

En Bacteriología de Aplicación Clínica las Técnicas de Biología Molecular se emplean para:

La identificación de especies de difícil tipificación mediante pruebas bioquímicas,

La identificación de alelos de genes que codifican factores de virulencia

La investigación de la epidemiología de la infección causada por una determinada especie

La investigación del mecanismo responsable de una resistencia emergente

La identificación de genes de resistencia a los antimicrobianos y su modo de movilización

Identificación de especies de difícil tipificación mediante pruebas bioquímicas

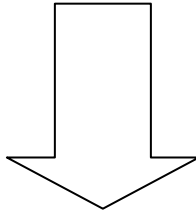
“Una especie bacteriana es una categoría que circunscribe un grupo genéticamente coherente de cepas/aislamientos individuales que comparten un alto grado de similaridad en características independientes”. (Genotípicas y fenotípicas)

Una especie bacteriana se puede definir por:

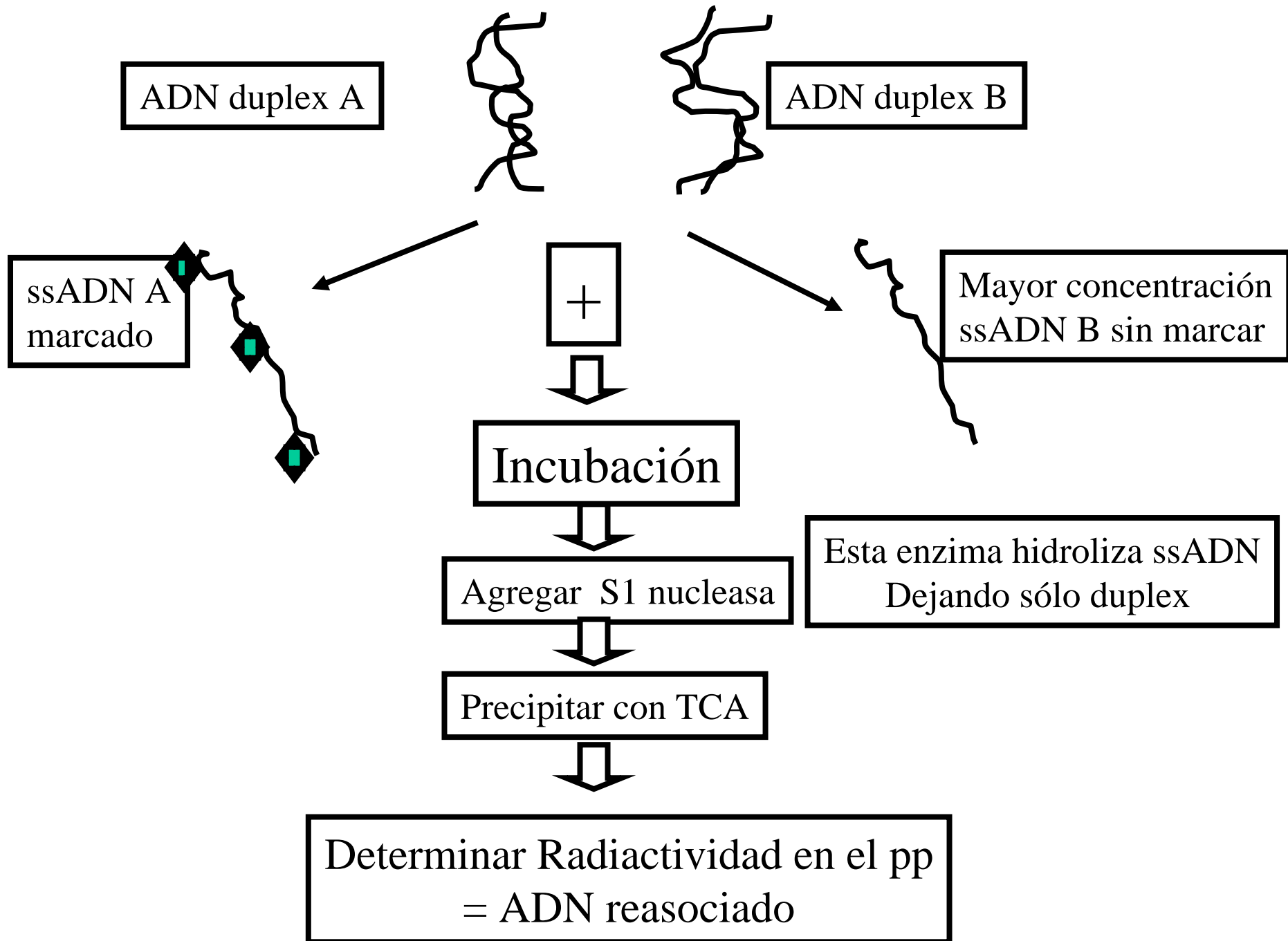
**1. Nivel de parentesco o similitud genético
(hibridación ADN-ADN)**

1. Análisis 16S rADN

2. El contenido G+C



Características fenotípicas o pruebas bioquímicas



Control ADN genómico del microorganismo 1 marcado x ADN genómico no marcado del microorganismo 1 = 100%

ADN genómico del microorganismo 1 marcado x ADN genómico no marcado del microorganismo 2 = ...%

ADN genómico del microorganismo 1 marcado x ADN genómico no marcado del microorganismo 3 = ...%

INTERPRETACION:

100% de hibridación: el mismo aislamiento

>70% de hibridación: la misma especie

>20-30% de hibridación: el mismo género

<10% hibridación: "no-relacionado"

Hibridación ADN-ADN me da idea del parentesco entre dos aislamientos bacterianos y la sensibilidad del método decae rápidamente cuando las especies son altamente divergentes por ejemplo pertenecen a diferentes géneros

Para estudios filogenéticos de los procariotes



GEN :

- 1- presente en todas las especies bacterianas**
- 2 -no transferible entre especies**
- 3- zonas conservadas**
- 4-tamaño suficientemente grande para poseer información sobre la evolución**

ARN Ribosomales en Procariotes

Nombre	Tamaño (nucleotidos)	Ubicación
5S	120	Subunidad mayor del ribosoma
16S	1500	Subunidad menor del ribosoma
23S	2900	Subunidad mayor del ribosoma

^a El nombre se basa en la velocidad que la molécula sedimenta en agua. Bigger molecules. Las moléculas más grandes más rápido que las pequeñas.

Escherichia coli ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG

Anacystis nidulans ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGAGGCAAGCGTTATCCG

Thermotoga maratima ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTACCCG

Methanococcus vanniellii ...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCGACGGCCCGAGTGGTAGCCA

Thermococcus celer ...GTGGCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCCCGAGTGGTGGCCG

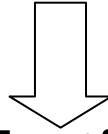
Sulfolobus sulfotaricus ...GTGTCAGCCGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCGAGTGGTCGGGG

Biología molecular clínica en la identificación de las especies y geno-especies o genomovar

Se basa en el análisis de los genes que codifican los rARN

- **16S ARN**
 - **23S ARN**
 - **Regiones spacers (tARN)**

16 S rADN (además de la secuenciación para estudios filogenéticos)



PCR-Ribotipificación

***Burkholderia cepacia* patógeno oportunista relacionado a infecciones en pacientes fibroquísticos, y otros pacientes inmunodeprimidos, así como a infecciones nosocomiales**

Ej. Complejo *Burkholderia cepacia*: compuesto por especies fenotípicamente similares

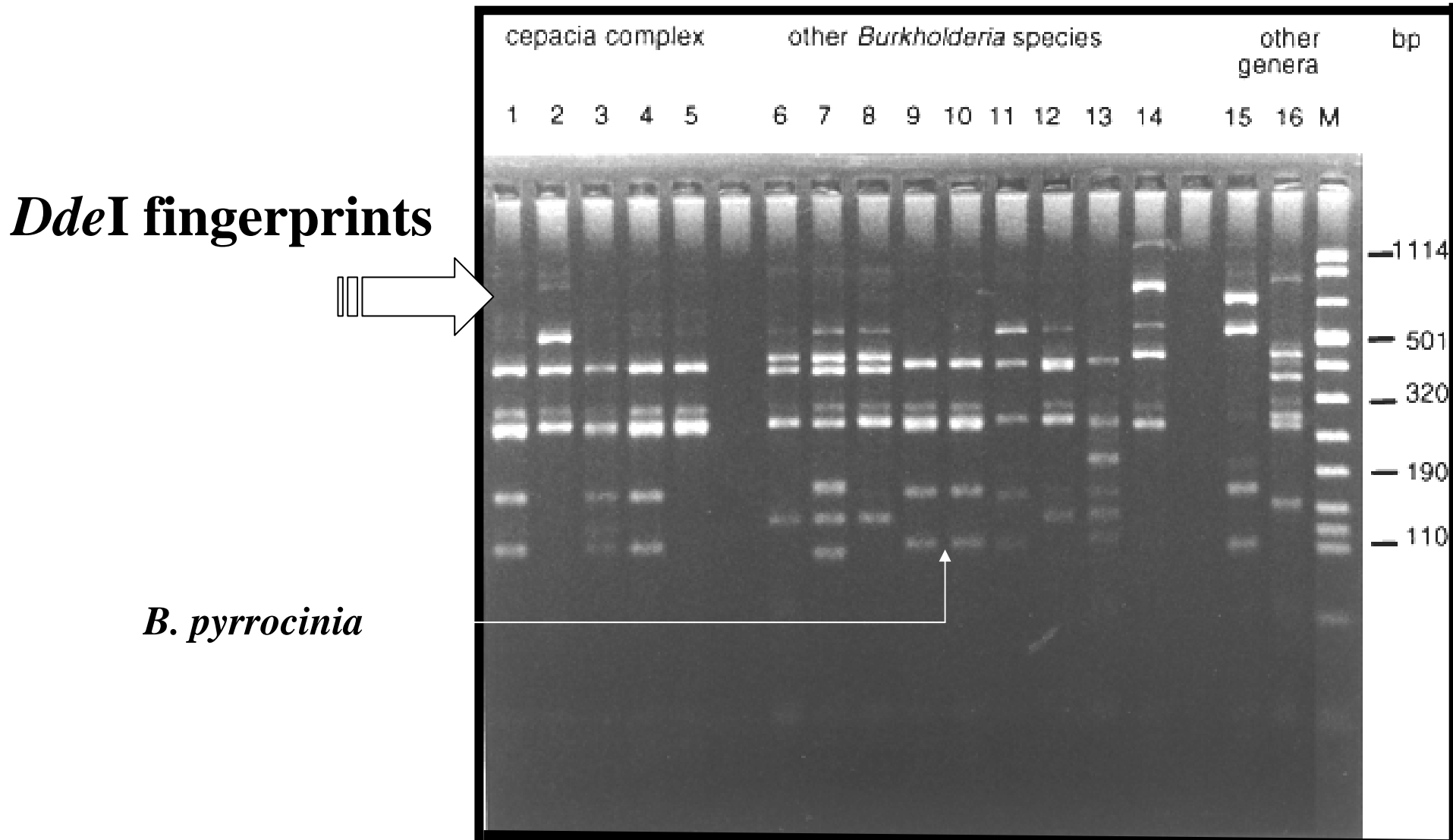
**Genomovares I ,
II (*B. multivorans*) , III,
IV (*B. stabilis*) y
*B. vietnamiensis***

Cebadores 16 S

fD1 (5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GATCCTGGCTCAG-3')

rD1 (5'-CCG GGA TCC AAG CTT AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'),

**4 grupos de RFLP *AluI*, *CfoI*, *DdeI*, y *MspI*,
y en 2 sub-grupos con los patrones obtenidos por *NciI* y
BssKI.**



Especies	Patrones de RFLP						RFLP	RFLP
	<i>AluI</i>	<i>CfoI</i>	<i>DdeI</i>	<i>MspI</i>	<i>NciI</i>	<i>BssK1</i>	Grupo	Subgrupo
<i>B. cepacia</i> genomovar I	A	A	A	A	AH	AH*	1	1 a
<i>B. cepacia</i> genomovar I	A	A	A	A	A	A	1	1 b
<i>B. cepacia</i> genomovar I	A	A	A	A	A	AH	1	1c
<i>B. cepacia</i> genomovar II	A	A	I	A	A	AI	2	2 a
<i>B. cepacia</i> genomovar III	A	A	A	A	A	A	1	1b
<i>B. cepacia</i> genomovar IV	A	B	A	B	H	H	3	3
<i>B. vitnamiensis</i>	A	A	J	A	A	A	4	4

* Perfil compuesto atribuible a variaciones entre los diferentes operones. *B. cepacia* posee por lo menos 6 operones rARN

Gen que codifica RecA, Cebadores específicos para cada Genomovar

**Complejo *B. cepacia* : *Burkholderia cepacia* (genomovar I)
Burkholderia multivorans II (genomovar II),**

Los experimentos de Hibridación ADN-ADN entre aislamientos *B. cepacia* genomovar III *recA* IIIA, IIIB, IIIC y IIID sugiere que son subtipos de una misma especie, *B. cenocepacia* sp. nov. con una cepa tipo LMG 16656, distinta a *B. cepacia* (genomovar I)

***Burkholderia stabilis* (genomovar IV),
Burkholderia vietnamiensis (genomovar V)
Burkholderia dolosa genomovar VI
Burkholderia ambifaria (genomovar VII),
Burkholderia anthina (genomovar VIII),
Burkholderia pyrrocinia (genomovar IX),**

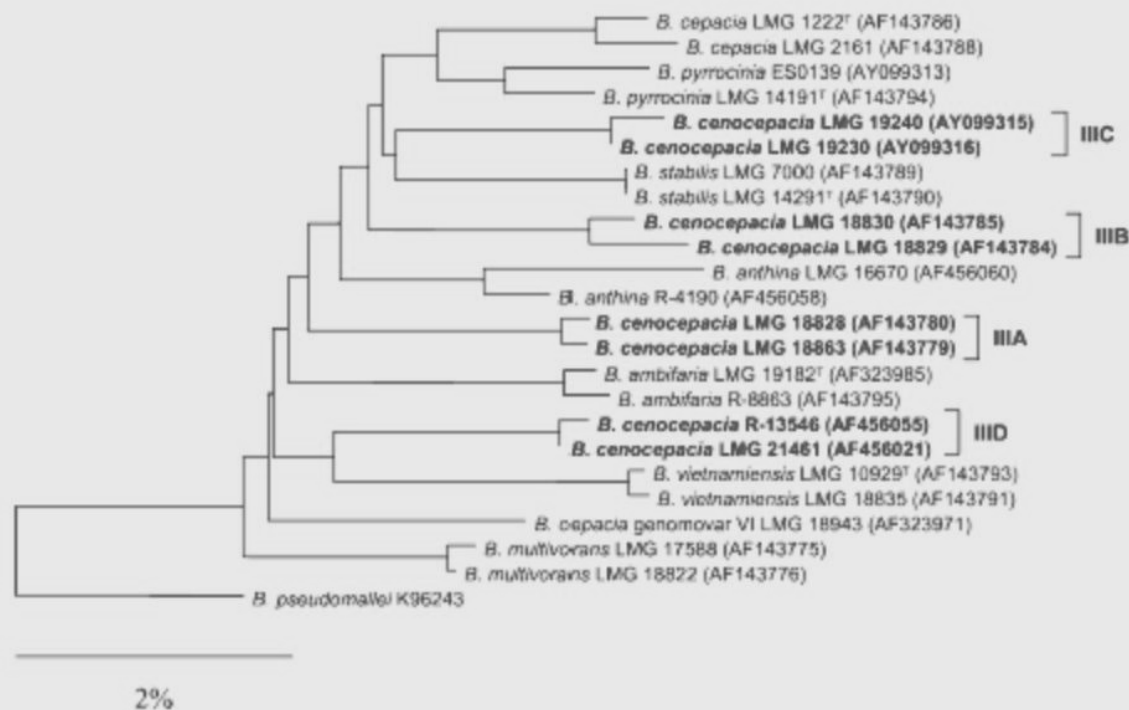


Fig. 1. Phylogenetic tree of *B. cepacia* complex bacteria based on *recA* gene sequences indicating the presence of four *B. cenocepacia* lineages (highlighted in bold character type). Representative strains of each genomovar and the GenBank accession numbers are shown. Sequence data for the *Burkholderia pseudomallei* strain K96243 *recA* gene was generated by the Pathogen Sequencing Unit at the Sanger Institute, and can be obtained from <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes>.

TABLE 1
DNA-DNA binding values and % G + C content of strains examined

Strain	% G + C	DNA binding values with strain								
		LMG 16656 ^T	LMG 6986	LMG 6981	LMG 18832	LMG 13053	LMG 14271	LMG 16661	LMG 21461	LMG 1222 ^T
<i>B. cepacia</i> genomovar IIIA										
LMG 16656 ^T	66.7	100								
LMG 6986	67.1	84	100							
LMG 6981	67.2	88	90	100						
LMG 21440	67.5	86	92	96						
<i>B. cepacia</i> genomovar IIIB										
LMG 18832		67	58	74	100					
LMG 13053	66.9	65	63	79	87	100				
LMG 16659	67.0	60	73	83	93	94				
LMG 14271	66.2	71					100			
LMG 16661	66.8	77				93	92	100		
<i>B. cepacia</i> genomovar IIID ^A										
LMG 21461	66.7	61					69	65	100	
LMG 21462	66.6	71					75	79	92	
<i>B. cepacia</i> genomovar I										
LMG 1222 ^T	66.8	42			52	55				100
LMG 2161	66.6	53			50	47				76

Género *Acinetobacter* está compuesto por 21 genoespecies
Muchas de las cuales no pueden ser diferenciadas
fenotípicamente.

Aunque se han descrito brotes de infecciones por
las genoespecies 5 (*A. junii*), 7 (*A. johnsonii*) y 8/9 (*A.*
***lwoffii*), las genoespecies más frecuentemente relacionadas a**
infecciones nosocomiales pertenecen al

complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

***A. calcoaceticus* (*Acinetobacter* genoespecie 1)**

***A. baumannii* (*Acinetobacter* genoespecie 2)**

***Acinetobacter* genoespecie 3**

***Acinetobacter* genoespecie N1 (GM)**

***Acinetobacter* genoespecie N2 (GM)**

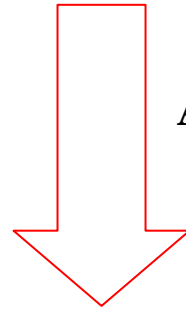
***Acinetobacter* genoespecie 13 TU**

Determinados mediante Hibridación ADN-ADN

Acinetobacter

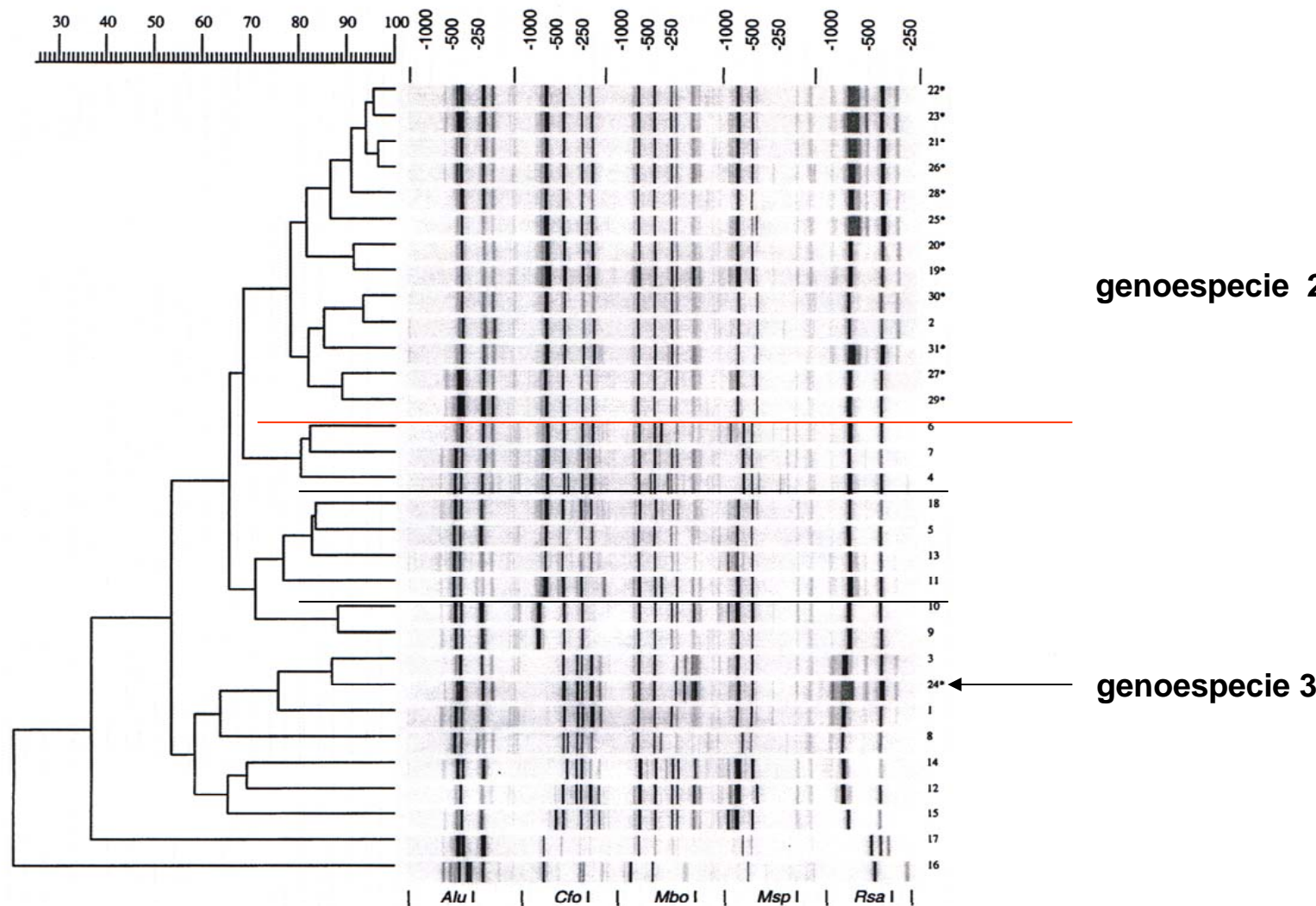
PCR- Ribotipificación

ARDRA(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)



Amplificación del 16S (1500 pb)

AluI, CfoI, MboI, MspI, RsaI

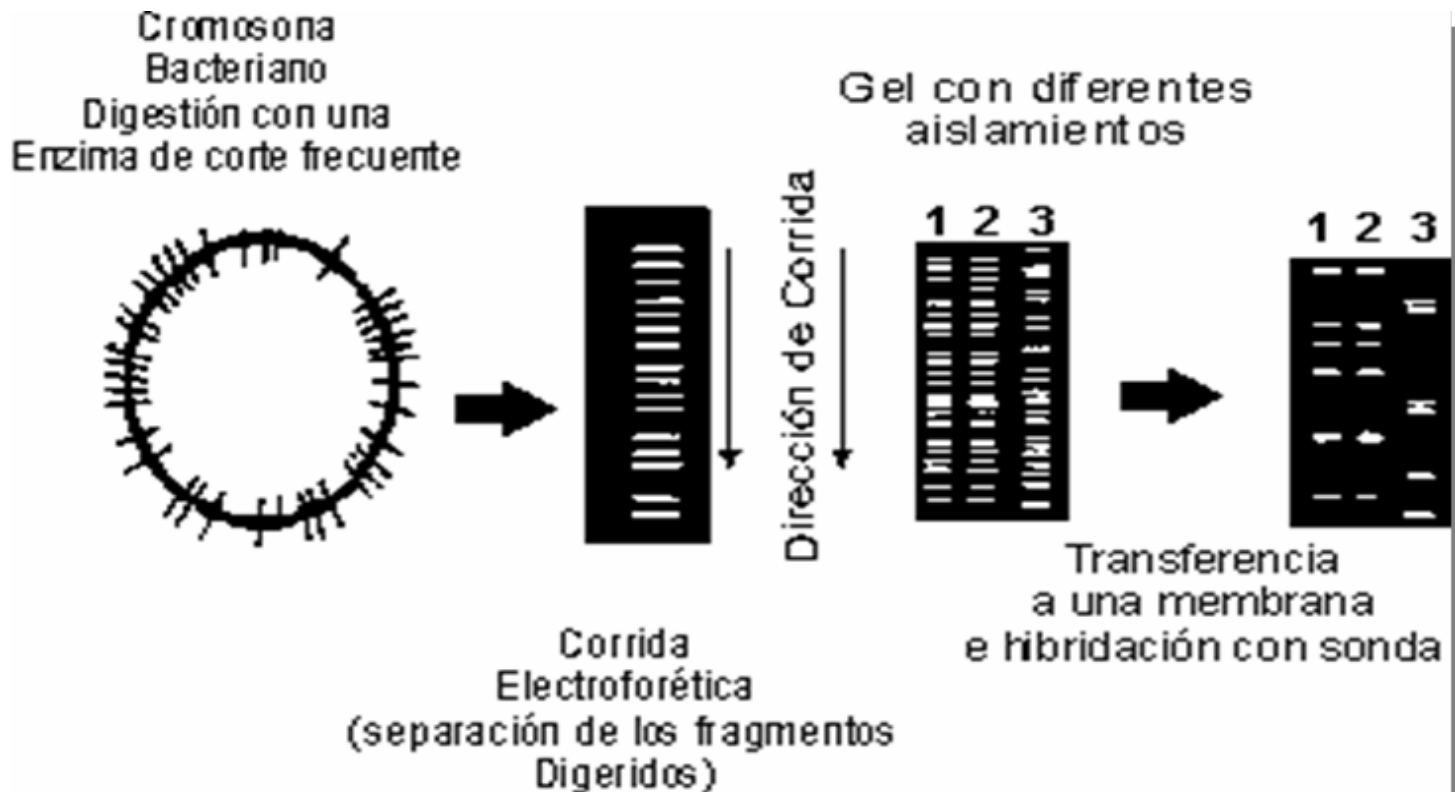


**Aislamientos 19*-31* (excepto 24 *) aislamientos clínicos de *A. baumannii*
números 1 al 12 genoespecies BG, 13-15 TU, 14-17BJ.**

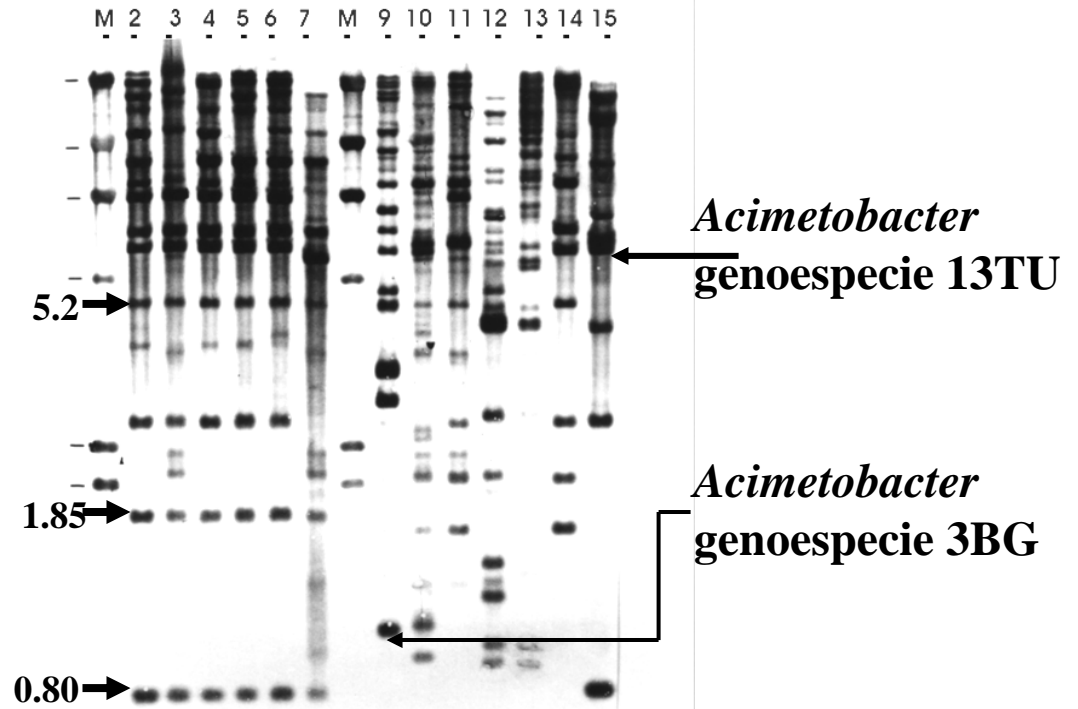
**Bajo nivel discriminatorio para diferenciar genoespecies 6, 7 y 4, y entre
18, 5, 13, 11.**

Ribotipificación: Digerir el genoma con enzimas de alto numero de corte, transferir los fragmentos obtenidos a nitrocelulosa

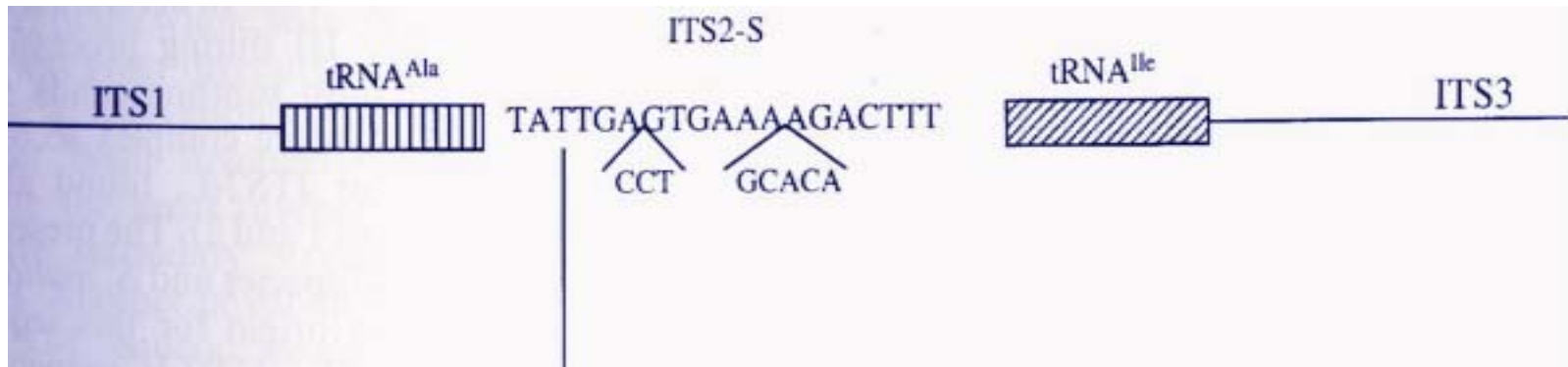
y utilizar la sonda universal (cDNA de los genes 16S ARN-23S ARN de *E. coli*)



A.baumannii
Acimetobacter
genospecie 2



Región spacer 16-23S



ITS: intergenic spacer sequences

Amplificación: utiliza regiones conservadas de los extremos de los genes 16S y 23S

Para algunos Géneros (*Xantomonas*) que incluyen especies cuya diversidad genética medida

por secuencias del 16SrADN es de 1.8% (similitud 98.2%), se ha observado

que IT muestran similitudes en el rango de 63-80%.

En algunos Géneros la velocidad de evolución de la región IT16S-23S es 10 veces mayor que las secuencias 16S (ARN)

Región spacer 16-23S

Cebadores usados son secuencias consenso con la parte externa de la region “spacer”



T3A 5' GGG GGT TCG AAT TCC CGC CGG CCC CA-3'

T5B 5'-AAT GCT CTA CCA ACT GAA CT-3'

Marcados en sus extremos 5' con isotiocianato de fluoresceina durante sus síntesis

Los productos amplificados se separan por electroforesis en 5% de acrilamida-7 M urea en 0.6 X TBE y se analizan en un secuenciador laser (fluorescencia) automatizado

Los patrones se expresan como densitograms de fluorescencia

De los 21 grupos DNA-DNA o genoespecies: este método discriminó 17, ya que el complejo complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* lo dividió solamente en dos grupos o clusters

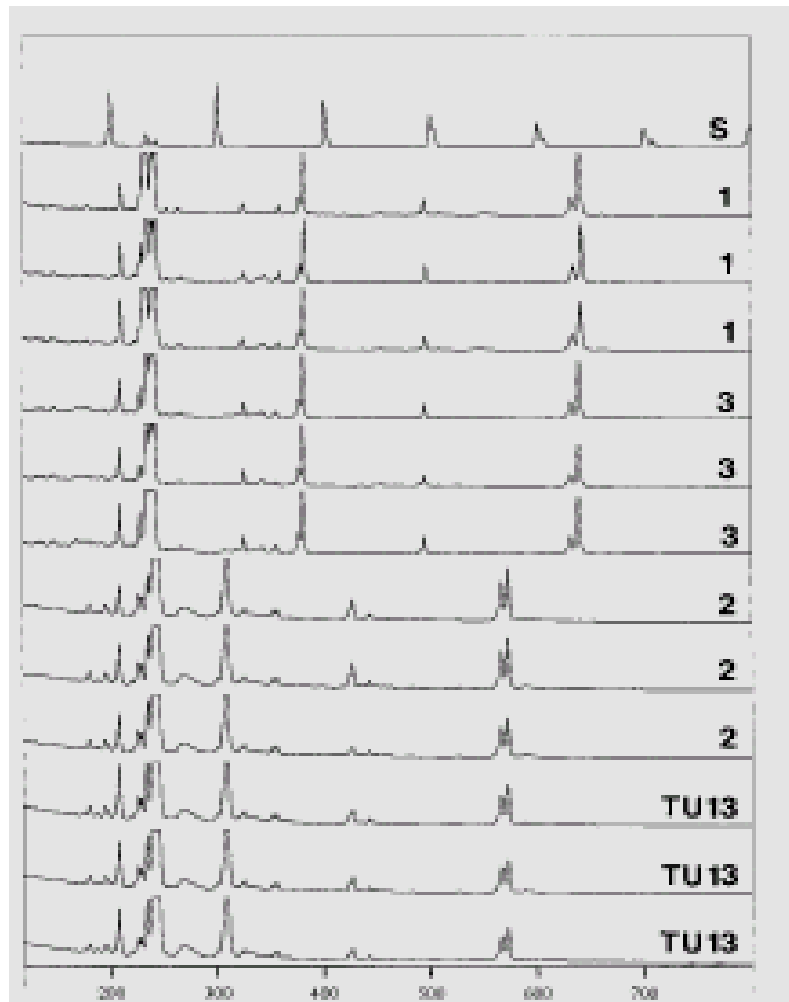
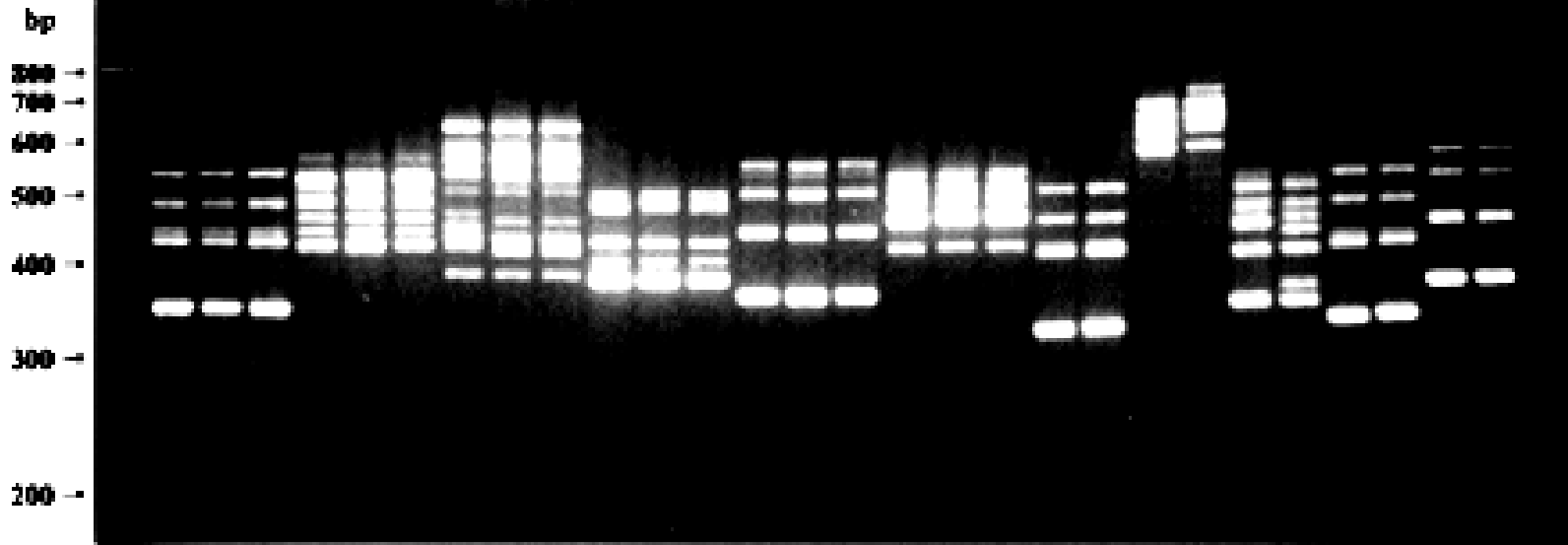


FIG. 1. Fluorescence denatogram of the tDNA fingerprint patterns representative of DNA groups of the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex (groups 1, 2, 3, and TU13). Row 5, a 100-bp ladder was used for base pair calibration, with the number of base pairs indicated at the bottom of the denatograms.

La técnica de Internal transcribed spacer-PCR (ITS-PCR,) que amplifica la región “spacer” o separadora entre 16S y 23S ha sido utilizada para identificar las especies de estafilococos coagulnegativos (SCN) en forma rápida y específica. Se identificaron mediante esta técnica 11 especies diferentes de SCN en alrededor de 600 aislamientos clínicos en forma rápida y precisa originando cada una de tales especies patrones de bandas únicos.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



Patrones de bandas generados por ITS-PCR. Líneas 1 y 30 patrón de peso molecular. Línea 2, *S. epidermidis* cepa de referencia; Línea 3 y 4, *S. epidermidis* de aislamiento clínico; Línea 5 *S. haemolyticus* cepa de referencia; Línea 6 y 7 *S. haemolyticus* de aislamiento clínico; Línea 8, *S. aureus* cepa control; Línea 9 y 10 *S. aureus* de aislamiento clínico; Línea 11 *S. hominis* cepa de referencia; Línea 12 y 13 *S. hominis* aislamiento clínico; Línea 14 *S. saprophyticus* cepa de referencia; Línea 15 y 16 *S. saprophyticus* de aislamiento clínico; Línea 17 *S. warneri* cepa de referencia; Línea 18 y 19 *S. warneri* de aislamiento clínico; Línea 20 *S. simulans* cepa de referencia; Línea 21 *S. simulans* de aislamiento clínico; Línea 22 *S. lugdunensis* cepa de referencia; Línea 23, *S. lugdunensis* de aislamiento clínico; Línea 24 *S. caprae* cepa de referencia; Línea 25 *S. caprae* de aislamiento clínico; Línea 26 *S. carnosus* cepa de referencia; Línea 27, *S. carnosus* de aislamiento clínico; Línea 28, *S. cohnii* subsp. *Cohnii* cepa de referencia; Línea 29 *S. cohnii* aislamiento clínico. Couto *et al*, 2001.

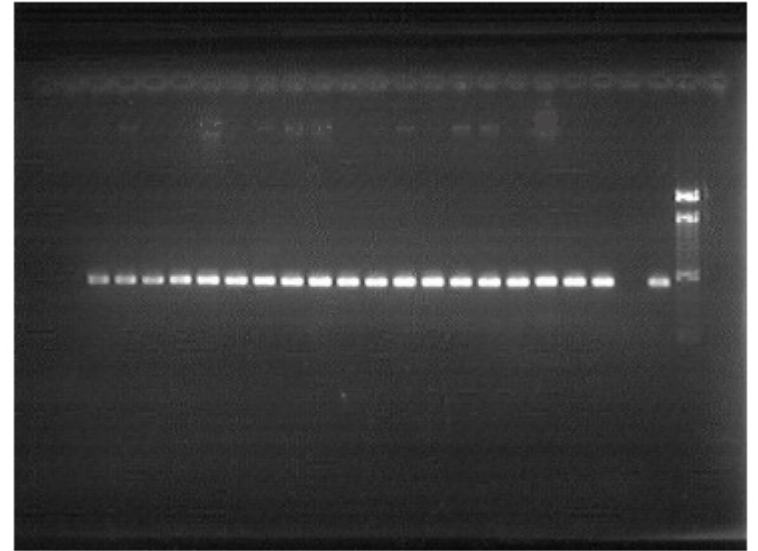
Stenotrophomonas maltophilia

SM1 CAGCCTGCGAAAAGTAA

SM4 TTAAGCTTGCCACGAA CAGG

531 pb

23S



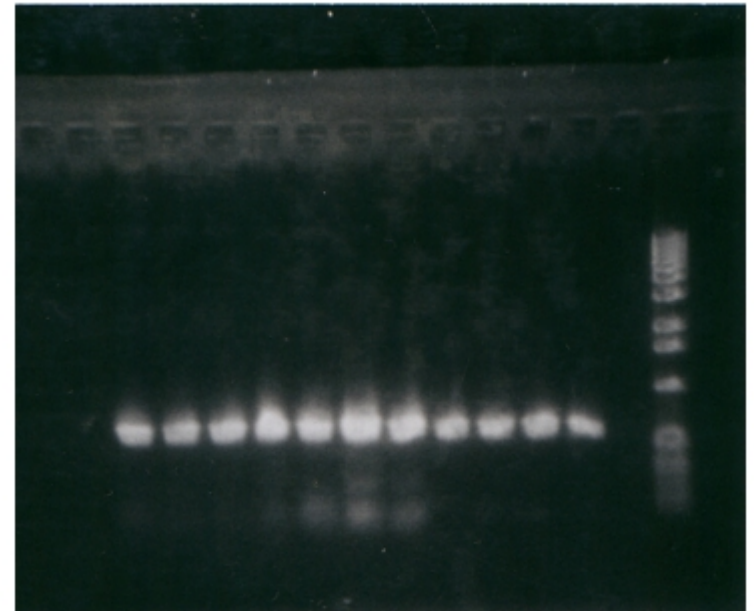
Helicobacter pylori

HP 1 5' GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC

HP 2 5' TGGCAATCAGCGTCAGGTAATG

16S

517pb

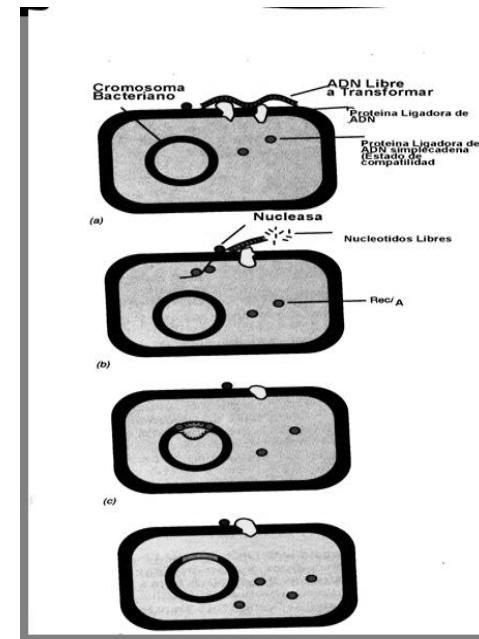
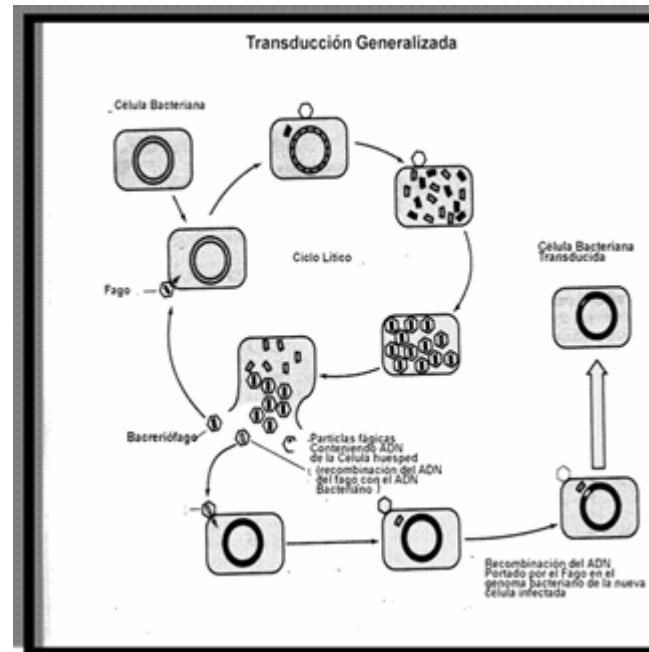
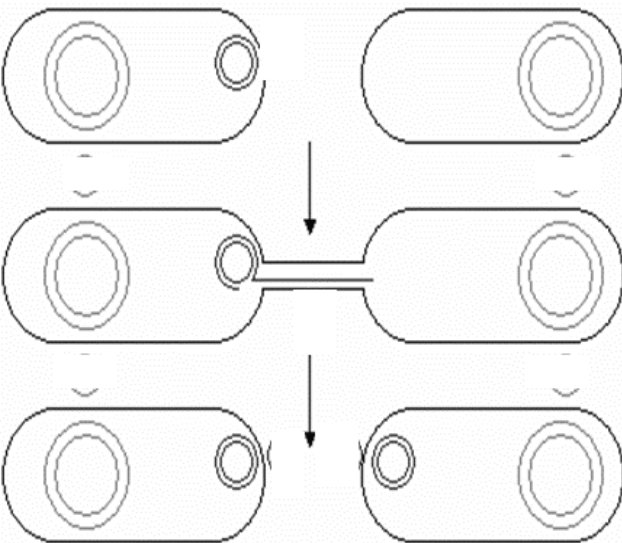


El contenido G+C

$$(T_m) \text{ mol\% G+C} = \frac{\{T_m + [90.5 - T_m (\text{ref})]\} - 69.3}{0.41}$$

En la actualidad se utiliza para determinar la transferencia de genes o grupos de genes entre especies o linajes

Las bacterias pueden adquirir genes horizontalmente ya sea por conjugación, inserciones mediadas por bacteriófagos o por la toma de ADN nativo de fuentes exógenas



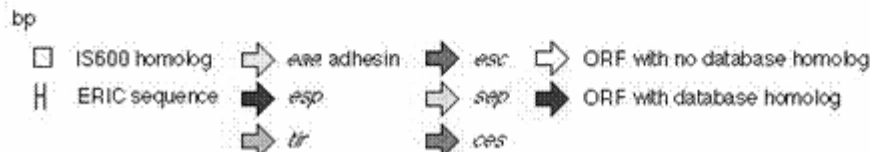
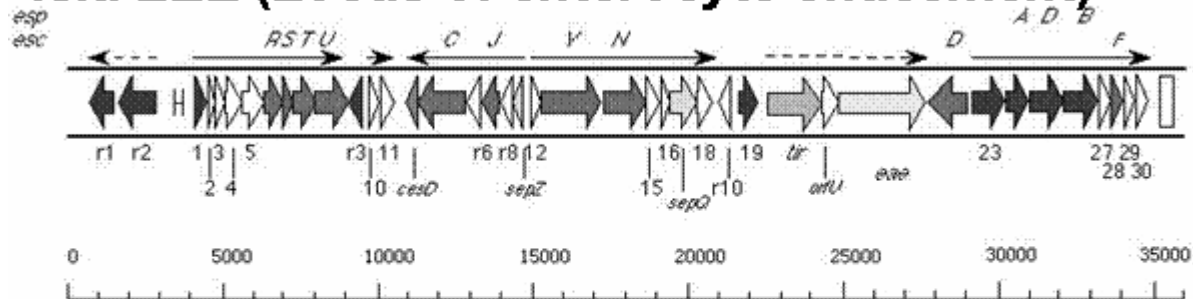
Por la gran diversidad de mecanismos virtualmente todo gen o grupos de genes pueden ser transferidos virtualmente a toda especie bacteriana pero los que realmente nosotros detectamos son aquellos que presentan una relevancia evolutiva (genes que persisten)

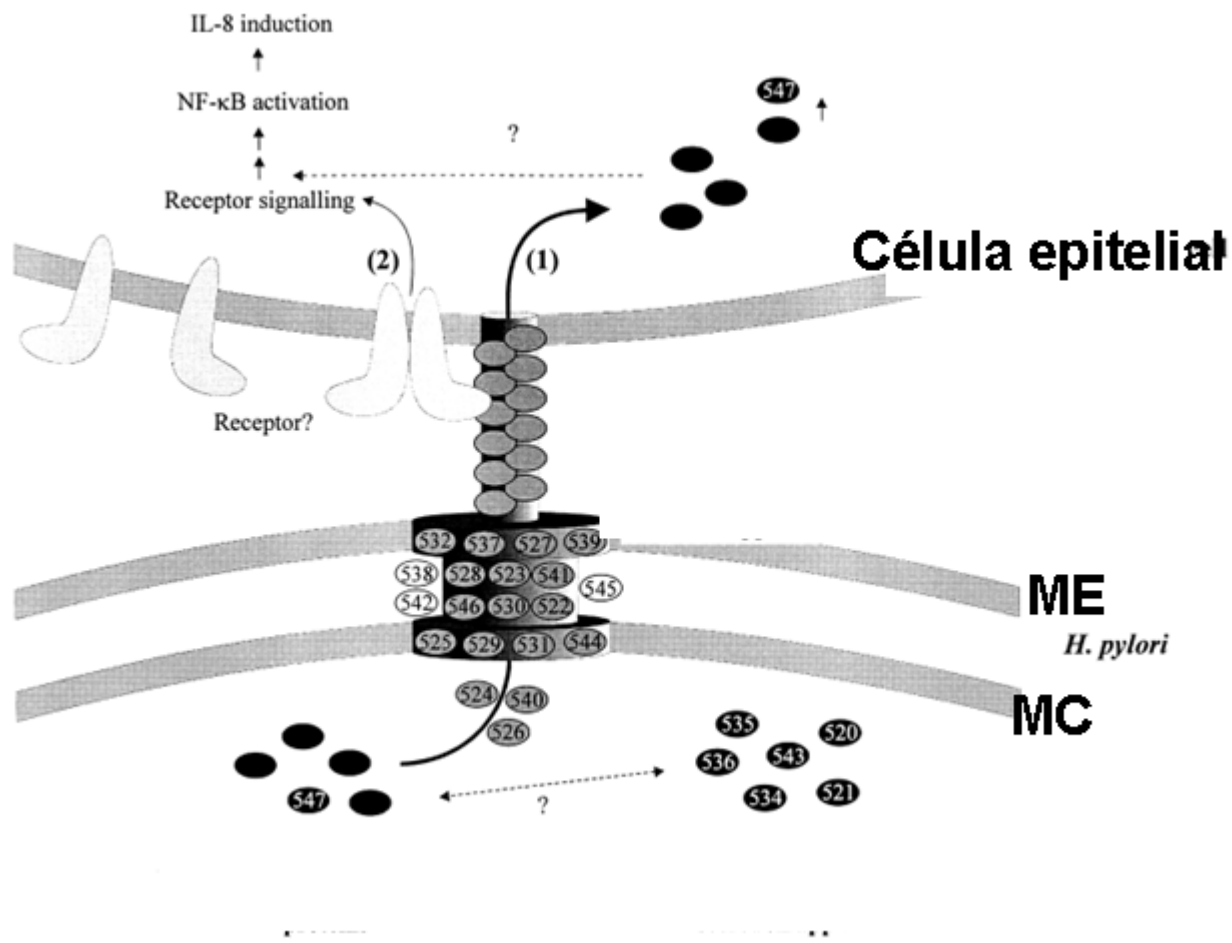
Isla de Patogenicidad (PAI): bloques de ADN que codifican factores de patogenicidad que es adquirida generalmente por transmisión horizontal

Los plásmidos pueden ser vectores de estos bloques de genes responsables de la patogenicidad.

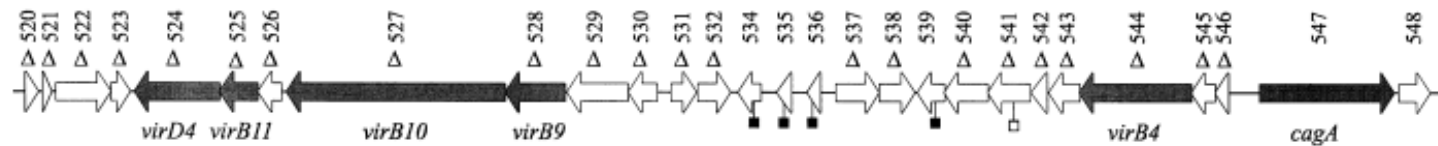


Isla LEE (Locus of enterocyte effacement)

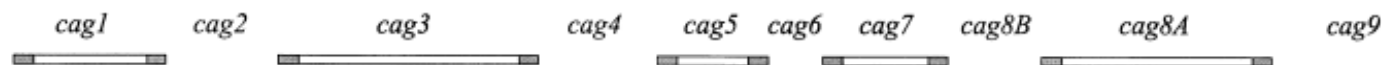




A



B



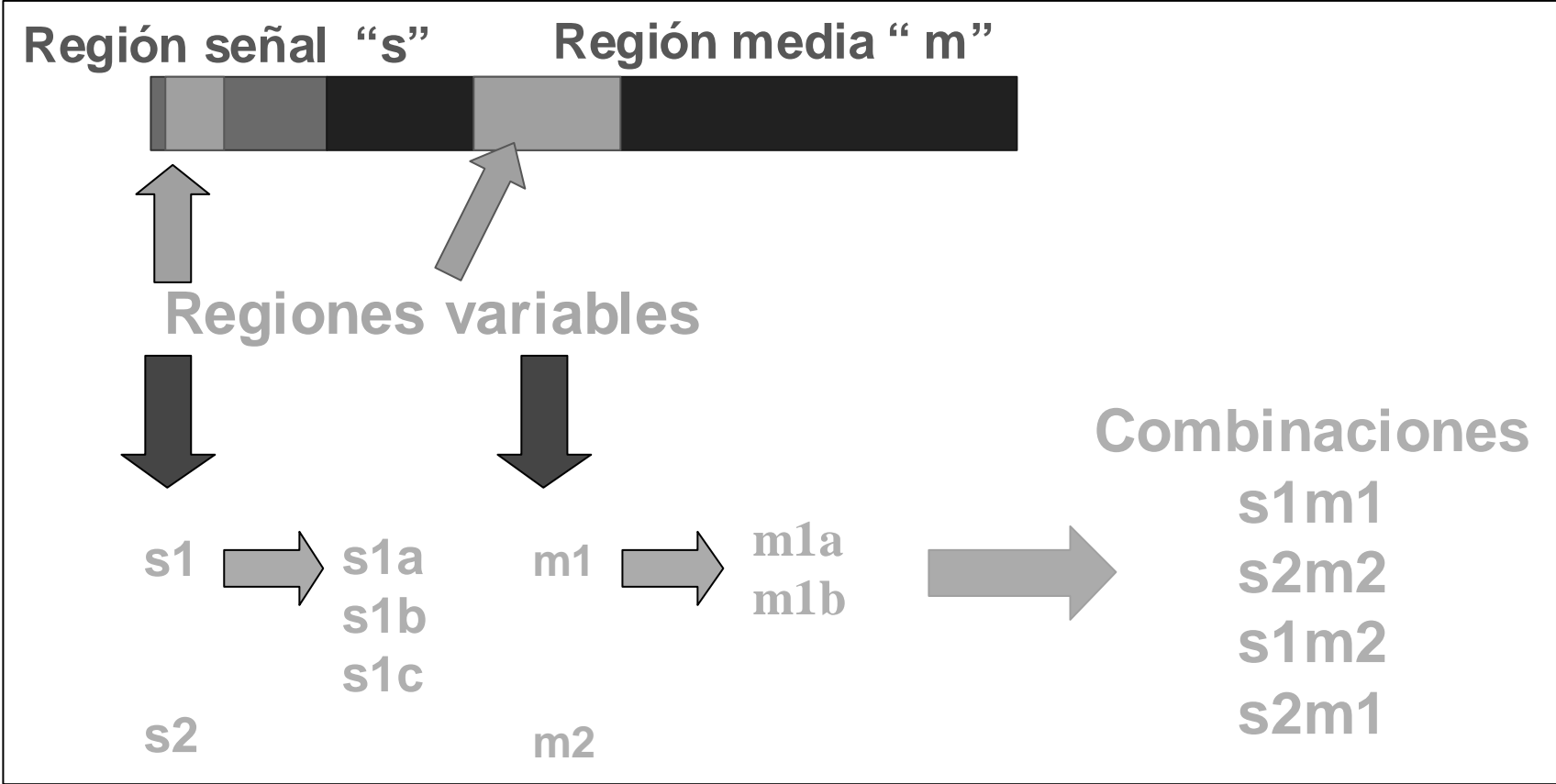
- 1. PAIs portan genes que codifican factores de virulencia: adhesinas, toxinas, invasinas, etc.**
- 2. Están ubicadas en el cromosoma o formando parte de plásmidos**
- 3. Poseen un contenido G+C diferente del resto del genoma de la especie**
- 4. Están flanqueadas por repeticiones invertidas**

“Una especie bacteriana es una categoría que circunscribe un grupo genéticamente coherente de cepas/aislamientos individuales que comparten un alto grado de similaridad en características independientes. Hasta el presente parámetros como la homología ADN-ADN y el contenido en G+C son estándares para delinear especies bacterianas. Los nuevos métodos tales como secuenciación de un gen determinado (16 S rADN, *recA* etc) deben ser congruentes principalmente con la hibridación ADN-ADN

♣ La identificación de variantes (alelos) de genes de virulencia para determinar su correlación con las diferentes formas clínicas de la presentación de la infección

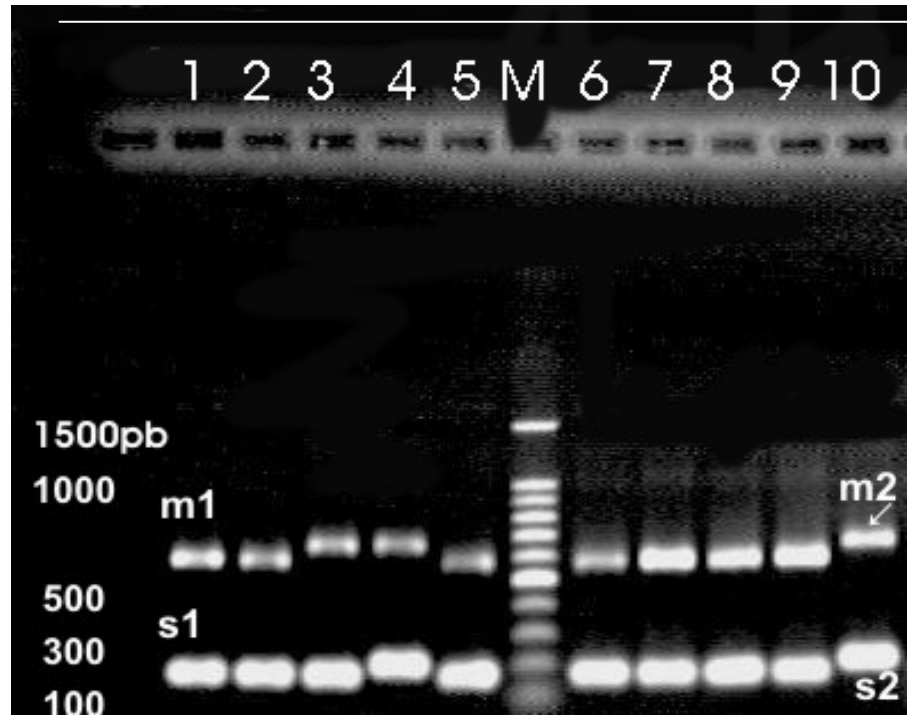
Factores de virulencia ? *H. pylori*

***vacA*: enzima vacuolizante de células eucariotas**



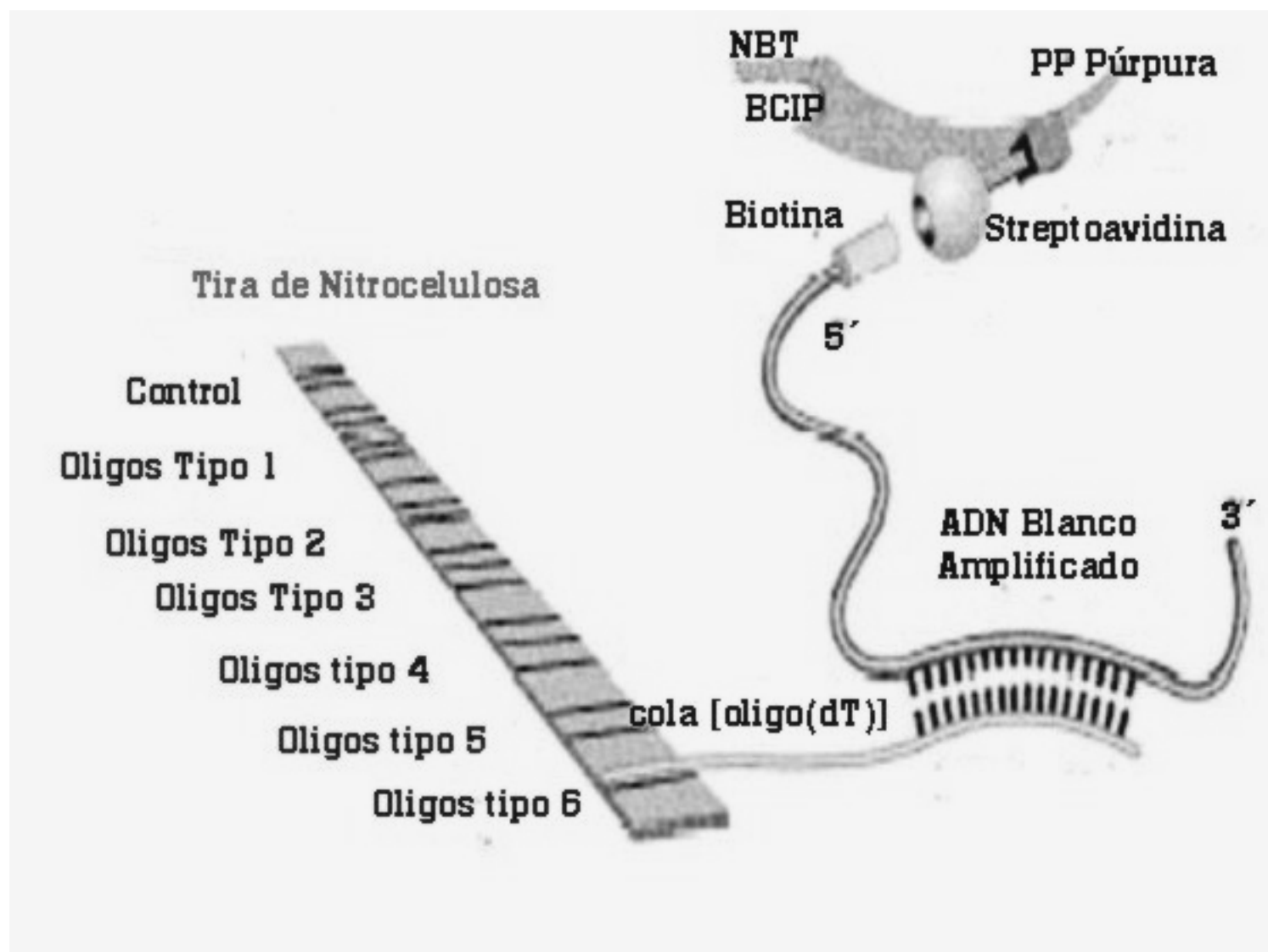
Helicobacter pylori

vacA PCR multiplex



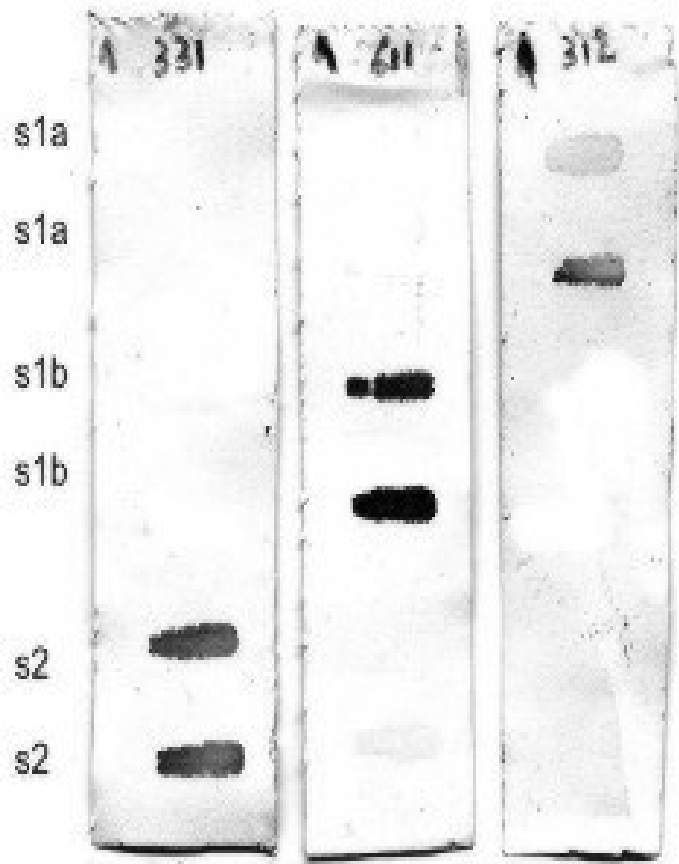
**Los diferentes tipos y subtipos se pueden
identificar
mediante PCR utilizando cebadores específicos para
cada uno de ellos**

**Hibridación reversa
LiPA
(Line Immuno Probe Assay)**

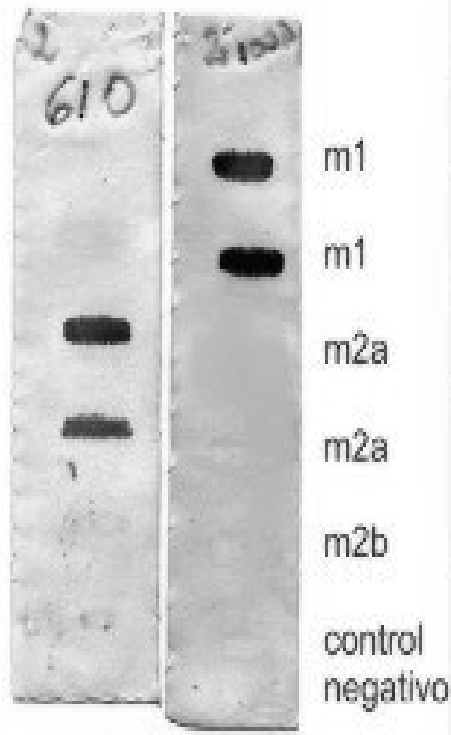


A

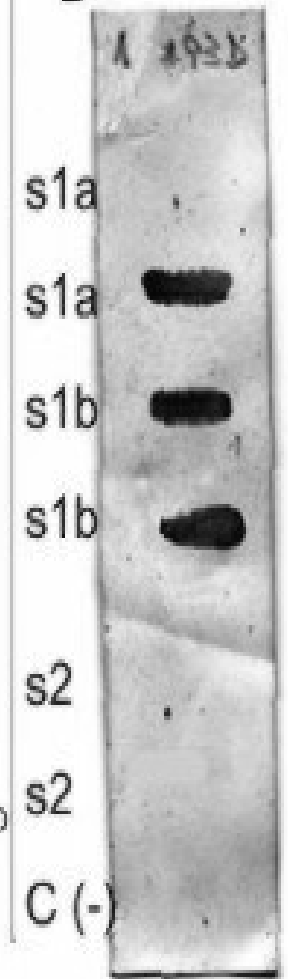
Región Señal



Región Media



B



vacA-s1a

P22S1a

S1a-F **P1S1**

U07145 AATCGCCCTCTGGTTTCtctcgcttagta**ggagcATTAGTCAGCATCAC**ACCGCAACAAAGTCATGCCGCCTTTTTCACA
515
AR-312 -----G-----G
111
U05676 -----t-----G-----T---
186

rec vacA-s1a/s1b

AR-710 -----t-T---C-----G-----
111

vacA-s1b

P1S1b

P2S1b **SS3-F**

AF191644 -----T-A-----**-T-----C-----G--GA-T--gc--t-----g-g**-----G
110
AE001511 -----T-A-----T---C-----G--GA-T--GC--T-----G-G-----G
5862
AF217732 -----T-A-----T---C-----G--G--T--GC--T-----G-G-----G
87
AR-602III) -----T-A-----T---C-----G--GA-T--TGC--T-----G-G-----
108
AR-609 -----T-T-A-----T---C-----G--GA-T--TGC--T-----A-----C-----G
111

ISLA DE PATOGENICIDAD *cag* (*cag*-PAI) de *Helicobacter pylori* (Hp).

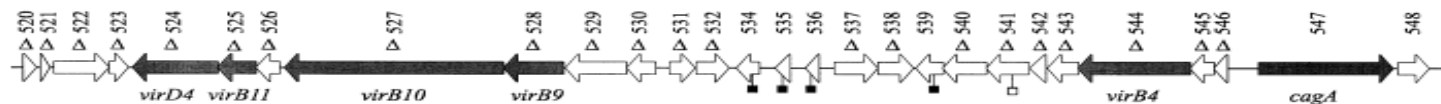
- Es un conjunto de 30 genes que configuran (isla de patogenicidad) relacionados con la inducción de reacción inflamatoria y cambios morfológico de las células de la mucosa gástrica**
- Sin embargo, se ha encontrado total o parcialmente ausente, aún en individuos con patología severa.**
- En algunas regiones, la mayoría de los aislamientos tienen *cag*-PAI total o parcialmente incompleta.**
- En consecuencia, su rol en la patogenia es controvertido.**

1) Investigar la coexistencia de distintos genotipos de cag-PAI en un mismo huésped.

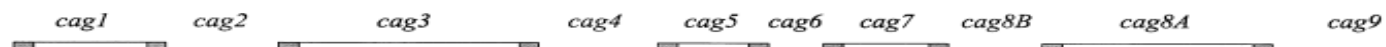
2) Demostrar de este modo, la microevolución genética adaptativa durante una colonización persistente.

- 1) **Análisis de *cag*-PAI: amplificación por PCR en todos los aislamientos de los genes *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagM* en la región *cag I*; *cagT*, HP0524, HP0527 en *cag II* y la región terminal izquierda (LEC). El criterio de selección de estos genes es cuatro de estos genes están ubicados en la región *cagI* : *cagA* (la proteína codificada es inyectada dentro de la célula huésped), *cagE*, *cagG* y *cagM* (inducen la secreción de IL-8). Dentro de la región *cagII* se encuentran ubicados *cagT*, HP0527 (*virB10*) y HP0524 (*virD4*).**
- 2) **Amplificación por PCR de “sitio vacío”**: demuestra ausencia total de la isla.
- 3) **Determinación de clonalidad intra-huésped: polimorfismo de *lspA*-*glmM* y RAPD-PCR.**

A



B



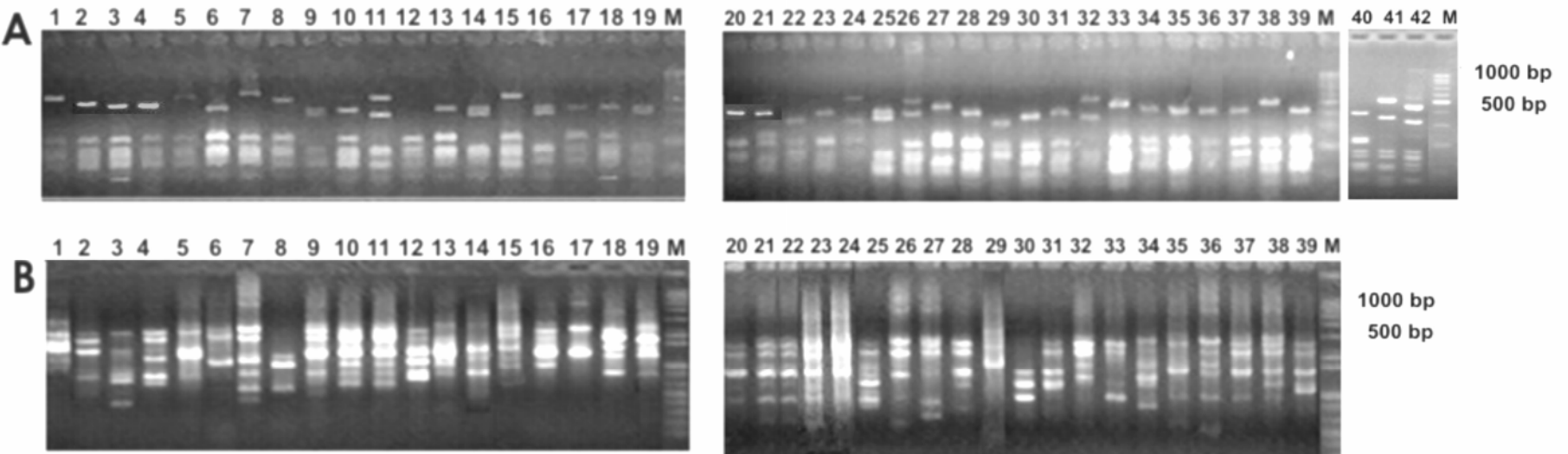
Análisis de aislamientos con idéntica delección de *cag*-PAI en todos los nichos.

Pacientes	N° de Biopsias positivas	Genotipo de <i>cag</i> -PAI	Tipo según <i>lspA-glmM</i>	Tipo según RAPD-PCR	Nichos (sitios de cada biopsia)					
					A1	A2	A3	C1	C2	C3
19F	6	E,G, M	V	V	+	+	+	+	+	+
32F	6	ORF13, ORF10	IX	IX	+	+	+	+	+	+
38C	6	A, G, M, T, ORF13, ORF10, LEC	XXXIV	XXXI	+	+	+	+	+	+
37F	6	AE	X	X	+	+	+	+	+	+

Variantes con diferentes genotipos de cag-PAI en distintos nichos.

Pacientes	N° de Biopsias	Genotipo de <i>cag</i> -PAI	Tipo según <i>lspA-glmM</i>		Tipo según RAPD-PCR						Nichos (sitios de cada biopsia)
58F	6	A, E, G, T, ORF10, LEC	XVII	XVI	+	+		+	+	+	
		A, E, G, ORF10, LEC	XVII	XVI				+			
8C	5	Intacta	XXII	XXI	+			+		+	
		A, E, G, T, ORF13, ORF10, LEC	XXII	XXI		+	+				
9C	6	"sitio vacío"	XXIII	XXI	+	+	+		+		
		"sitio vacío"/ A, E, M, T, ORF13, ORF10, LEC	XXIII	XXI					+		
		Intacta	XXIV	XXI							+
60F	4	Intacta	XVIII	XVII	+						
		sitio vacío	XVIII	XVII					+	+	+
63F	6	sitio vacío	XIX	XVIII	+	+	+				
		Intacta	XIX	XVIII					+	+	+

Patrones de Bandas obtenidos con *IspA-glmM* con *HhaI* y RAPD-PCR



Conclusión

- La coexistencia de variantes con diferentes genotipos de un probable factor de virulencia en un mismo huésped, indicaría la microevolución de Hp en la colonización crónica más que la evolución a una determinada enfermedad.

**♣ La investigación de la epidemiología
de la
infección causada por una
determinada especie**

DIVERSIDAD CLONAL

Una especie bacteriana está compuesta por diferentes clones. Un clon se define como el conjunto de bacterias que derivan de un ancestro en común, como resultado de una misma cadena de replicación. En sentido epidemiológico, el término

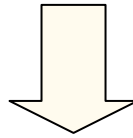
**CEPA BACTERIANA
es sinónimo de clon**

	Familia	Género	Especie	Subespecie	Cepa
Secuenciación de ADN					
MLST					
ARDRA					
tRNA-PCR					
ITS-PCR					
RFLP					
PFGE					
AFLP					
AP-PCR					
RAPD					
REP-PCR					

MLST: multilocus sequence typing, ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction analysis, tRNA-PCR: transfer RNA genes, ITS-PCR: Internal Transcribed spacer, RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, PFGE: Pulse Field Gel Electrophoresis, AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism. AP-PCR: Arbitrarily Primed, RAPD: Random Amplified DNA Polymorphism, REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindrome, PCR: Polimerase Chain Reaction

Estudio evolutivo de la población bacteriana

La genotipificación permite determinar la estructura genética intra-especie de una población bacteriana, utilizando un gran número de aislamientos de diferentes orígenes de determinadas especies.



Definir el nivel de similitud entre aislamientos perteneciente a un mismo clon, para identificar por ejemplo el “clon epidémico”, su reservorio y la(s) vía(s) de transmisión

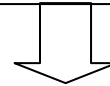
Estudio de la patogenicidad e historia natural de la infección

Establecer clones que causan colonización

**Identificación del origen de la infección
(endógena o exógena)**

Establecer vías de transmisión y reservorios

**Establecer si la emergencia de la resistencia se debe a la
diseminación de un determinado mecanismo en diferentes
clones o a la diseminación de un mismo clon con diferentes
mecanismos**

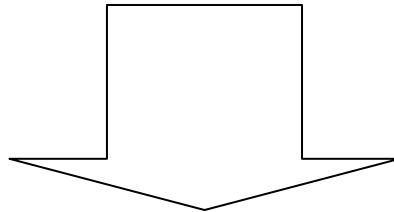


Estrategias de prevención

BROTE EPIDEMICO

Incremento temporáneo en la incidencia de la infección por un determinado patógeno

o alternativamente como un incremento temporal de la colonización con un determinado patógeno con o sin incremento en la morbilidad de la infección



Aumento de la velocidad de transmisión de un determinado patógeno

Multi-locus Sequencing Typing (MLST)

Se basa en la secuenciación de fragmentos internos de 450 pb de por lo menos 7 genes housekeeping gene para determinar presuntos alelos en cada uno de los 7

Core housekeeping genes: Estos genes son ubicuos dentro una determinada población bacteriana y codifican proteínas esenciales para el metabolismo central de la célula bacteriana. Generalmente estos genes evolucionan a una velocidad moderada

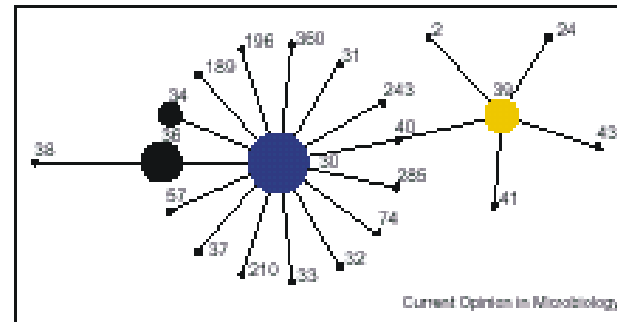
Las múltiples variantes alélicas se guardan en una base de datos central (<http://www.mlst.net>).



Estudio de la historia natural de la infección

Quando se guardan los alélos de los distintos genes el programa eBURST agrupa a los aislamientos en complejos clonales (CC).

Figure 1



eBURST diagram of the patterns of descent among members of *Staphylococcus aureus* clonal complex (CC) 30. Sequence type 30 (blue circle) represents the ancestral or founder strain type, which has given rise to descendant sequence type strains (black and yellow circles).

Current Opinion in Microbiology 2004, 7:308-313

Estos cc pueden revelar diferencias en los huéspedes de preferencia para cada uno de ellos y el MLST se puede para rastrear cc virulentos y la fuente de la infección en humanos, animales y el medio ambiente. Es un marcador de la estructura poblacional de una especie

Table 1

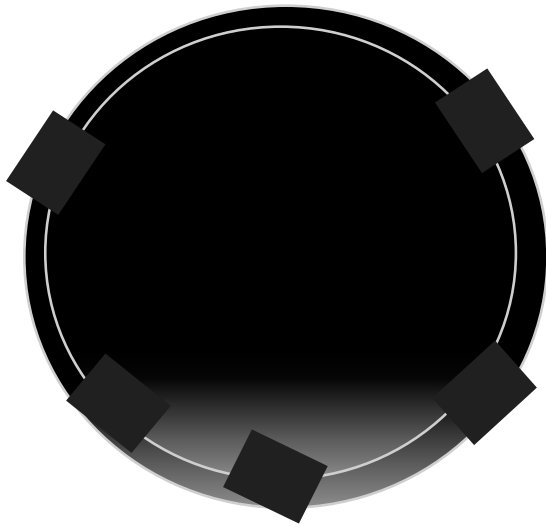
Details of currently available bacterial MLST databases.

Species	No. of isolates in MLST database	Reference
<i>Bacillus cereus</i>	122	[32]
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	208	[33]
<i>Campylobacter jejuni</i>	2218	[34]
<i>Escherichia coli</i>	515	Unpublished
<i>Enterococcus faecium</i>	137	[35]
<i>Haemophilus influenzae</i>	223	[36]
<i>Helicobacter pylori</i>	413	Unpublished
<i>Moraxella catarrhalis</i>	268	Unpublished
<i>Neisseria meningitidis</i>	4935	[15]
<i>Streptococcus agalactiae</i>	39	[37]
<i>Staphylococcus aureus</i>	1057	[38]
<i>Salmonella enterica</i>	227	Unpublished
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	67	[39]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2041	[40]
<i>Streptococcus pyogenes</i>	390	[41]

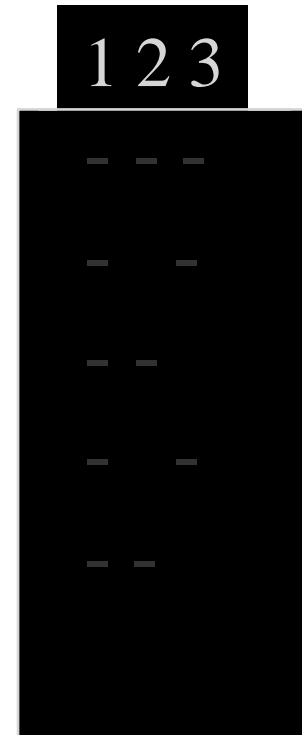
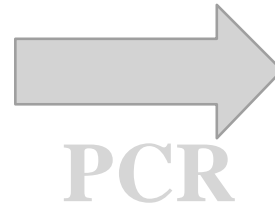
REP-PCR

REP1R-I : IIIICGICGICATCIG GC-3'

REP2-I: ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

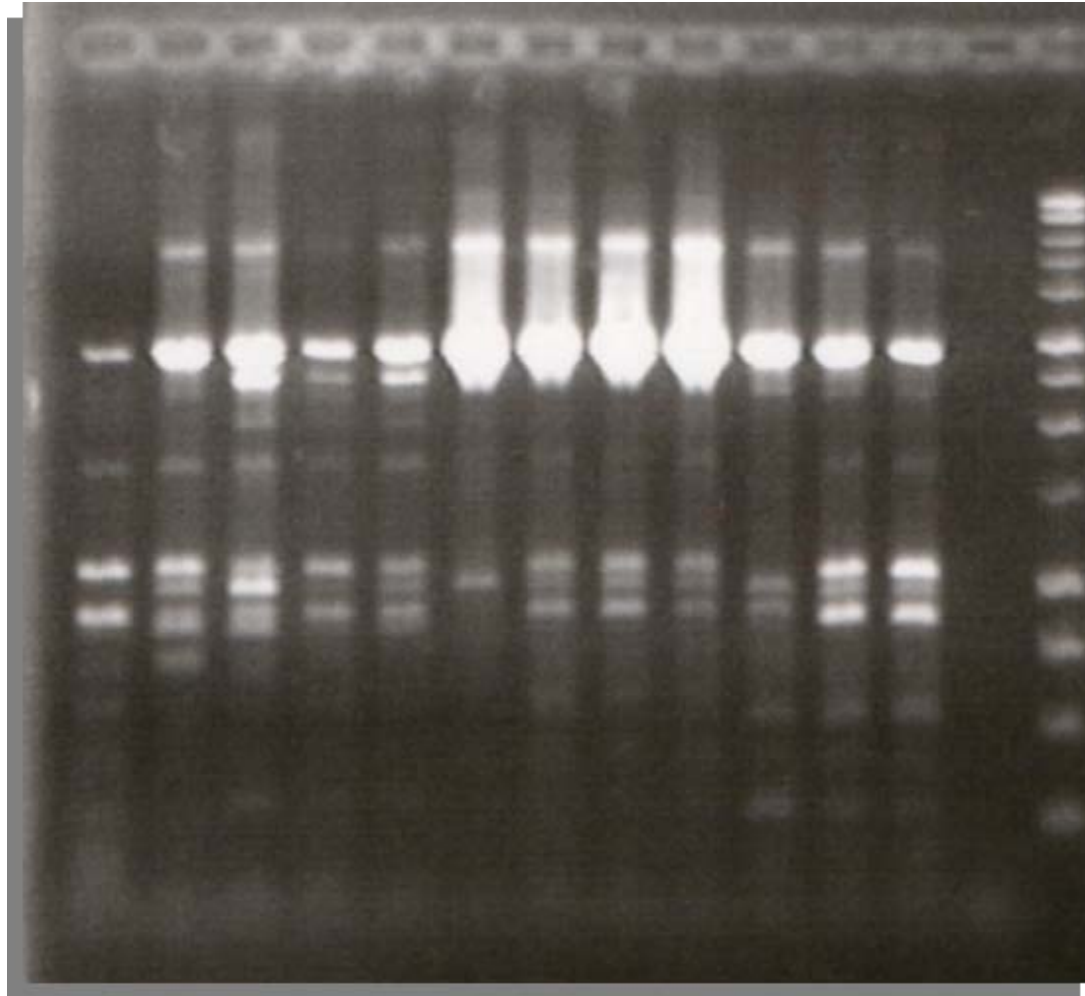


Cromosoma



Gel de Agarosa

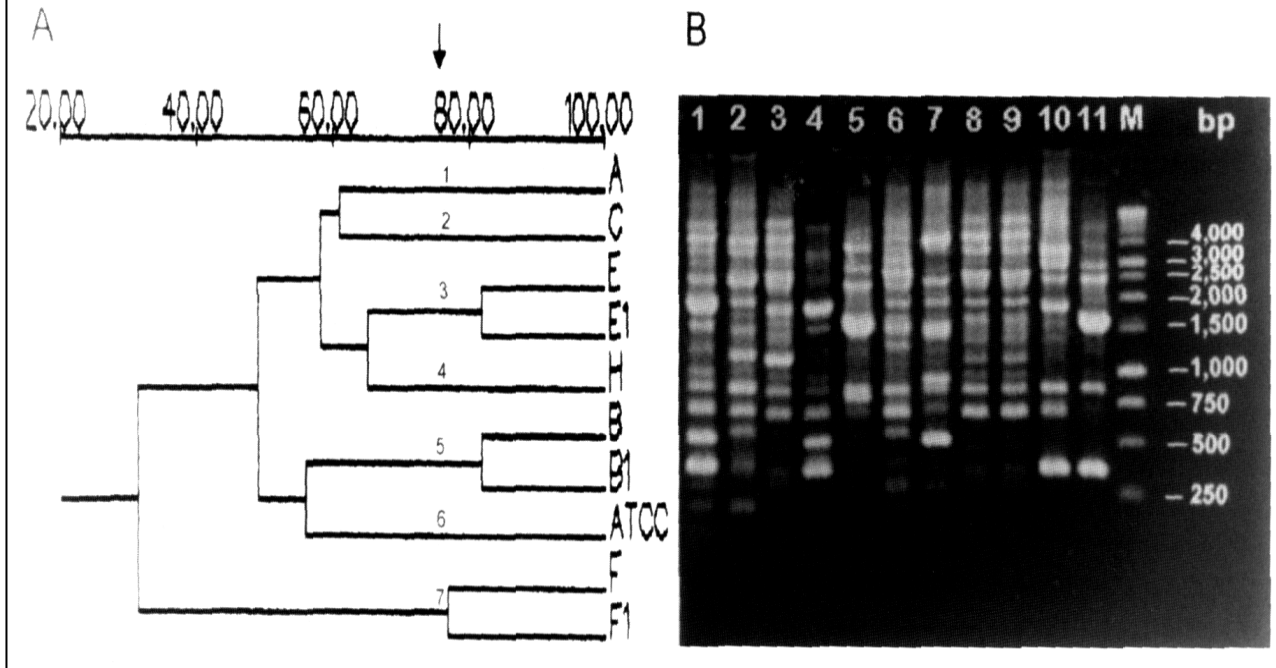
Aislamientos de *Helicobacter pylori* separados por diferentes clones mediante REP-PCR



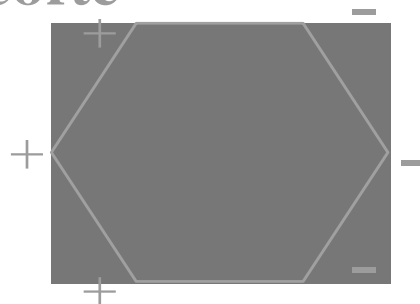
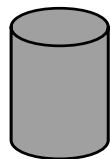
Acinetobacter baumannii- REP-PCR

220

L.S. Quelle and M. Catalano / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 39 (2001) 215-223

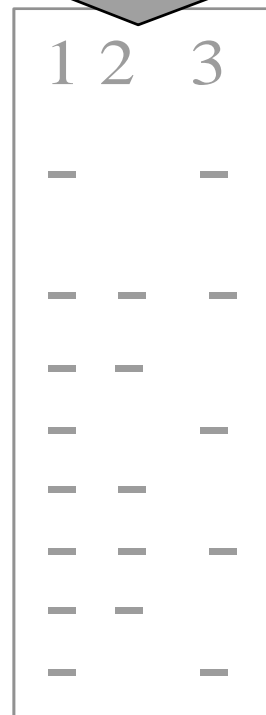
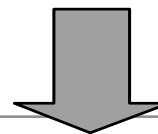


Cultivo



**Plug de agarosa
de bajo
punto de fusión**

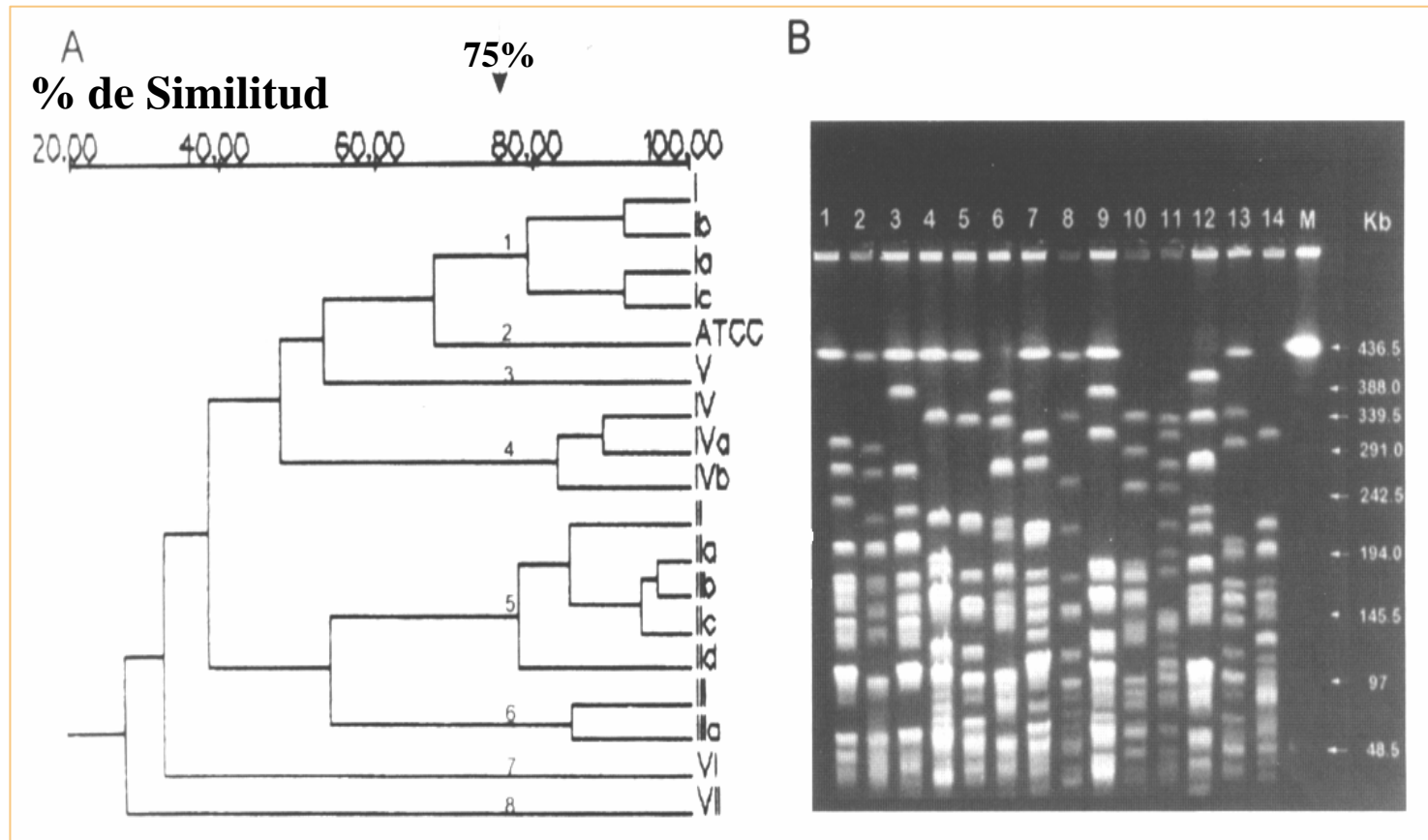
**Electroforesis de
campo pulsado**



Gel

PFGE o Macrorestricción

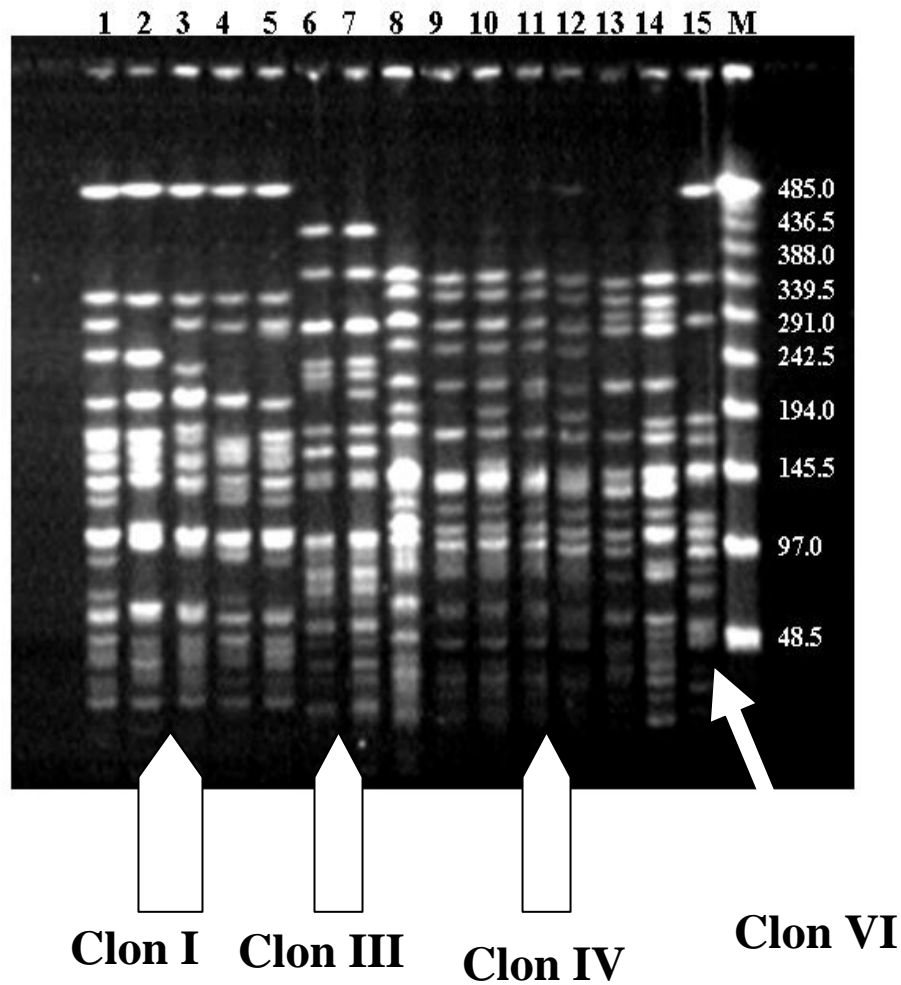
Acinetobacter bauamnnii Macrorestricción



Macrorestricción. Línea 1 genotipo I; Línea 2: genotipo Ia; Línea 3: genotipo Id; Línea 4: genotipo II; Línea 5: genotipo IIb; Línea 6: genotipo III; Línea 7: genotipo Ib; Línea 8: genotipo IIa; Línea 9: genotipo IId; Línea 10 genotipo V; Línea11: genotipo IVb; Línea12: IIIa; Línea13: genotipo VI; Línea 14: genotipo VII. M: Bacteriófago Lambda ladder DNA concatemeros.

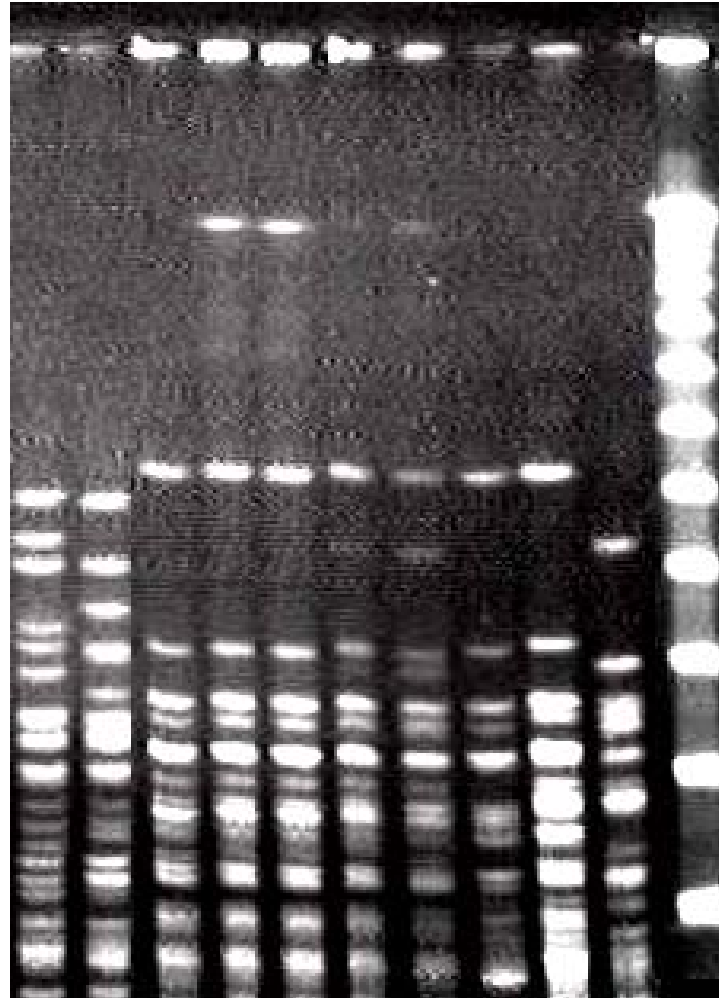
Acinetobacter baumannii

2000-2004



A. baumannii PFGE con *Sma*I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

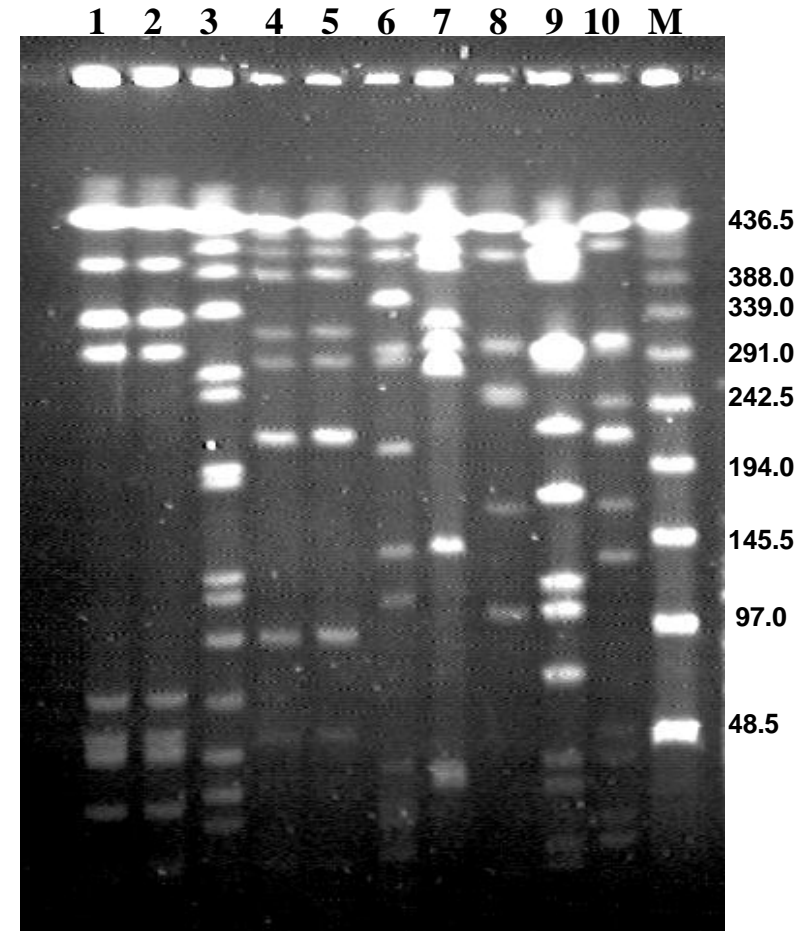
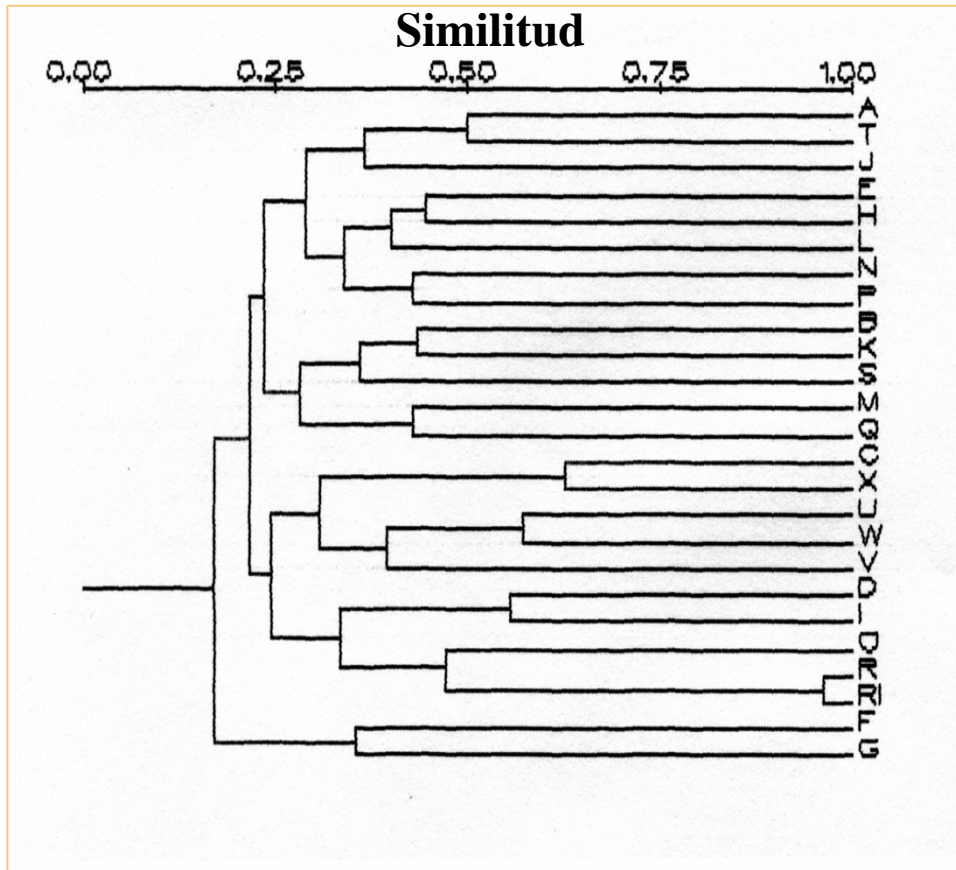


Líneas 1 y 2 clon I

Líneas 3-9 clon IV

Línea 10 clon VI

Stenotrophomona maltophilia

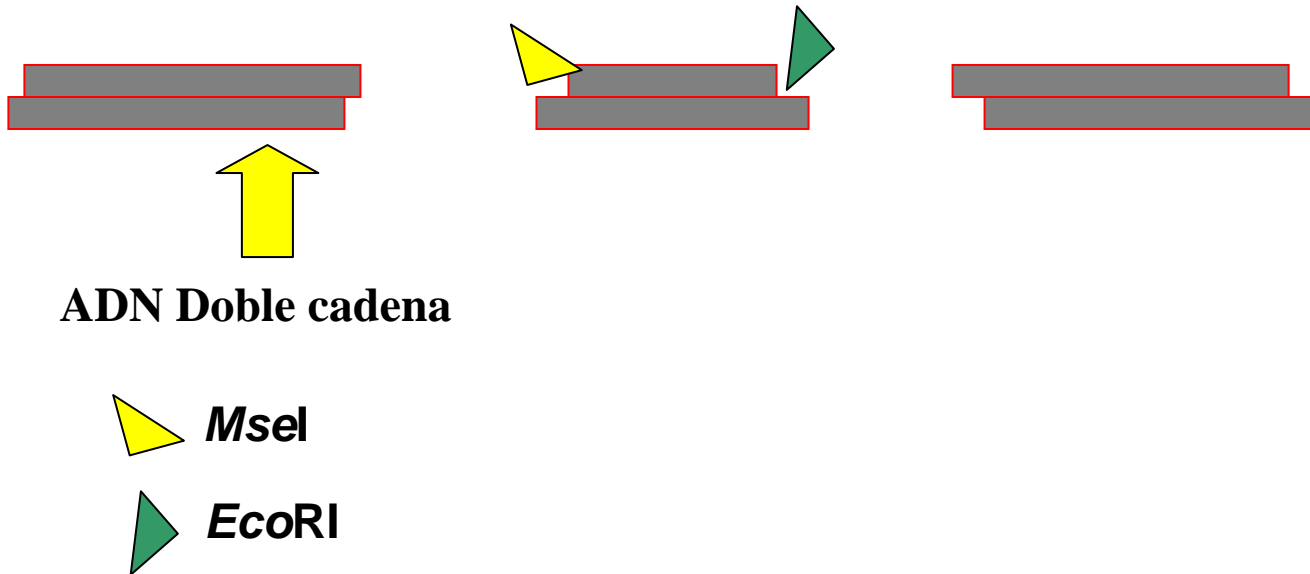


28 clones diferentes en 36 aislamientos alta diversidad clonal

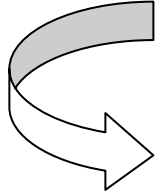
AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism

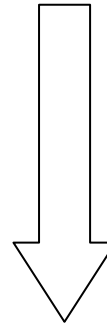
Primer paso: Generar fragmentos de restricción con una enzima de corte frecuente (*EcoRI*) y una enzima de corte poco frecuente (*MseI*)



ADN Doble cadena ya digerido



Ligar adaptadores
Doble cadena



 *EcoRI*

 *MseI*



Fragmentos-Tagged

Los adaptadores poseen 3 características:

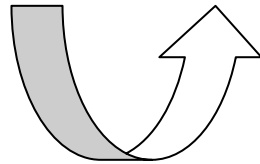
1. Ligado compatible con los sticky-end generados en la restricción
2. Eliminación de los sitios de restricción luego del ligado
3. Crea la secuencia templado para la subsiguiente amplificación

Adaptador

Fragmento

5'-CTCGTAGACTGCGTaTGCA
3' CATCTGACGCA_t

G...//...CTGCA
ACGTC..//.....G



Ligasa

5'-CTCGTAGACTGCGTaTGCA G]...//...CTGCA
3' CATCTGACGCA_t ACGTC..//.....G

5' GACTGCGTaTGCAGG

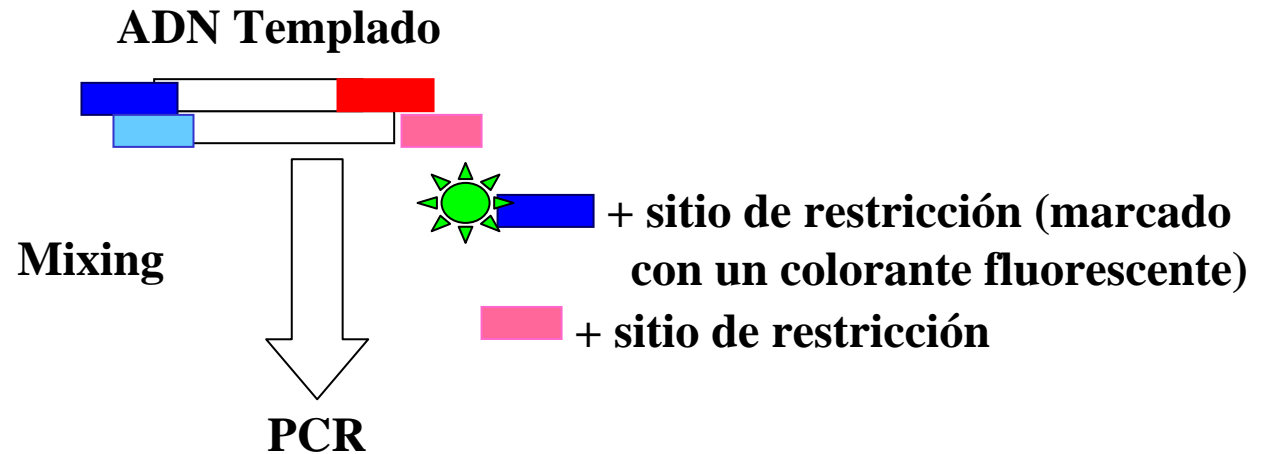
5' GACTGCGTaTGCAGGC ← **Cebadores (adaptador + sitio de restricción)**

5' GACTGCGTaTGCAGA

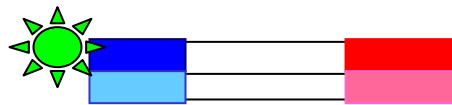
5' GACTGCGTaTGCAGAT

Las secuencias de los adaptadores sirven como los sitios de unión para cebadores para la subsecuente amplificación “selectiva”

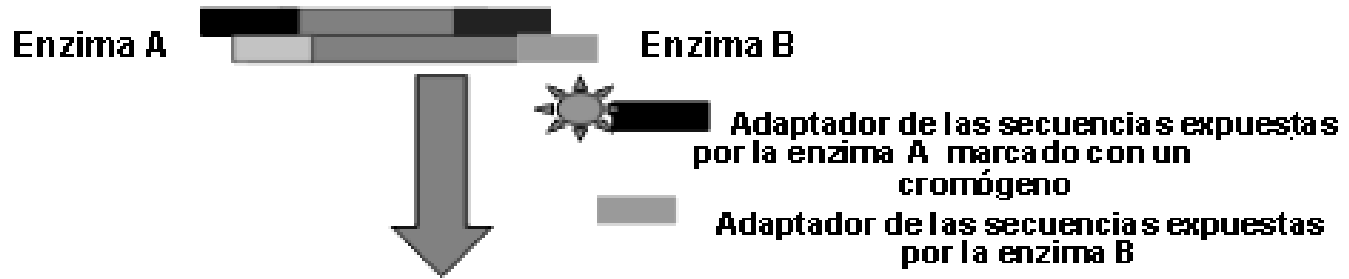
Aquí se deben probar diferentes cebadores hasta encontrar los que permiten mayor Discriminación entre los diferentes clones (mayor índice discriminativo)



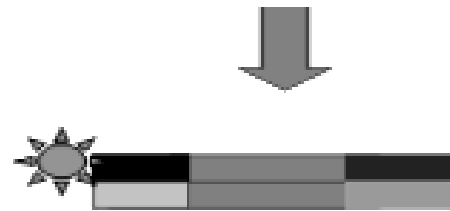
Solo los fragmentos que poseen adaptadores de las dos enzimas en cada extremo serán amplificados exponencialmente durante la PCR



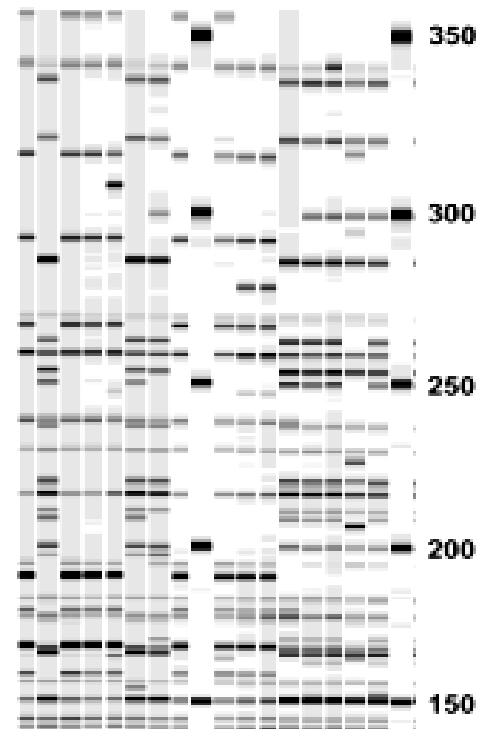
Fragmento Cortado por enzima A y enzima B



Reacción de ligado y PCR con cebadores cuyas secuencias son complementarias a los adaptadores de las enzimas A y B



Se amplifican en alto número de copias solamente los fragmentos cortados con ambas enzimas.
Se separan en geles de poliacrilamida en un secuenciador automático



Guía para la selección de Cebadores

EcoRI-0-FAM

MseI-CA

MseI-CC

MseI-CG

MseI-CT

EcoRI-A-FAM

MseI-A E faecalis vanco-R

EcoRI-C-NED

MseI-C

EcoRI-G-JOE

MseI-G

EcoRI-T-JOE

MseI-T A. baumannii

EcoRI-AA-JOE

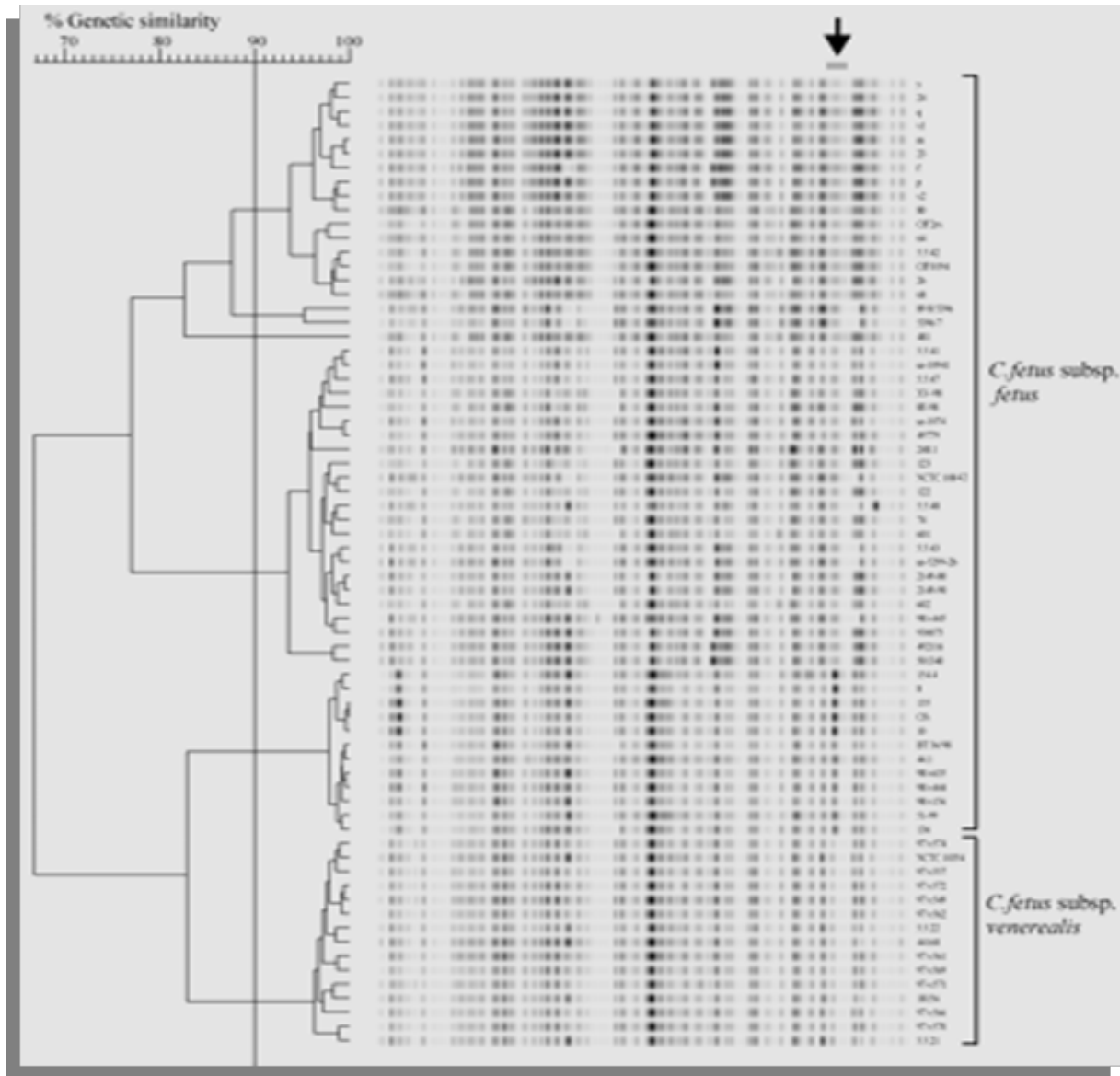
MseI-0

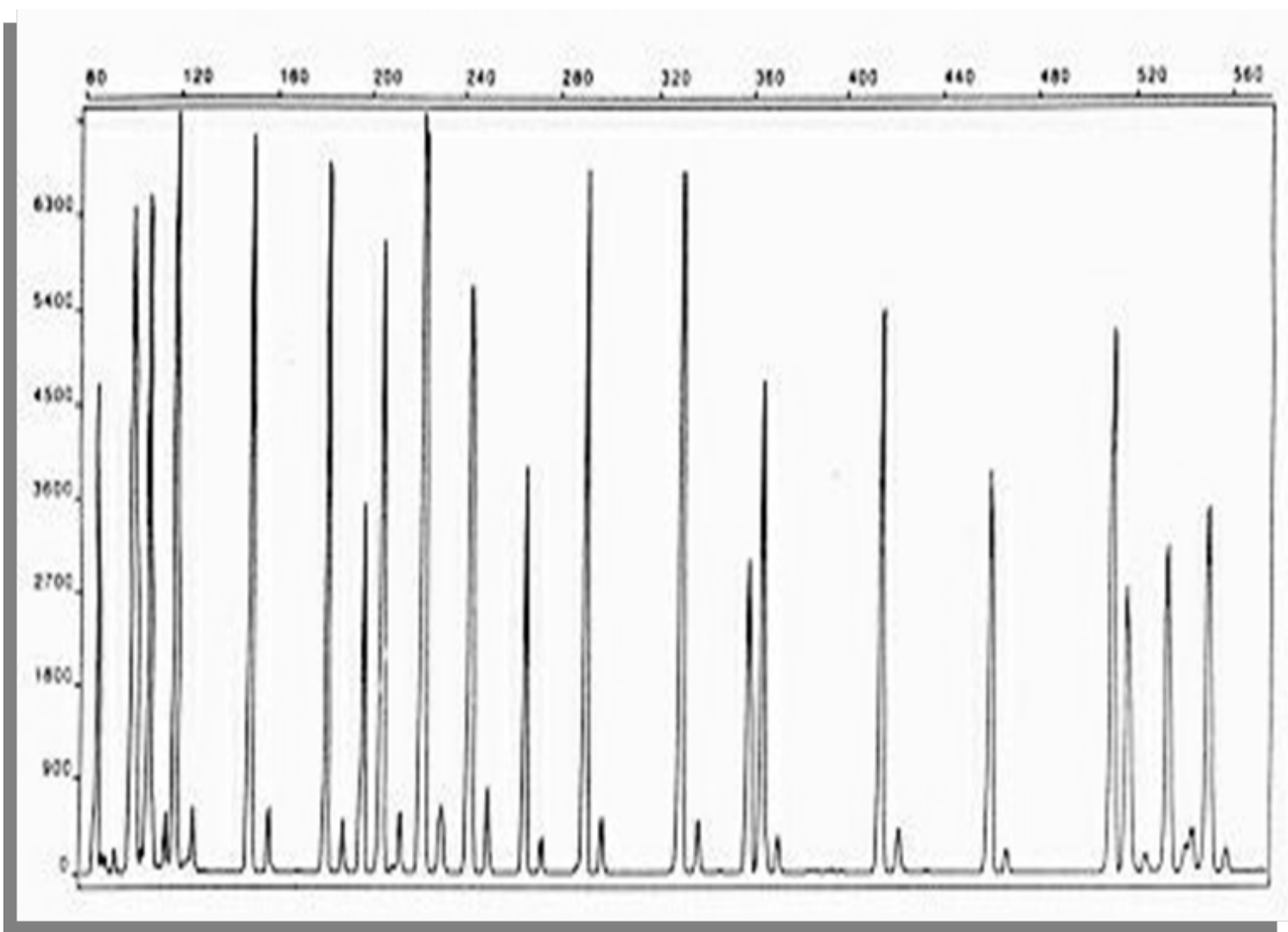
EcoRI-AC-FAM

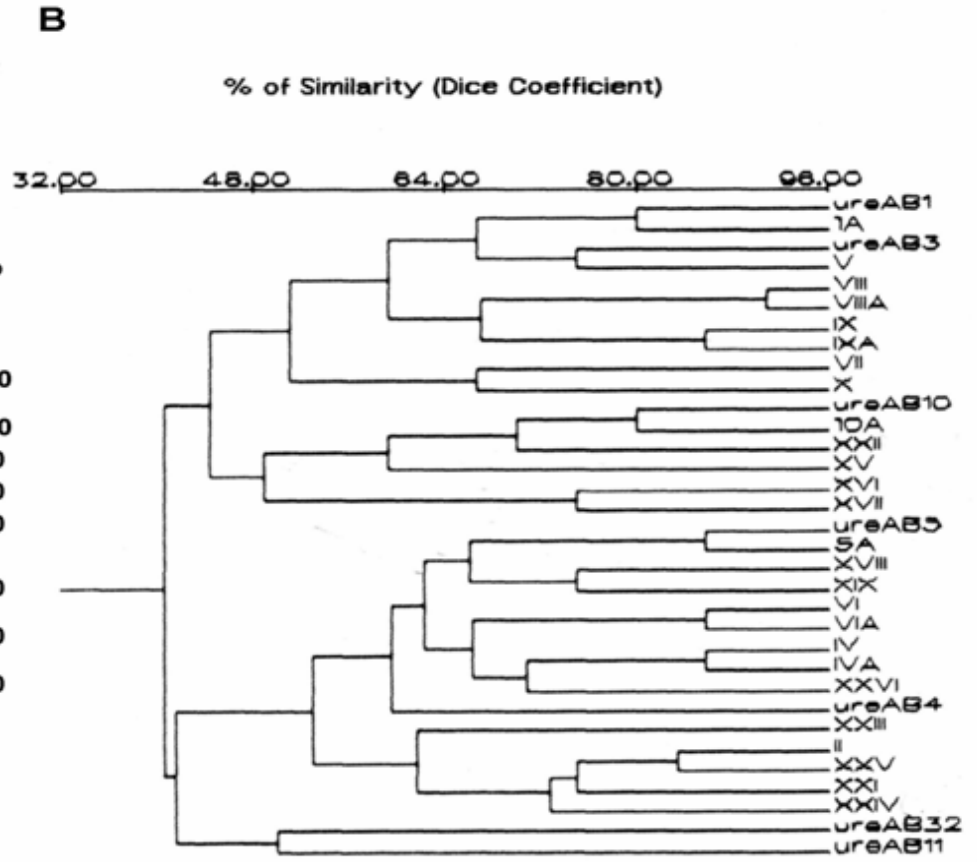
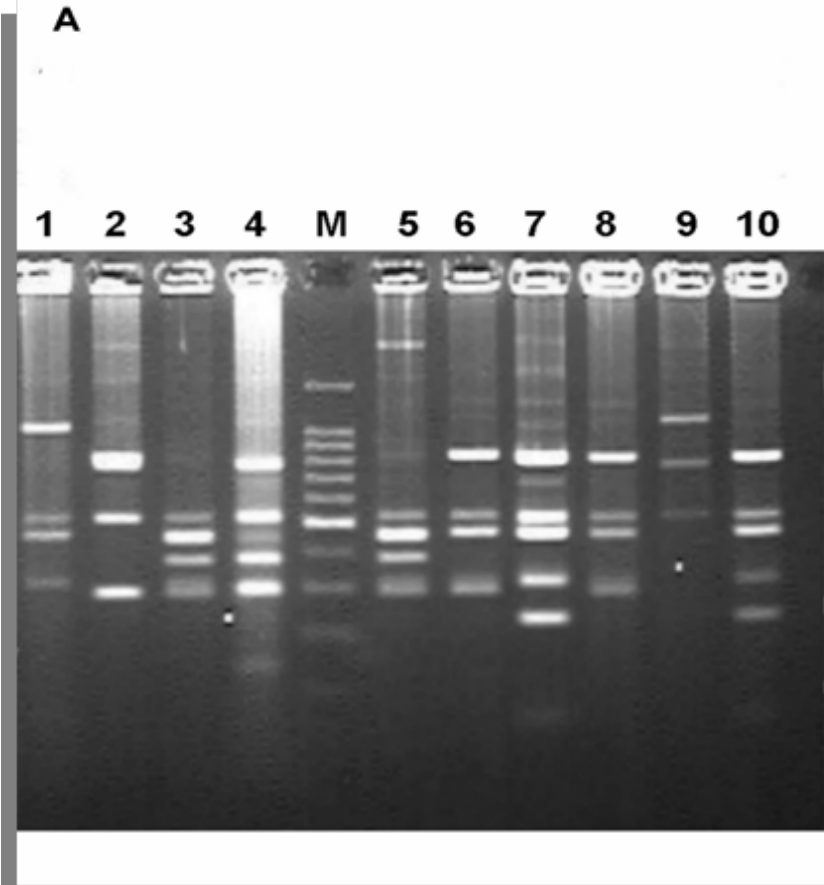
EcoRI-AG-JOE

EcoRI-AT-NED

ADLP



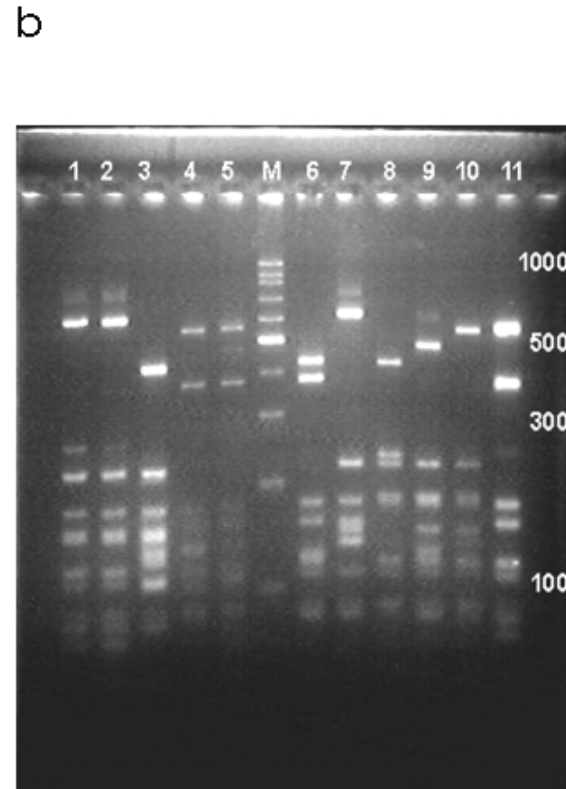
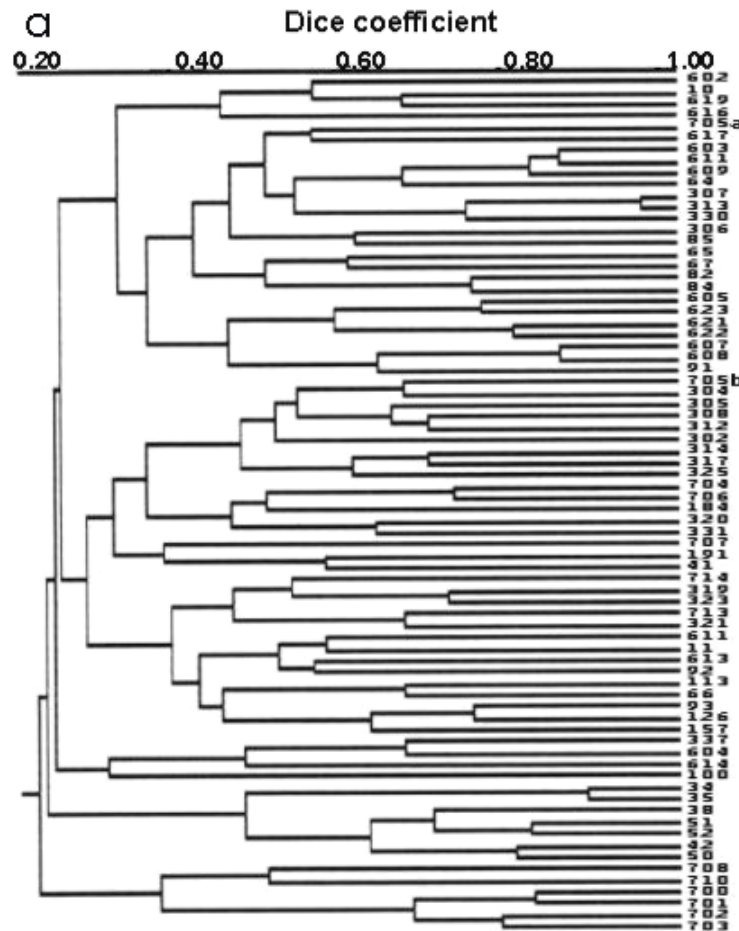




Se amplificó un segmento de 2.4 pb perteneciente a los genes *ureA-B* con posterior digestión con *HaeIII*

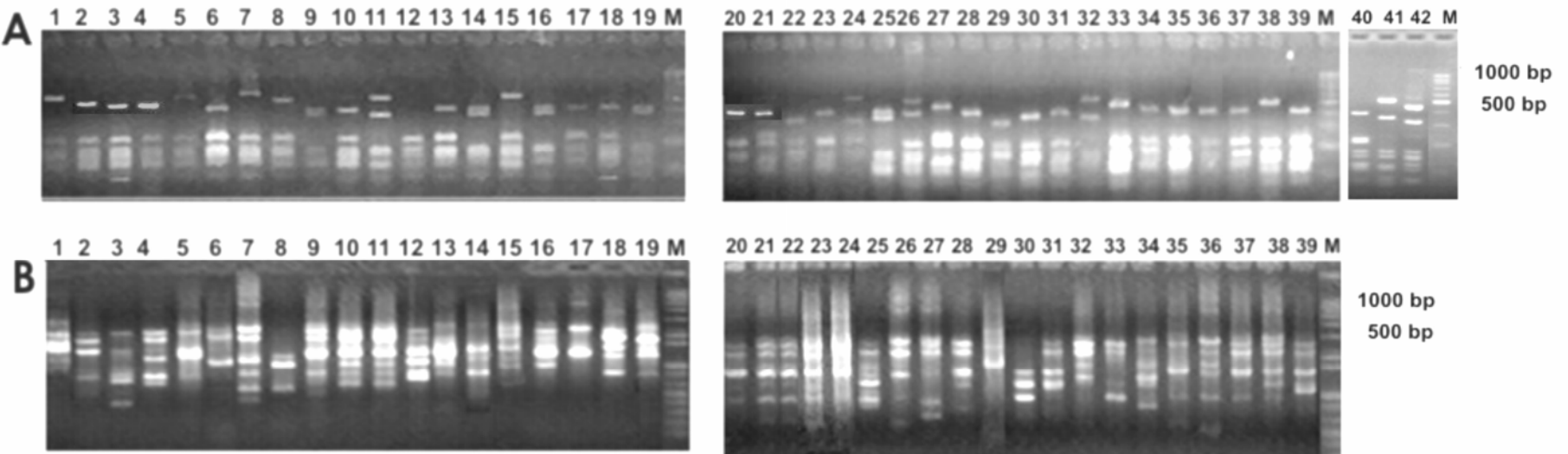
Se obtuvieron 24 perfiles diferentes, los más frecuentemente encontrados pertenecieron a los 10 perfiles descritos por Owen y distribuidos por todo el mundo

Polimorfismo de *lspA-glmM*



88 pacientes en 73 la similaridad entre los patrones de bandas fue de 20 a 78%

Patrones de Bandas obtenidos con *IspA-glmM* con *HhaI* y RAPD-PCR



**♣ La identificación de genes
de resistencia a los antimicrobianos**

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
jhp0888 MKPLDHEKRRQLLNERHSCKMFDSHYEFSSTLEEEIABIARLSPSSYNTQPWHFVMVTNKDLKKQIAAHSYFNEEMIKSA
HP0954   .....Q.....D.....
703S    .....Q.....
321S    .....Q.....E.....K.....
306S    .....Q.....I.....
617S    .....Q.....I.....
614S    .....Q.....
325S    .....Q.....E.....
9C3S    .....Q.....C.....V.....
12A3S   .....Q.....
12C1S   .....Q.....
12C3S   .....Q.....
703R    .....Q.....TNCSAQL.Q*
321R    .....Q.....E.....K.....
306R    .....Q.....S.....
617R    .....Q.....E.....TNCSAQL.*
614R    .....Q.....
325R    .....Q.....H.....E.....
9A1R    .....Q.....
12A2R   .....Q.....
12A3R   .....Q.....
12C1R   .....Q.....
12C3R   .....Q.....A.....

```

```

      90      100     110     120     130     140     150     160
jhp0888 SALMVVCSLKPSELLPTSHYMQLNLYPESYKVRVIPSFAQMLGVRFNHSMQKLESYILEQCYYIAVGQICMGVSLMGLDSCI
HP0954   .....R.....HG.....R.....
703S    .....R.....HG.....
321S    .....R.....G.....T.....R.....
306S    .....R.....R.....K.....
617S    .....R.....R.....K.....
614S    .....R.....HG.....V.....R.....
325S    .....R.....HG.....
9C3S    .....R.....HG.....
12A3S   .....R.....HG.....R.K.....
12C1S   .....R.....HG.....R.....
12C3S   .....R.....HG.....R.....
321R    .....R.....G.....T.....R.....RCGANLHGRELNGIG*
306R    .....R.....YG.....R.....
614R    .....R.....HG.....L.....TI.....R.....Y.....
325R    .....R.....HG.....
9A1R    .....R.....G.....
12A2R   .....R.....HG.....S.....RI.....
12A3R   .....R.....HG.....S.....R.....N.IG*
12C1R   .....R.....HG.....I.....I.....R.....IMGLDSC
12C3R   .....R.....HG.....I.....R.....

```

```

      170     180     190     200     210
jhp0888 IGGFDPLKVGEBILEBRINKPKIVCLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL
HP0954   .....V.....A.....Q.....
703S    .....V.....A.....Q.....*
321S    .....V.....A.....Q.....*
306S    .....V.....A.....Q.....*
617S    .....V.....A.....Q.....*
614S    .....V.....A.....Q.....*
325S    .....V.....A.....Q.....*
9C3S    .....V.....A.....Q.....*
12A3S   .....V.....A.....Q.....*
12C1S   .....V.....A.....Q.....*
12C3S   .....V.....A.....Q.....*
306R    .....V.....A.....Q.....*
614R    .....V.....A.....Q.....*
325R    .....V.....A.....Q.....*
9A1R    .....V.Q.....A.....S.....Q.....A.....*
12A2R   .....D.....V.....A.....Q.....*
12C1R   .....I.GFDPLKVGVL.EBRINKPKIACLIALGKRVAEASQKSRKSKVDAITWL*
12C3R   .....V.....A.....Q.....*

```

RdxA

NADPH-

nitroreductasa

FrxA NADPH flavin oxidoreductasa

```

          10          20          30          40          50          60          70          80
HP0642.  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
jhp0586  .....II...  .....T...  .....E...  .V.....  .....  .....  .....G..SS.....
306S     .....
306R     .....
614S     .....
AY56833  .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.D*
614R     .....I...  .....NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.D*
617S     .....I...  .....NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.D*
617R     .....I...  .....NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.D*
703S     .....      .NTI  LIVVPLK.IG  KLWLKW.D*
703R     .....      .NTI  LIVVPLK.IG  KLWLKW.D*
12A2R    .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
12A3S    .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
12A3R    .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
12C1S    .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
12C1R    .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
12C3S    .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
12C3R    .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
9C3S     .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
9A1R     .....      .NTI  LIVVFPKRIG  KLWLKW.G*
325S     .....IV..  .....
325R     .....IV..  .....
321S     .....
321R     .....
          90          100         110         120         130         140         150         160
HP0642.  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
jhp0586  VIYLARKGVT  YSDYVKKVM  HEVKRKYDPT  NSRFAQIIKN  FQENDMKLNS  ERSLFDWASK  QTYIQMANMM  MAAAMLGIDS
306S     .....
306R     .....
614S     .....
          170         180         190         200         210
HP0642.  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
jhp0586  CPIRGYDQEK  VEAYLEEKGY  LNTAEFGVSV  MACPGYRNQE  ITPKTRWKE  VIYEVIE*
306S     .....
306R     .....
614S     .....
          .....S.....  .....G...*
          .....G...*
          .....G...*

```

Table 1
lspA-glmM restriction fragment length polymorphism profile, minimum inhibitory concentration (MIC), and *rdxA* and *frxA* alleles of the 21 *Helicobacter pylori* isolates from patients with heteroresistance to metronidazole (MTZ)

Isolates	<i>lspA-glmM</i> profile	MIC (mg/L)	<i>rdxA</i> gene ^a		<i>frxA</i> gene ^b	
			Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence
703S ^c	A	2	–	–	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
703R	A	128	Frameshift, insertion of A at position 193	Stop codon at position 74	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
321S ^c	B	1	–	–	Frameshift, deletion of T at position 215	Stop codon at position 74
321R	B	128	Frameshift, deletion of AT at positions 424–425	Stop codon at position 157	Frameshift, deletion of T at position 215	Stop codon at position 74
617S ^c	C	0.5	–	–	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
617R	C	128	Frameshift, insertion of A at position 193	Stop codon at position 73	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
614S ^c	D	1	–	–	Missense, A → T (376), CATG → TCAA (462–465), A → G (641)	Met → Leu (126), Met → Gln (155), Glu → Gly (214)
614R	D	16	Missense, deletion of A at position 377; insertion of T at position 381; G → A at position 476	Asn → Thr (126); His → Ile (127); Cys → Tyr (159)	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
325S ^c	I	0.25	–	–	Nonsense, G → A at position 203	Trp → stop codon at position 68
325R	I	16	Missense, G → A at position 46	Arg → His (16)	Nonsense, G → A at position 203	Trp → stop codon at position 68
12A3S ^c	E	0.5	–	–	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
12A3R	E	64	Frameshift, insertion of A at position 461	Stop codon at position 158	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
12C1S ^c	E	0.5	–	–	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
12C1R	E	32	Missense, insertion of ATA at positions 460–462	Insertion of Ile at position 154	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
12C3S ^c	E	1	–	–	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
12C3R	E	32	Missense, AA → CC at positions 95–96	Glu → Ala (32)	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
12A2R	E	32	Missense, G → A at position 488	Gly → Asp (163)	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
306S ^c	B1	0.5	–	–	Missense, CATG → TCAA (462–465), A → G (641)	Met → Gln (155), Glu → Gly (214)
306R ^d	F	16	Missense, C → T at position 151	Pro → Ser (51)	Missense, G → T at position 469	Gly → Trp (157)
9C3S ^c	G	1	–	–	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39
9A1R ^d	H	32	Missense, G → A at position 565	Gly → Ser (189)	Frameshift, deletion of A at position 54	Stop codon at position 39

-El análisis comparativo de las secuencias del gen PLP-1A mostró dos mutaciones puntuales en los aislamientos AMX-R:

- 1) C1667G (cambio de treonina por serina en el aminoácido 556 (dentro del tercer motivo de unión a penicilina);
- 2) T1911G (codón stop en posición 637)

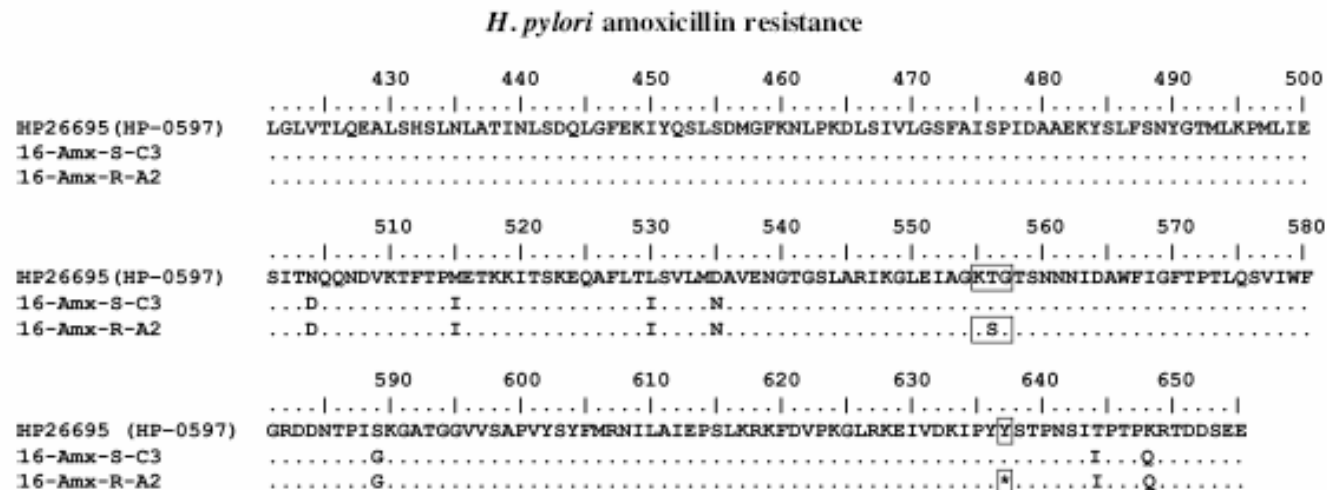


Figure 2. PBP-1A amino acid sequences in paired susceptible and resistant isolates. Partial sequence of 3' end *pbp-1A* gene, differences between susceptible and resistant isolates are indicated by boxes (GenBank accession numbers EF583173 and EF583174, respectively). HP26695 reference strain (GenBank accession number AF000511). 16-Amx-S-C3: amoxicillin-susceptible isolate recovered from one corpus biopsy; 16-Amx-R-A2: amoxicillin-resistant isolate recovered from one antral biopsy.

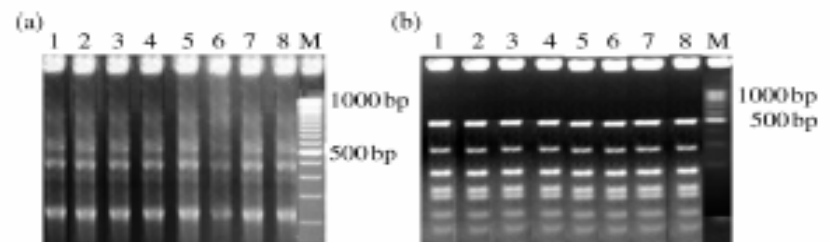


Figure 1. RAPD-PCR (a) and *lspA-glmM*-RFLP (b) profiles of susceptible and resistant isolates obtained from a single patient. Lanes 1–3, different amoxicillin-susceptible isolates recovered from two antral biopsies (expansion of single colonies, see Materials and methods); lanes 4–6, amoxicillin-susceptible isolates recovered from two corpus biopsies; lanes 7, amoxicillin-resistant isolate recovered from one antral biopsy; lane 8, amoxicillin-resistant isolate recovered from one corpus biopsy. M: 100 bp ladder.

Resumiendo

- El análisis de las técnicas como hibridación ADN-ADN y la secuenciación del gen 16S rADN juega un rol importante en la definición de especies. Métodos más aplicables desde el punto de vista clínico incluyen análisis de grupos de genes como los operones *rrn* (ribotipificación considerando 16S, 23S y 5S, o un gen individual (16S rADN mediante ARDRA), o el análisis del gen *recA*, o de secuencias intragénicas entre 16S-23S-rADN.
- MLST permite determinar la variabilidad dentro de la población de una especie, y la manera que los clones que la forman evolucionan en el tiempo. Define complejos clonales estables de manera de permitir el rastreo de linajes hipervirulentos/multiresistentes.

- **La determinación de la relación genética entre aislamientos de una misma especie puede realizarse mediante métodos cuyo blanco es el genoma total (AFLP, RAPD, Rep-PCR, PFGE). Estos métodos dan idea de una evolución más rápida que el MLST y son útiles para estudios en corto período de tiempo que puedan resolver situaciones epidémicas.**
- **La genotipificación también incluye el análisis de genes hipervariables que pueden no ser ibícuos dentro de la población una especie (gen *cagA* en *H. pylori*), e incluyen proteínas de superficie que interactúan con el huésped o que codifican otros factores de virulencia (*vacA*, *ureAB*). Generalmente evolucionan a una muy alta velocidad. Este análisis permite relacionar determinados alelos con el tipo de infección o con la gravedad de la misma.**
- **Para la identificación de genes de virulencia que caracterizan determinados clones de una especie.**