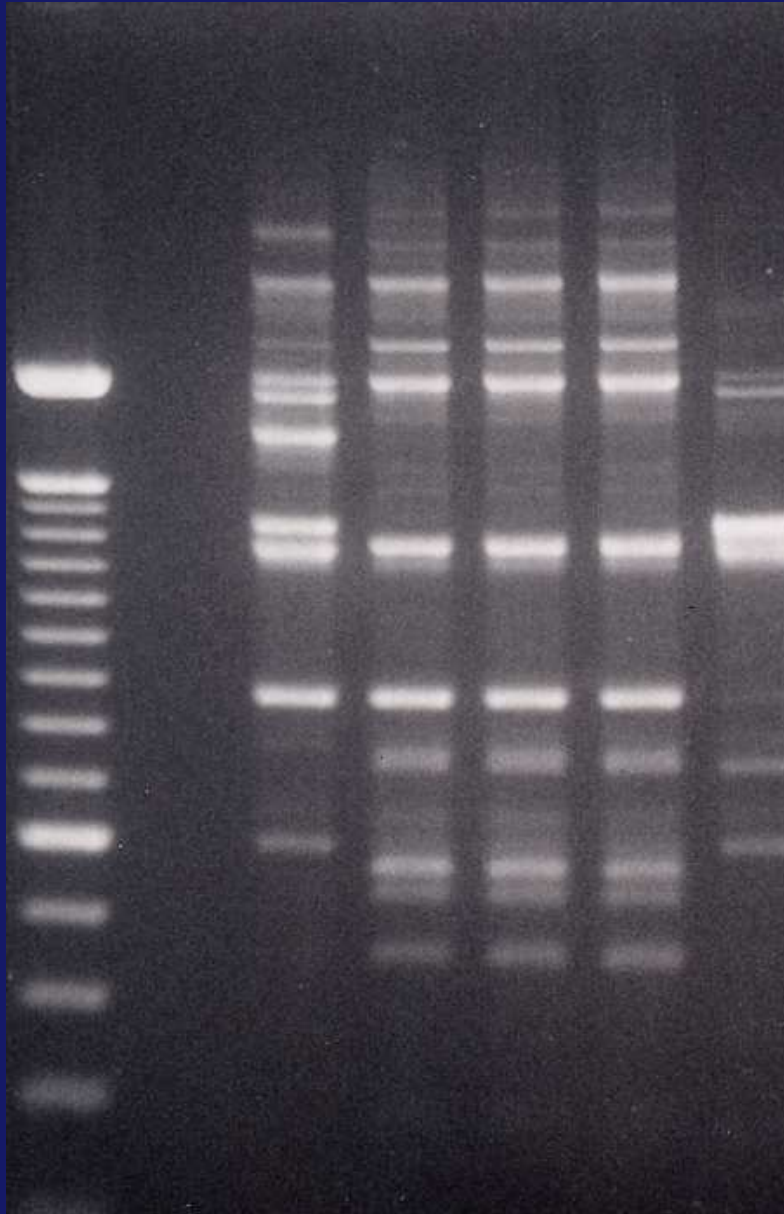
VENTAJAS

- SENSIBILIDAD
- RAPIDEZ
- DETECCION DE ORGANISMOS FASTIDIOSOS
- NO NECESITA CELULAS VIABLES
- DETECCION DE SECUENCIAS DESCONOCIDAS

INCONVENIENTES

- FALSOS POSITIVOS/NEGATIVOS
- REPRODUCIBILIDAD
- VALIDACION INTERLABORATORIOS
- INTERPRETACION CLINICA DEL RESULTADO

PCR-fingerprinting



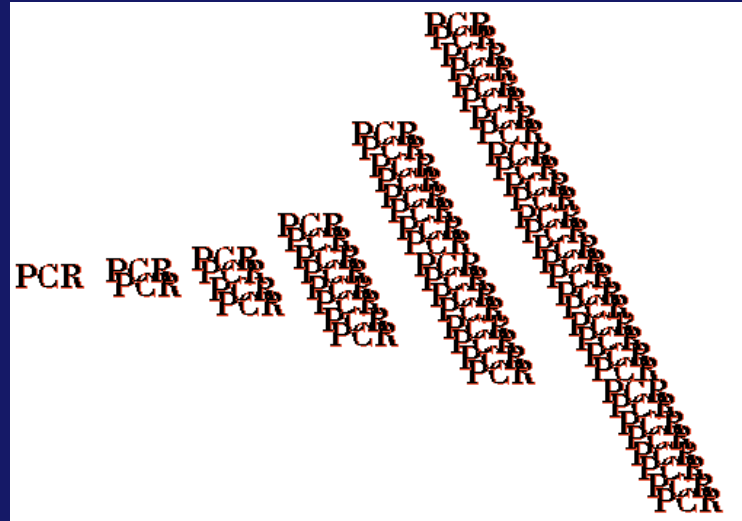
DEPENDIENDO DEL PRIMER:

-ERIC-PCR: secuencias repetidas
en enterobacterias

-AP-PCR

← Perfiles en *A. baumannii*
Mediante el primer M13

MULTIPLEX-



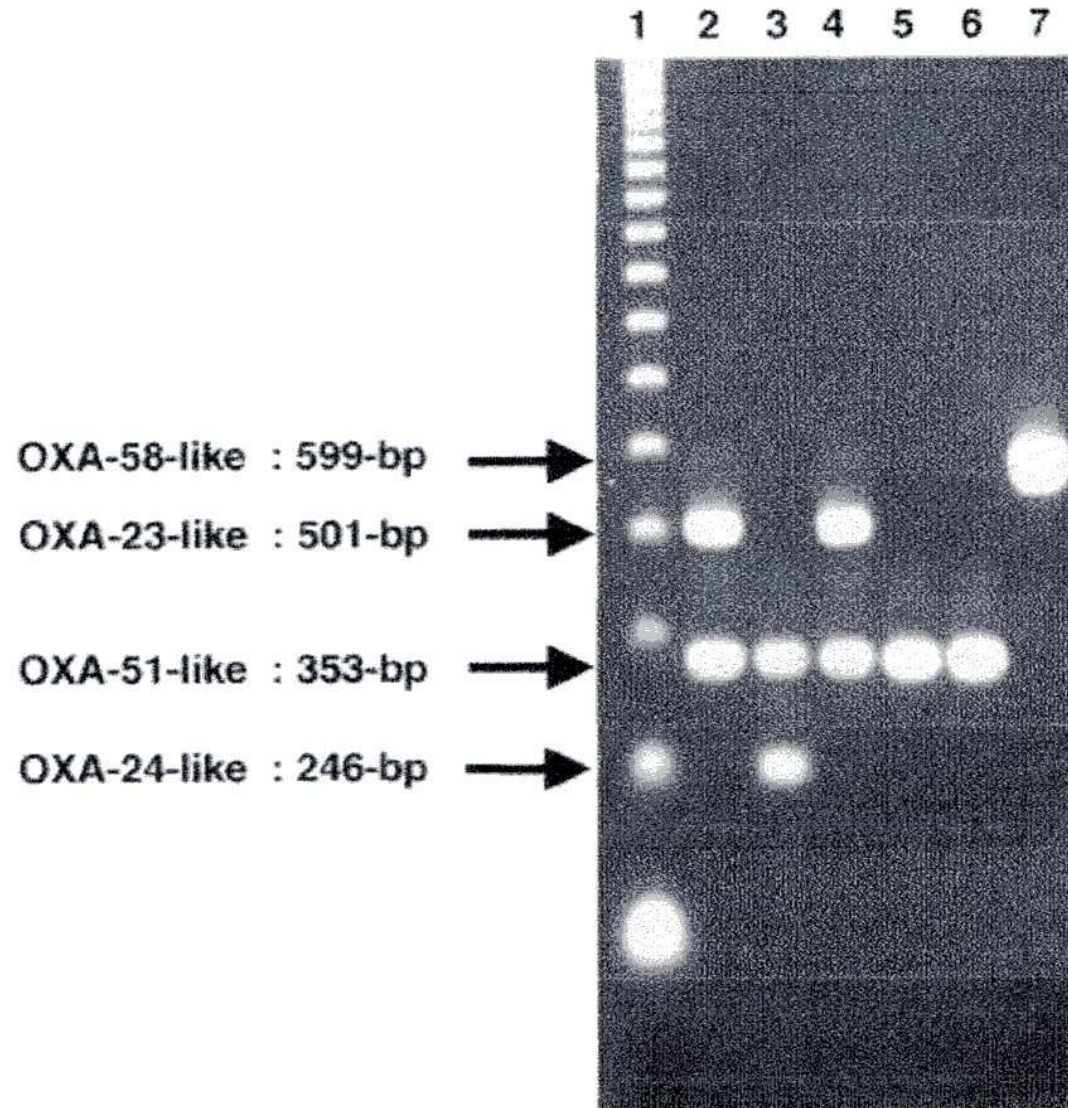
BASADA EN LA TÉCNICA DE PCR TRADICIONAL

-INCLUYE MÁS DE DOS "PRIMERS" EN LA MISMA REACCIÓN

-POSIBILIDAD DE DETECCIÓN DE DIVERSOS GENES EN LA MISMA REACCIÓN

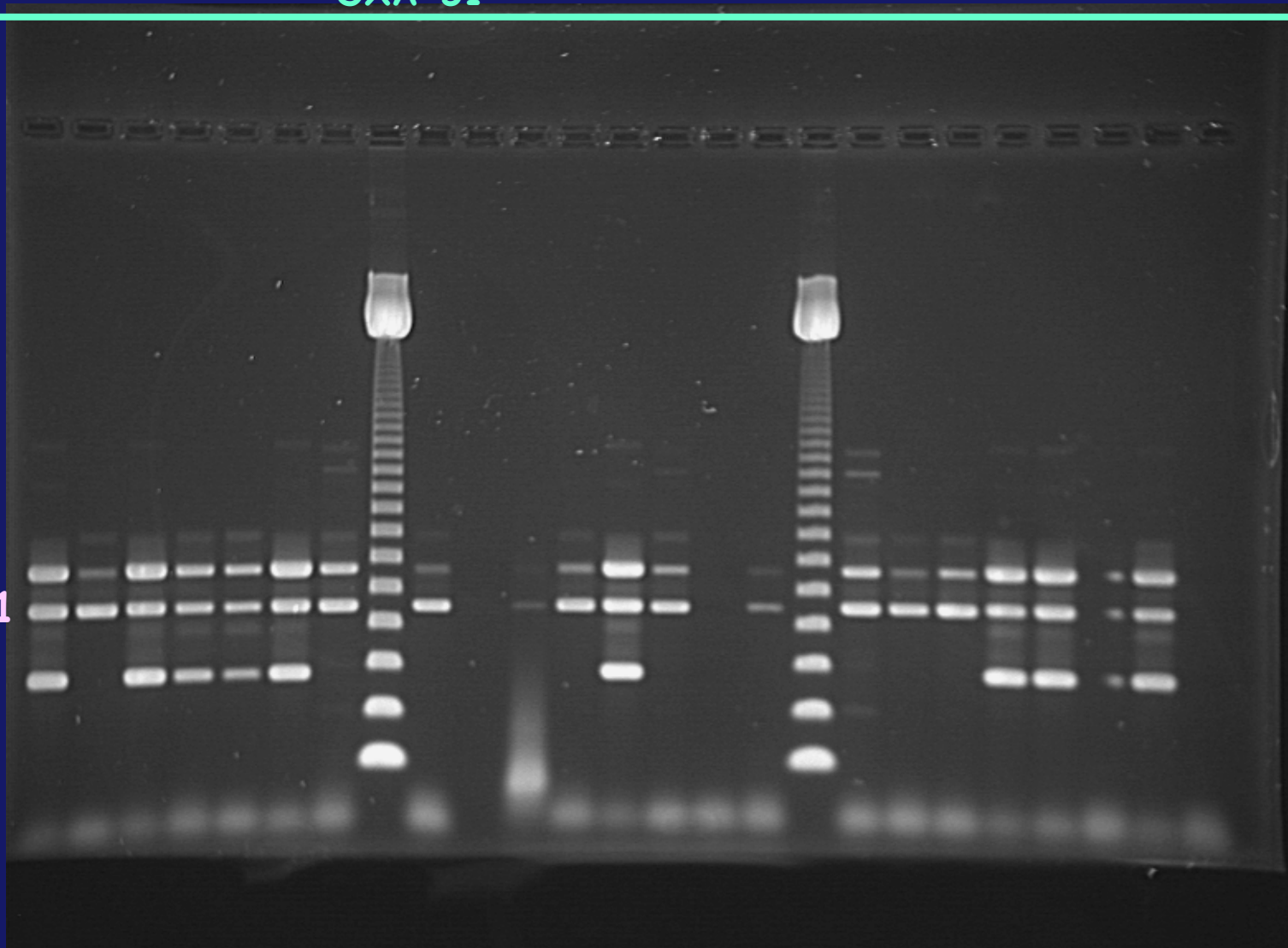
- DIFICULTADES: SELECCIÓN DE PRIMERS Y CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Multiplex-PCR para los genes de las familias de carbapenemasas *bla*_{OXA-23} *bla*_{OXA-24/40} *bla*_{OXA-51} *bla*_{OXA-58}



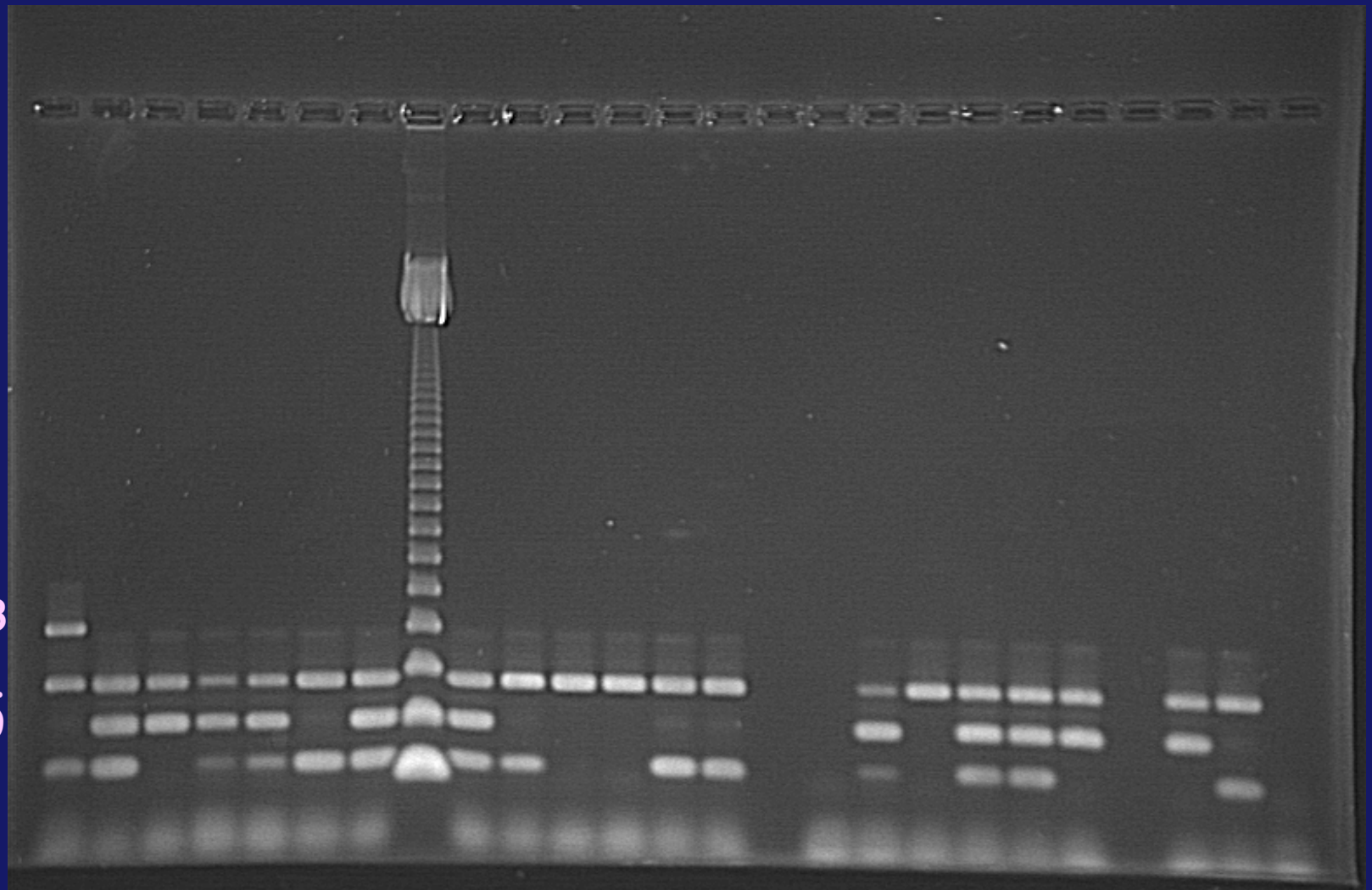
Multiplex-PCR para los genes de virulencia *CsuE* y *OmpA* y la carbapenemasa *bla*_{OXA-51}

CsuE
bla OXA-51
OmpA



Multiplex-PCR para los genes de la integrasa *Int 1* y de las carbapenemasas *bla*_{OXA-23} *bla*_{OXA-24/40} *bla*_{OXA-51}

bla OXA-23
bla OXA-51
bla OXA-40
Int 1



REAL-TIME PCR

1- COMBINA:

- PCR
- DETECCIÓN CON SONDAS FLUORESCENTES

2- VENTAJAS SOBRE PCR CONVENCIONAL

- REACCIÓN DE UNA HORA
- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD SIMILAR A PCR CONVENCIONAL Y SOUTHERN BLOT
- MENOR RIESGO DE CONTAMINACIÓN
- SIMPLICIDAD

TECNOLOGÍA

1- SYBR Green: DETECTA LA ACUMULACIÓN DE dsDNA

- DETECCIÓN SENSIBLE
- PERO NO ESPECÍFICO

2- SONDAS CON FLUORESCENCIA

- DETECCIÓN SENSIBLE Y ESPECÍFICA
- TIPOS:

- 5' NUCLEASA (*TaqMan*)
- MOLECULAR BEACONS (faros/balizas)
- SONDAS FRET

- TODAS SE BASAN EN LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA LUMÍNICA ENTRE DOS MOLÉCULAS ADYACENTES (*Fluorescence resonance energy transfer*)

REAL-TIME PCR: FACTORES CRÍTICOS

- 1- EXTRACCIÓN DE DNA:** tipo de microorganismo, presencia de inhibidores, degradación...
- 2- SELECCIÓN DE LA DIANA:** las secuencias deben ser únicas, estar conservadas, que no haya polimorfismos
- 3- DISEÑO DE PRIMERS Y SONDAS:** primers específicos, que no formen estructuras secundarias, que no haya interferencia con otras secuencias de la reacción
- 4- OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO:** concentración de cada reactivo, temperaturas....

REAL-TIME PCR: CONTROL DE CALIDAD

- 1- VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN
- 2- CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS
- 3- CONTROLES INTERNOS Y DE INHIBICIÓN
- 4- REACTIVOS
- 5- CONTAMINACIÓN

CUANTIFICACIÓN: REQUISITOS

1. OBLIGATORIEDAD DE CONTROLES:

- EXTERNOS: PARA CALCULAR LA CANTIDAD DE MOLDE EN LA MUESTRA
- INTERNOS: EVITAR FALSOS NEGATIVOS, CUANTIFICAR

2. COMBINAR ESPECTROFOTOMETRÍA CON ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3. EL RESULTADO DE EXPRESA EN RELACIÓN AL VOLUMEN DE MUESTRA, NÚMERO DE CÉLULAS...

REAL-TIME PCR: TIPADO

1- DETECCIÓN DE: MUTACIONES, INSERCIONES Y DELECCIONES

2- FORMATOS UTILIZADOS:

- SYBR Green
- HyProbe

3- OLIGOS MÁS ESPECÍFICOS: BEACONS MEJOR QUE LOS LINEALES

4- "MISMATCHES" MÁS DESESTABILIZADORES INCLUYEN C (C:C, C:A, C:T) Y MENOS DESESTABILIZADORES INCLUYEN G (G:T, G:A, G:G)

REAL-TIME PCR: APLICACIONES

VIROLOGÍA. área donde mayor impacto ha tenido, estudios de coinfecciones, genotipos, carga viral

BACTERIOLOGÍA. Detección de bacterias fastidiosas, evita cultivo tradicional, monitorización de la

MICOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA. Hasta el momento han sido escasas pero comienzan a incrementarse

SECUENCIACIÓN DE DNA

TÉCNICAS MOLECULARES

SECUENCIACIÓN:

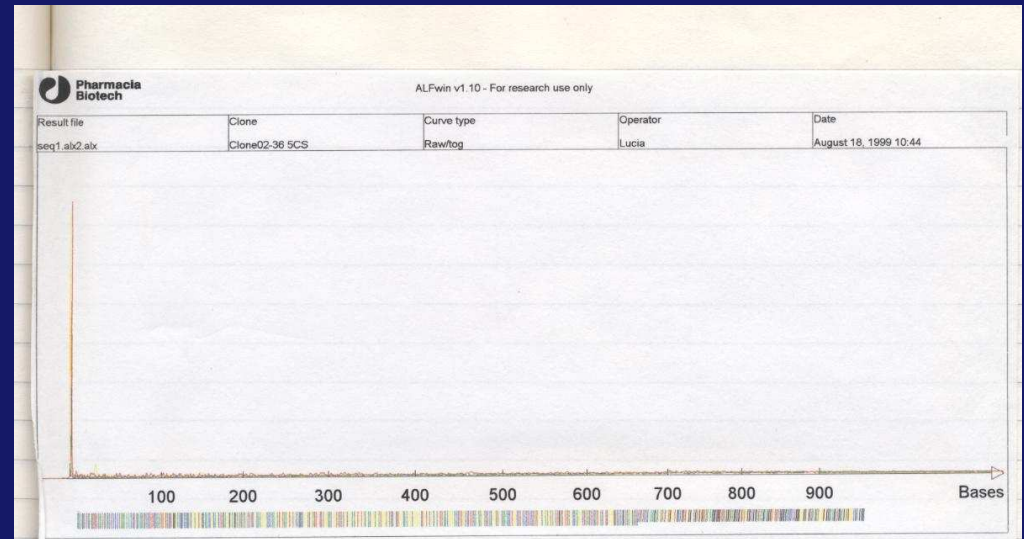
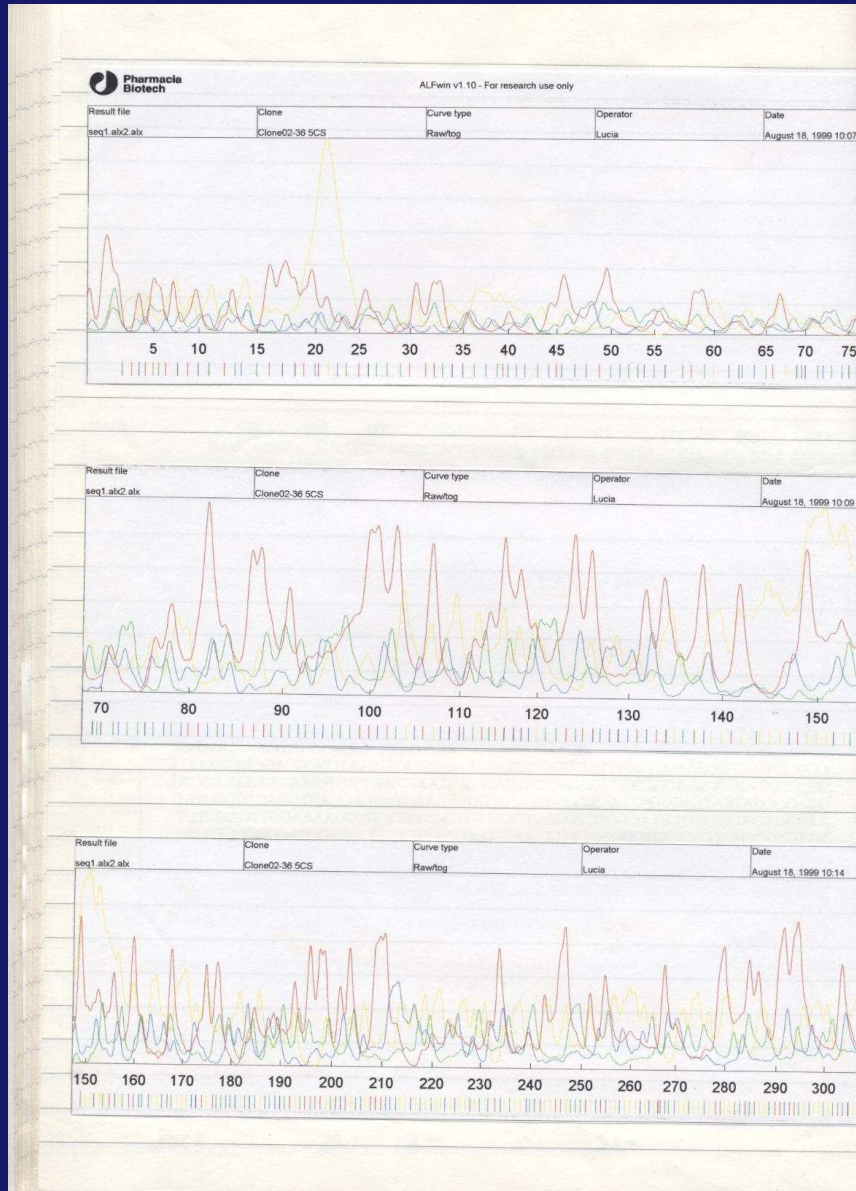
- PERMITE CONOCER LA SECUENCIA EXACTA DE NUCLEÓTIDOS
- TÉCNICA DE RESULTADO DEFINITIVO
- IMPRESCINDIBLE PARA EL DESARROLLO DE SONDAS, PRIMERS PARA PCR, CLONING.....

MULTILOCUS SEQUENCE TYPING: SECUENCIACIÓN PARCIAL DE GENES PARA LA DETECCIÓN DE VARIACIONES ALÉLICAS ESPECÍFICAS.



IMAGEN RADIOGRÁFICA RESULTADO DE UNA SECUENCIACIÓN MANUAL

SECUENCIACIÓN DEL GEN DEL INTEGRÓN DE CLASE 1 a EN *Acinetobacter baumannii*



Clone 36

```

ATCTTATKTCATACATWTCTGCATHAAATTTAgCACATCACACTCCCTAAAACAmATAGCCAC
ATGWAMACAAYCCAATTCACATTTATACACCAAATTCAGCTGCMRCATATKWKGAATCTR
CCSCTCDGATCGGTGAGGGCTGGGBGATCGATCCACGGCTAGGGCBTGTAAACAGCWAGCA
CRATGATATTGATCTGACGTTTCCCGCGAGAGGGCGGGCAGCTCGAGGCAATGGTTGAAAT
GCTCGGGCGGCGWTCACGGAGGAGTTGGACTATGGATTCTTAGCGGAGATCSGGGATGAG
TTACTTGACTGCGAACCTGCTTGGTGGGCAGACGAAGCGTATGAAATCGCGGAGGCTCCGCA
GGgCTCGTGCCAGAGGGCGGTGAGGGCGTCATCGCTGGGCGGCCAGTCCGTTGTAACAGCTG
GGAGGCGATCATCTGGGATTACTTTTACTATGCCGATGAAGTACCACCACTGGACTGGCCTAC
AAAGCACATAGAGTCTACAGGCTCGCATGCACCTCACTCGGGCGGAAAAGGTTGAGGTCT
TGYGTGCCGCTTTCAGGTGCGGATATGCGGCCAACAATTCGTCCAAGTCGACCCGCTTCBG
CGGGCKTTAACTCAMGCGTTAGATGCCCTAAGCMCATAATTGCTCACAGCCAaMTATCAR
GGTCAAGTCTGCTTRAGGGATTyACCCGMMWTGTYGGgTtSRGTCYSMTARRGGrATTTAAGC
MGAAA WTKYK GKTKKRgTGTCATTARGRATTTAaRCHGMAHKtBNBGGTTTGRKYyCCTTA
DRVRVACTWACCHSAAWKNBGKCTKGDTCCTAWRRVRACHWwACCGCACWTBCSBbBTkG
GTGCYHWAGRRRrTTHACMCAHTTCBGCKTGKKKSYCTARAVRRCATAMaSACaYTHGTBY
YGTGTGCyHACRVGCaYWCCG
    
```



SECUENCIADORES AUTOMÁTICOS

