

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño de una prueba molecular diagnóstica para la
diferenciación de nueve especies bacterianas más
frecuentes en infecciones nosocomiales de UNICAR

Trabajo de graduación presentado por

Mónica Gabriela Villatoro Camas

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala

2014

Diseño de una prueba molecular diagnóstica para la diferenciación de nueve especies bacterianas más frecuentes en infecciones nosocomiales de UNICAR

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño de una prueba molecular diagnóstica para la diferenciación de nueve especies bacterianas más frecuentes en infecciones nosocomiales de UNICAR

Trabajo de graduación presentado por


Mónica Gabriela Villatoro Camas

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala


2014

Vo.Bo.:


(f) 

(Lic. Elena Dardón)

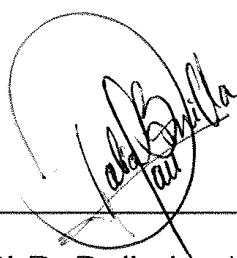
Tribunal Examinador:

(f) 

(Lic. Elena Dardón)

(f) 

(MSc. Lucía Nitsch)

(f) 

(PhD. Dalia Lau)

Fecha de aprobación: Guatemala, 20 de Junio del 2014

PREFACIO

Este trabajo de graduación inició como parte del proyecto FODECYT “Desarrollo de pruebas moleculares para la detección de bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR”, que a su vez forma parte de la propuesta para la implementación de la unidad de vigilancia de bacterias resistentes emergentes en UNICAR – UVIBACT-. La fase inicial, realizada en este trabajo, consistió en seleccionar una prueba molecular que permitiera la detección de una bacteria en 24 horas, reduciendo también el costo del análisis que actualmente se hace en casos de que pacientes pediátricos del intensivo de UNICAR contraigan una infección nosocomial. En general, este trabajo es solamente el inicio de un largo proyecto que busca aliviar un problema real del país.

Después de considerar diversas técnicas, se seleccionó el polimorfismo de cadena sencilla (SSCP, por sus siglas en inglés), a la cual se le realizaron los primeros análisis para evaluar su factibilidad como prueba diagnóstica; de manera que la siguiente fase consistirá en optimizar y validar su uso en muestras clínicas.

Durante la fase experimental, el mayor obstáculo enfrentado fue la alta contaminación del área de trabajo, lo cual dio inicio a varias reformas dentro del laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, para asegurar un ambiente apto para llevar a cabo las pruebas. Por otro lado, este inconveniente hizo reconsiderar la importancia de construir un laboratorio adecuado en las instalaciones de UNICAR, donde a futuro se realizarán los análisis a muestras clínicas.

Dada la magnitud del proyecto al que pertenece este trabajo de graduación, existen múltiples personas involucradas a las que quisiera agradecer por su apoyo. En primer lugar a mis padres, por su ayuda económica para la realización de la fase experimental, y por supuesto, por su amor, apoyo y paciencia, durante toda mi carrera universitaria. También quiero agradecer por los consejos y la paciencia a mi asesora de tesis, Licenciada Elena Dardón y a la Doctora Dalia Lau. Además, a mi directora de departamento, Licenciada Lucía Nitsch, principalmente por su confianza al incluirme en este proyecto que tanto me ha dejado. A Andrés Grajeda por su

apoyo en la primera etapa del proyecto; a mis amigos Miguel Morales e Ingrid Schrei por hacer de la adecuación del laboratorio, una experiencia más agradable.

A mis amigos, José David, Erick, David, Diego, Marie, y nuevamente Miguel, por su compañía en estos últimos años de vida universitaria. A todo el personal del departamento de Bioquímica y Microbiología, pero en especial a la Doctora Krisztina Rios por su cariño y apoyo.

También quiero agradecer a cada una de las personas que con una llamada, un mensaje o con una palabra, me animaron a seguir durante las dificultades que encontré a lo largo de las múltiples propuestas de investigaciones que realicé; por supuesto, mi eterno agradecimiento a las familias Villatoro Arrecis y Villatoro Álvarez, por su ayuda en los momentos más críticos de esta última etapa.

Por último, quiero dedicar este triunfo alcanzado a Dios, que de una u otra manera me trajo al lugar al que pertenezco, con la intercesión de mi Madre María; y por supuesto esto es por y para mi familia Villatoro Camas (los 9).

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| PREFACIO | vi |
| LISTA DE CUADROS..... | x |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| RESUMEN..... | xii |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. OBJETIVOS | 2 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 3 |
| IV. MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| A. INFECCIONES NOSOCOMIALES | 4 |
| 1. Factores de riesgo)..... | 4 |
| 2. Impacto económico y social en Guatemala..... | 5 |
| 3. Infecciones nosocomiales comunes..... | 5 |
| B. BACTERIAS ASOCIADAS A INFECCIONES NOSOCOMIALES | 7 |
| C. TÉCNICAS CONVENCIONALES MICROBIOLÓGICAS..... | 14 |
| D. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS | 16 |
| 1. Bioinformática | 16 |
| 2. Reacción en cadena de la polimerasa..... | 16 |
| 3. Polimorfismo de conformación de cadena sencilla..... | 18 |
| V. MÉTODOS | 19 |
| A. HIPÓTESIS..... | 19 |
| B. PROCEDIMIENTO | 19 |
| VI. RESULTADOS | 23 |
| A. PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y TINCIONES PARA LA CONFIRMACIÓN DE LAS BACTERIAS UTILIZADAS | 23 |
| B. SELECCIÓN DEL MÉTODO | 23 |

| | | |
|-------|--|----|
| C. | EXTRACCIÓN DE ADN..... | 28 |
| D. | DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS POR PCR-SSCP | 30 |
| VII. | DISCUSIÓN..... | 40 |
| A. | SELECCIÓN DEL MÉTODO | 40 |
| B. | EXTRACCIÓN DE ADN..... | 41 |
| C. | DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS POR PCR-SSCP | 42 |
| VIII. | CONCLUSIONES..... | 45 |
| IX. | RECOMENDACIONES | 46 |
| X. | BIBLIOGRAFÍA..... | 47 |
| XI. | ANEXOS..... | 54 |
| A. | SECUENCIAS FASTA DEL GEN 16S ARNr DE LAS 10 BACTERIAS UTILIZADAS..... | 54 |
| B. | ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL GEN 16S ARNr DE LAS 10 BACTERIAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO | 60 |
| C. | ENZIMAS DE RESTRICCIÓN | 69 |
| D. | CUANTIFICACIÓN DE ADN..... | 71 |
| E. | PCR <i>in silico</i> | 72 |
| F. | GELES DE AGAROSA CON DIFERENTES CONDICIONES..... | 73 |
| G. | ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL GEN 16S ARNr DE LAS 10 BACTERIAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO AMPLIFICADAS CON LOS INICIADORES Com1 y Com2..... | 74 |
| H. | ACONDICIONAMIENTO DE INSTALACIONES..... | 77 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Síntomas y diagnóstico de las infecciones nosocomiales más comunes. | 6 |
| Cuadro 2. Porcentajes de bacterias asociadas a las infecciones nosocomiales más comunes, durante la vigilancia de unidades de cuidado intensivo por parte del Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales, 1986-2003 | 8 |
| Cuadro 3. Bacterias reportadas con mayor frecuencia, asociadas a infecciones más comunes | 13 |
| Cuadro 4. Pruebas microbiológicas utilizadas para identificar bacterias asociadas a las infecciones nosocomiales más comunes, y sus resultados. | 15 |
| Cuadro 5. Análisis general para la selección del método a utilizar para la diferenciación de las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR..... | 24 |
| Cuadro 6. Iniciadores considerados para PCR múltiple, para el primer grupo de bacterias..... | 26 |
| Cuadro 7. Tamaño de fragmentos originados por enzimas de restricción que digieren dos sitios, en al menos seis bacterias utilizadas en este estudio. | 27 |
| Cuadro 8. Información de iniciadores para la amplificación de un segmento del gen 16SARNr | 30 |
| Cuadro 9. Formación de estructuras de lazo y su ΔG para los seis iniciadores | 31 |
| Cuadro 10. Análisis de la formación de homodímeros y heterodímeros para los iniciadores Com1 y Com2..... | 31 |
| Cuadro 11. Análisis de la formación de homodímeros y heterodímeros para los iniciadores ER10 y ER11..... | 31 |
| Cuadro 12. Análisis de la formación de homodímeros y heterodímeros para los iniciadores P11P y P13P..... | 32 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Proceso general de la reacción en cadena de la polimerasa..... | 17 |
| Figura 2. Esquema general sobre la técnica SSCP | 18 |
| Figura 3. Alineamiento de secuencias del gen 16S ARNr, para el diseño de iniciadores. Se muestra parte del alineamiento. | 25 |
| Figura 4. Extracción de ADN por método de ebullición, para las 10 bacterias utilizadas en este estudio | 29 |
| Figura 5. Extracción de ADN en duplicado por lisis con microondas para las 10 bacterias utilizadas en este estudio. | 30 |
| Figura 6. Amplificación para las 10 bacterias con los tres sets de iniciadores a una concentración de 1uM y temperatura de anillamiento a 55°C..... | 33 |
| Figura 7. Amplificación para bacterias seleccionadas con concentración de iniciadores de 0.5uM, y temperatura de anillamiento a 55°C. | 34 |
| Figura 8. Amplificación de blancos con concentración de iniciadores a 0.5uM, temperatura de anillamiento a 55°C, con nuevas mezclas de reacción comerciales | 35 |
| Figura 9. Amplificación de blancos con concentración de iniciadores a 0.5uM, temperatura de anillamiento a 55°C, preparados en laboratorio ajeno al trabajo con bacterias, y sus reactivos..... | 36 |
| Figura 10. Amplificación de blancos con nuevas alícuotas de iniciadores a 0.5uM, temperatura de anillamiento a 55°C, preparados en un laboratorio ajeno al trabajo con bacterias, y sus reactivos (A) y preparados con mezclas de reacción comerciales en el laboratorio original (B) | 36 |

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales cobran la vida de muchas personas; y además, generan gastos debido a tratamientos y análisis de laboratorios que no se tenían contemplados al ingresar a los diversos centros de salud. Generalmente, cuando se sospecha de una infección nosocomial, muestras clínicas son enviadas a laboratorios para realizar análisis microbiológicos; sin embargo, los análisis han presentado fallas en la exactitud y rapidez de sus resultados. Por esta razón, este estudio se enfoca en seleccionar y evaluar una técnica molecular rápida y relativamente económica para la diferenciación de las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR (Unidad Nacional de Cardiología). El método escogido para sus análisis preliminar fue la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa asociado al análisis de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla de ADN, PCR-SSCP, para esto, se evaluaron *in silico* e *in vitro*, tres sets de iniciadores (Com1-Com2, ER10-ER11 y P11P-P13P) que amplifican para diferentes regiones del gen 16S ARNr de las 10 bacterias de interés. El análisis por SSCP demostró ser un método con potencial para diferenciar al menos 9 de las 10 bacterias, por lo que es factible utilizarlo como prueba diagnóstica en muestras clínicas, una vez realizada su optimización y validación.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen múltiples técnicas que permiten identificar bacterias causantes de infecciones nosocomiales; sin embargo, son métodos poco accesibles para la población guatemalteca. Debido a esto, uno de los objetivos de este estudio se enfocó en la búsqueda de metodologías moleculares que permitieran reducir, tanto el costo como el tiempo de ejecución para la identificación de las bacterias involucradas en infecciones nosocomiales de la Unidad Nacional de Cardiología, UNICAR. Las técnicas que fueron consideradas para este estudio son la secuenciación del gen 16S ARNr, tipificación multilocus de secuencias, RT-PCR (PCR en tiempo real), PCR múltiple, digestión del gen 16S con enzimas de restricción y polimorfismo de conformación de cadena sencilla (PCR-SSCP); tras una serie de análisis bioinformáticos se optó por analizar esta última técnica en el laboratorio.

La técnica de PCR-SSCP presenta varias ventajas, es simple, económico y sensible, por lo que se evaluó la factibilidad de utilizarlo para la diferenciación de las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Después de la selección de este método, se evaluaron tres sets de iniciadores que amplifican diferentes regiones del gen 16S ARNr. Se realizaron análisis por medio de herramientas bioinformáticas; y a partir de esto se inició con la optimización *in vitro* de la amplificación por PCR.

La información generada a partir de los patrones de migración electroforética en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida, permitió determinar que sí es factible utilizar esta técnica para diferenciar, al menos, 9 de las 10 bacterias; sin embargo, es necesario optimizar y validar su uso, antes de ser aplicado para el diagnóstico en muestras clínicas.

II. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar una prueba molecular para la diferenciación de las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar la prueba molecular que permita la diferenciación de las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR.
- Utilizar tres sets de iniciadores para amplificar distintas regiones del gen 16S ARNr, a partir de ADN genómico de las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR.
- Determinar si se logra diferenciar las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR, con el método y los sets de iniciadores seleccionados.
- Escoger el set de iniciadores que permita diferenciar las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR.

III. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales son un problema a nivel mundial que, además de tener un impacto en el costo económico, también son fuente principal del aumento de la mortalidad de pacientes hospitalizados (Kollef *et al.* 1997; Yin-Yin *et al.* 2005). Aunque existen diferentes factores que afectan la susceptibilidad de contraer una infección por bacterias oportunistas (Lima 2004), los más afectados parecen ser los pacientes pediátricos que se encuentran internados en unidades de cuidado intensivo, debido, entre otros factores, a la inmadurez de su sistema inmunitario (Grazioso *et al.* 2003).

En el año 2000 se reportó que el costo total en exceso por neumonías nosocomiales pediátricas para un hospital de la ciudad de Guatemala fue de aproximadamente US\$ 93000; esto solo para una de tantas infecciones posibles (Grazioso *et al.* 2003). Aunque es evidente la pérdida económica generada a partir de estas infecciones, existen pocos estudios que reporten medidas tomadas para contrarrestar estos hechos.

Generalmente, cuando se sospecha de una infección nosocomial, se envían muestras a un laboratorio microbiológico para determinar el patógeno o los patógenos involucrados y si presentan resistencia a algún antibiótico (Yin-Yin *et al.* 2005); sin embargo, las técnicas microbiológicas convencionales, además de ser tardadas y poco sensibles, no dan resultados completamente confiables (Dunbar *et al.* 2013); esto ha generado la necesidad de desarrollar técnicas moleculares que revolucionen esta área al permitir diagnósticos exactos en menos de 36 horas y con mayor información del patógeno causante de la infección (Dunbar *et al.* 2003; Whitby *et al.* 1998).

Los datos previamente reportados, dejan clara la necesidad de implementar un método de diagnóstico molecular que permita mejorar el tratamiento y sobrevida del paciente. Por esta razón, el estudio se enfocará en el diseño experimental de pruebas moleculares que respondan a las necesidades antes mencionadas. Además, se buscará determinar cual metodología es la más apropiada considerando los recursos con los que se cuenta. En esta investigación, se evaluarán tres sets de iniciadores que permitan la diferenciación de bacterias, por el método de polimorfismo de conformación de cadena sencilla para una región del gen 16S rRNA. Así pues, se espera que a partir de estos resultados, se continúe con la estandarización y aplicación de pruebas moleculares para la detección de bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR.

IV. MARCO TEÓRICO

A. INFECCIONES NOSOCOMIALES

Se define como infección nosocomial a la infección que es desarrollada después de la hospitalización, generalmente después de 48 horas de la estancia, debido a una razón distinta por la que el sujeto fue ingresado (OMS 2003). Además, no debe sospecharse que la infección haya estado desarrollándose asintómicamente al momento de hacerse el ingreso (Garner *et al.* 1988).

Las infecciones nosocomiales son un problema a nivel mundial, a pesar del avance médico; solo en Estados Unidos se reportan más de 2 millones de casos anualmente, lo que genera gastos de hasta \$4.5 billones (Emori & Gaynes 1993) y más de 90000 muertes al año (Peleg, *et al.* 2010). En Guatemala, para el año 2000, se calculaba que Q2.5 millones eran destinados al tratamiento de estas enfermedades (Villela 2009), dinero que podría ser destinado a otras áreas, si se implementaran medidas de prevención o detección temprana (Weinstein 1998).

1. Factores de riesgo: Existen muchos factores que están involucrados en el desarrollo de infecciones nosocomiales (OMS 2003; Rosenthal *et al.* 2012); y a pesar de la baja virulencia de los microorganismos involucrados, estos se aprovechan del comprometido sistema inmune del paciente internado (Guggenbichler *et al.* 2011).

El uso de aparatos terapéuticos como catéteres venosos centrales, pulmonares, urinarios, arteriales, además de ventiladores mecánicos y drenajes de heridas son factores clave en el desarrollo de infecciones por patógenos oportunistas (Kollef *et al.* 1997; Guggenbichler *et al.* 2011; Peleg & Hooper 2010). Debe recalarse que, aunque el equipo médico con el que se cuenta en países en vías de desarrollo es más propenso a contaminarse, esto no elimina el problema en países desarrollados (Alp *et al.* 2011).

El paciente que ha atravesado una cirugía tiene mayor probabilidad de desarrollar infecciones nosocomiales y con mayor severidad, debido a la facilidad con la que los microorganismos pueden acceder al cuerpo (Guggenbichler *et al.* 2011; Richards *et al.* 1999), y el uso de aparatos médicos más invasivos (Yin-Yin *et al.* 2005). Además, las infecciones nosocomiales están directamente asociadas con el aumento en la estadía

hospitalaria (Kollef *et al.* 1997), el tiempo de cateterización, y a las diferencias anatómicas debido al género (Guggenbichler *et al.* 2011; Rosenthal *et al.* 2012; Yin-Yin *et al.* 2005).

En general, existen dos formas de transmisión de los agentes causantes de infecciones nosocomiales. El primero es transmisión por contacto directo, que se da por la transferencia de los microorganismos de una persona infectada y el hospedero susceptible; y el segundo, el contacto indirecto, se refiere, principalmente, a la transferencia por equipo médico contaminado (Lima 2004), ya que estos aparatos son fácilmente colonizados por microorganismos a una velocidad de hasta 0.5cm/hora (Guggenbichler *et al.* 2011).

2. Impacto económico y social en Guatemala: En la mayoría de países latinoamericanos no existen estudios actuales para determinar la incidencia y el impacto que tienen estas infecciones para la población (Seaman 2011); lo que sí se sabe es que las infecciones nosocomiales prolongan la estadía hospitalaria, lo que se traduce en aumento del costo de la hospitalización, gastos de tratamiento y otros análisis que no se tenían contemplados (OMS 2003).

Los costos directos que surgen por estas infecciones incluyen la hospitalización, servicios médicos, análisis de laboratorios, medicamentos y otros suministros (Yin-Yin *et al.* 2005); además, el impacto de las infecciones nosocomiales se manifiesta en disminución de productividad, y lo más lamentable, pérdidas humanas (Mejia *et al.* 2003).

Debido a las condiciones generales de los hospitales de Guatemala, las personas con mayor riesgo de infección nosocomial (pacientes pediátricos, adultos mayores y con patologías que comprometen su sistema inmune) son atendidos en áreas generales, donde existen múltiples focos de infección (Del Cid 1998), y donde, además, los costos de algunos insumos deben ser pagados, al menos parcialmente, por el paciente y/o su familia (Mejia *et al.* 2003).

3. Infecciones nosocomiales comunes: Existe un gran número de infecciones nosocomiales, incluso, muchas veces son nombradas según el sitio o el origen de infección (Del Cid 1998); sin embargo, las más comunes son las que se describen a continuación (Gaynes & Edwards 2005; Richards *et al.* 1999; Rosenthal *et al.* 2012), además se incluye una breve descripción sobre los síntomas y el diagnóstico actual que se utiliza para iniciar el tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Síntomas y diagnóstico de las infecciones nosocomiales más comunes.

| Infección | Síntomas | Diagnóstico |
|---------------------------------|--|--|
| Neumonía | Fiebre, tos, esputo purulento, infiltrado en radiografía del tórax. | Hemocultivo positivo, aislamiento por aspirado transtraqueal, biopsia, valores IgM positivos |
| Infección del tracto urinario | Fiebre, urgencia, frecuencia, disuria, dolor suprabúbico | Tira reactiva de orina positiva para esterasa leucocitaria, piuria, visualización mediante tinción Gram de muestra de orina, urocultivo. |
| Infección por herida quirúrgica | Fiebre, secreción purulenta alrededor de la herida o del sitio de inserción del tubo de drenaje, celulitis difusa de la herida | Aislamiento de un microorganismo perteneciente a flora normal. |
| Bacteriemia | Fiebre, escalofríos, hipotensión | Microorganismo perteneciente a flora normal que se aísla de un hemocultivo en un paciente con vía intravascular |

(Del Cid 1998; OMS 2003)

a. Neumonía nosocomial: Esta infección es responsable de la mayoría de muertes por infecciones nosocomiales (Poley & Hooper 2010). Se caracteriza por la colonización bacteriana del estómago, vías respiratorias superiores, bronquios, y la infección de los pulmones. Es causada principalmente por el contacto directo con respiradores (OMS 2003).

b. Infección urinaria nosocomial: Es la infección nosocomial más común, aunque su morbilidad es menor que las otras infecciones; el problema con esta, es que puede ocasionar bacteriemia, y por ende, la muerte (OMS 2003).

El uso de catéteres, principalmente a partir del segundo día (Peleg & Hooper 2010), facilita el acceso de las bacterias hacia la vejiga urinaria, debido a que se elimina el proceso de micción; además que estos pacientes se encuentran con los mecanismos de defensa alterados (Del cid 1998).

c. Infección por herida quirúrgica: La incidencia de estas infecciones varía según el tipo de operación, en la que la herida es infectada durante la propia operación a través de ambientes no estériles, o por la misma flora de la piel (OMS 2003).

d. Bacteriemia nosocomial: Son las menos comunes, pero las más letales, hasta 50%, para algunos microorganismos, principalmente del género *Staphylococcus* (OMS 2003). Estas infecciones ocurren en el sitio de entrada a la piel debido a los cuidados precarios con los dispositivos intravasculares.

B. BACTERIAS ASOCIADAS A INFECCIONES NOSOCOMIALES

Existen muchos microorganismos que pueden estar involucrados en el desarrollo de infecciones nosocomiales, de los cuales, no todos son necesariamente organismos patógenos (OMS 2003), pero que al estar en otros sitios donde no pertenecen a la flora normal, pueden ser causa de infecciones (Peleg & Hooper 2010). Los organismos que más provocan preocupación en el área médica son las bacterias Gram-negativas, las cuales son responsables de hasta el 70% de infecciones en unidades de cuidado intensivo, debido principalmente, a su eficiente regulación de los mecanismos involucrados en la resistencia a antibióticos (Gaynes & Edwards 2005; Mulvey & Simor 2009; Peleg & Hooper 2010).

En el Cuadro 2 puede observarse la incidencia de bacterias asociadas a infecciones nosocomiales más comunes; así como en el Cuadro 3 se observan las infecciones que son causadas por las 10 bacterias que se utilizarán en este estudio, siendo las 10 reportadas con mayor frecuencia en la unidad de cuidado intensivo pediátrico de UNICAR.

Cuadro 2. Porcentajes de bacterias asociadas a las infecciones nosocomiales más comunes, durante la vigilancia de unidades de cuidado intensivo por parte del Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales, 1986-2003.

| Bacteria | Porcentaje de aislados, por tipo de infección | | | |
|---|---|-----------------------------------|--|-------------------------|
| | Neumonía (n=4365) | Infección urinaria (n=4109) | Infección por herida quirúrgica (n=2984) | Bacteriemia (n=2351) |
| <i>Escherichia coli</i> | 5.0 | 26.0 | 6.5 | 3.3 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 7.2 | 9.8 | 3.0 | 4.2 |
| <i>Enterobacter spp</i> | 10.0 | 6.9 | 9.0 | 4.4 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 4.7 | 1.6 | 2.0 | 2.3 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 18.1 | 16.3 | 9.5 | 3.4 |
| <i>Acinetobacter spp.</i> | 6.9 | 1.6 | 2.1 | 2.4 |
| Otras | 14.1 | 10.7 | 9.8 | 3.8 |
| Staphylococcus – coagulasa negativos | 1.8 | 4.9 | 15.9 | 42.9 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 27.8 | 3.6 | 22.5 | 14.3 |
| Enterococcus | 1.3 | 17.4 | 13.9 | 14.5 |
| Otros | 3.2 | 1.2 | 5.8 | 4.5 |

(Gaynes & Edwards 2005)

1. *Acinetobacter baumannii*: Esta es una bacteria patógena oportunista, asociada a pacientes con hospitalización prolongada. Comúnmente se encuentre en ambientes húmedos. En los últimos años, esta bacteria ha cobrado importancia clínica debido a sus múltiples resistencias a antibióticos (Dijkshoorn *et al.* 2007); además, en cuanto a su patogenicidad, esta bacteria coloniza principalmente membranas mucosas, o heridas expuestas.

Puede formar biofilm, incluso en superficies abióticas, por lo que es común encontrarla en equipo médico (Howard *et al.* 2012).

No existen pruebas metabólicas o microbiológicas que confirmen esta bacteria, por lo que su identificación es especialmente difícil debido a su similitud con otras 3 especies del género *Acinetobacter*, por lo que muchas veces solamente se hace referencia al complejo *A. calcoaceticus* (Howard *et al.* 2012); sin embargo, esto se presta a confusión en el área clínica, ya que *A. calcoaceticus* es una bacteria del ambiente, sin ninguna relevancia médica (Dijkshoorn *et al.* 2007).

2. ***Aeromonas hydrophila***: En general, todas las especies pertenecientes al género *Aeromonas* son ubicuas, y son fácilmente aisladas de ambientes húmedos (Sartor *et al.* 2002). Esta especie en específico, es responsable de muchas enfermedades, desde diarreas hasta fascitis necrosa, meningitis, septicemia, entre otras; además de su amplio espectro de resistencia a antibióticos (Grim *et al.* 2013).

Esta bacteria no pertenece a la flora gastrointestinal; sin embargo, sí hay reportes de colonización en personas que viven en climas tropicales, que no presentan ningún tipo de síntoma. Las infecciones nosocomiales causadas por *A. hydrophila* son poco comunes, además, es frecuente que en estas infecciones estén involucradas otras bacterias oportunistas (Clark & Chenoweth 2003).

3. ***Burkholderia cepacia***: Esta bacteria se caracteriza por su capacidad de adaptarse a múltiples ambientes, desde células eucariotas, hasta superficies de aparatos médicos (formación de biofilm) (Doit *et al.* 2004; Vial *et al.* 2011).

Originalmente fue descrita como *Pseudomonas cepacia*; sin embargo, estudios más completos determinaron que esta y otras seis especies del género *Pseudomonas* pertenecían al nuevo género *Burkholderia* (Coenye *et al.* 2001). De todas las especies que actualmente pertenecen a este género, existen 17 especies que, debido a su similitud, se han agrupado en el Complejo *Burkholderia cepacia* (Vial *et al.* 2011). Es importante mencionar que esta nomenclatura dificulta la identificación del agente causal de la infección por técnicas convencionales microbiológicas, lo cual aumenta la necesidad de utilizar metodologías moleculares más específicas que confirmen la bacteria causante (Coenye *et al.* 2001).

Aún no se sabe si es el complejo o la especie *Burkholderia cepacia* la causa de neumonías y bacteriemias; y aunque los casos son raros, muchas veces llevan a la muerte principalmente en pacientes con fibrosis quística, debido a resistencias contra los antibióticos más comunes (Vial *et al.* 2011).

4. *Enterobacter cloacae*: Esta es una bacteria poco estudiada, y probablemente, la menos importante en cuanto a infecciones nosocomiales (Harbarth *et al.* 1999). Esto puede deberse, principalmente, a que suele colonizar a víctimas de quemaduras y pacientes inmunocomprometidos, nichos también preferidos por otras bacterias con factores de virulencia más eficientes (Musil *et al.* 2010).

Es poco común que sea la causa principal de infecciones nosocomiales; a pesar de esto, *E. cloacae* está relacionada con neumonías e infecciones urinarias, y a resistencia a múltiples antibióticos (Harbarth *et al.* 1999).

5. *Escherichia coli*: De todas las bacterias, esta parece ser la más estudiada en el área de microbiología (Toval *et al.* 2014). Pertenece a las bacterias comensales encontradas en la flora normal, y aunque evita la colonización de otros organismos patógenos, también es causa de infecciones si el paciente está comprometido, como es el caso de las infecciones urinarias debido a catéteres intravasculares (OMS 2003). Además, ha sido asociada con diferentes infecciones intestinales y extraintestinales en humanos y animales (Toval *et al.* 2014).

Debido a la diversidad de fenotipos que presenta, *E. coli* se ha convertido en una bacteria de interés clínico, principalmente porque muchas cepas presentan múltiples resistencias a antibióticos (Kraker *et al.* 2011), lo cual aumenta su morbilidad cuando está involucrada en infecciones nosocomiales.

6. *Klebsiella pneumoniae*: Es una bacteria patógena oportunista, causante de muchas infecciones nosocomiales, principalmente por la formación de biofilm en ventiladores artificiales (Murphy & Clegg 2012). Aunque es una bacteria ubicua y puede permanecer largos períodos en superficies inanimadas, es mayormente encontrada en humanos (Podschun & Ullmann 1998).

Por mucho tiempo se creyó que esta bacteria era la única responsable de neumonías nosocomiales, hoy en día, se sabe que son muchos los microorganismos Gram-negativos los que pueden ser causa de estas infecciones (Gaynes & Edwards 2005). Algunos estudios indican que esta bacteria es la causa del 8% de las infecciones nosocomiales y, cuando es la causa principal de bacteriemia, su morbilidad es de hasta el 50% (Podschn & Ullmann 1998).

7. *Pseudomonas aeruginosa*: Esta bacteria patógena oportunista es responsable hasta del 20% de los casos de neumonía nosocomial, y su mortalidad es hasta del 70% (Obritsch *et al.* 2005), debido, no solo a los múltiples mecanismos con los que cuenta para evadir el sistema inmune, sino también, a los limitados antibióticos que pueden utilizarse para su tratamiento (Kharazmi 1991; Obritsch *et al.* 2005).

Se calcula que las infecciones nosocomiales causadas por esta bacteria, afectan a más de 2 millones de pacientes y causan alrededor de 9mil muertes anualmente; y se deben principalmente a pacientes con heridas crónicas, aparatos implantados, catéteres, intubación, principalmente del tracto urinario y pulmonar (Breidenstein *et al.* 2011; Lu *et al.* 2014). Una vez establecida en el paciente, *P. aeruginosa* es especialmente difícil de tratar (Poole 2001).

8. *Staphylococcus aureus*: Esta bacteria Gram-positiva, puede colonizar ciertas partes del cuerpo como parte de la flora normal (Gorwitz *et al.* 2008); sin embargo, es responsable de muchas infecciones nosocomiales, principalmente de las infecciones por heridas quirúrgicas (Valaperta *et al.* 2010). Además, existe una cepa de especial importancia clínica, *S. aureus* resistente a la metilina, ya que es causa de más muertes en pacientes infectados debido a los limitados tratamientos con los que se cuenta (Klein *et al.* 2007; Kraker *et al.* 2011).

La infección por *S. aureus* inicia básicamente por una herida en la piel o tejido. Esta bacteria cuenta con múltiples estrategias para evadir el sistema inmune del hospedero, puede alojarse dentro de células eucariotas, principalmente las células del sistema inmune, donde cuenta con diferentes factores que evitan su eliminación (Kubica *et al.* 2008)

9. *Staphylococcus epidermidis*: Esta bacteria es de las más abundantes colonizadoras de la piel, por lo que era poco común asociarla a alguna infección (Otto 2012); es más, su relación benéfica con los humanos se debe a que evita la colonización de otras

bacterias potencialmente más dañinas (Gomes *et al.* 2014). Sin embargo, recientemente se ha identificado como una bacteria patógena oportunista, causante de infecciones nosocomiales relacionadas al uso de aparatos intravasculares (Ziebuhr *et al.* 2006).

Se le conoce por desarrollar estrategias que le permitieron ocupar ambientes hospitalarios, tal vez esta sea la razón por la que aún no produce factores de virulencia tan agresivos como el resto de bacterias oportunistas (Schoenfelder *et al.* 2010); por esta misma razón, deben utilizarse antibióticos adecuados para su tratamiento, y así evitar la selección de cepas resistentes (Gomes *et al.* 2014)

10. *Stenotrophomonas maltophilia*: Después de una larga confusión taxonómica, esta bacteria fue reclasificada, y ahora es la única perteneciente al género *Stenotrophomonas* (Senol 2004). Se encuentra principalmente en ambientes húmedos, y se ha aislado de numerosas fuentes nosocomiales debido a su capacidad de formar biofilm en aparatos médicos, lo cual parece indicar la fuente de infección en los pacientes (Denton & Kerr 1998).

Generalmente esta bacteria está asociada a infecciones pulmonares, y aunque no es un patógeno altamente virulento, su mortalidad es de hasta 69% en pacientes que presentan bacteriemia (Samonis *et al.* 2012); y la incidencia de esta bacteria está aumentando considerablemente, principalmente en pacientes inmunocomprometidos (Brooke 2012). Además, su amplia resistencia a antibióticos, hace de esta bacteria una emergente preocupación en el área médica y las infecciones nosocomiales (Denton & Kerr 1998).

Cuadro 3. Bacterias reportadas con mayor frecuencia, asociadas a infecciones más comunes

| Bacteria | Infecciones nosocomiales | | | |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------|
| | Neumonía | Infección urinaria | Infección por herida quirúrgica | Bacteriemia |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | x | x | x | x |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | x | | x | x |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | x | | | x |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | x | x | | |
| <i>Escherichia coli</i> | x | x | x | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | x | x | | x |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | x | x | x | x |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | x | | x | x |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | | | x |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | x | | | x |

El signo "x" indica a la bacteria como agente causal de la infección.

(Kubica *et al.* 2008)

C. TÉCNICAS CONVENCIONALES MICROBIOLÓGICAS

Generalmente, las infecciones nosocomiales son diagnosticadas únicamente por la aparición de síntomas específicos, apoyados por cultivos microbiológicos (Yin-Yin *et al.* 2005). Según la CDC, para diagnosticar una infección nosocomial debe existir evidencia de laboratorio, ya sea por el resultado de cultivos, pruebas de detección por antígeno – anticuerpo, y/o visualización microscópica; y debe estar respaldada por otros estudios diagnósticos como rayos X, ultrasonidos, tomografías, resonancias magnéticas, entre otros (Garner *et al.* 1998).

1. **Cultivo en placa:** Se refiere al uso de placas de Petri con medios específicos que permiten la identificación de bacterias. Generalmente, la composición de los medios, inhibe el crecimiento de bacterias no importantes clínicamente, para permitir el crecimiento de bacterias específicas; debido a que el laboratorista tiene solamente una cierta idea del patógeno que puede estar involucrado, es necesario recurrir a la siembra en diferentes medios. Además, es necesario realizar otras pruebas que confirmen los primeros hallazgos.

2. **Pruebas bioquímicas:** Estos estudios se realizan para confirmar otros estudios microbiológicos. Muchas de estas pruebas se basan en el metabolismo de las bacterias, es decir, por su capacidad de utilizar los diferentes compuestos de los que están elaborados los medios de cultivo, y que además, contienen indicadores que permiten observar las diferencias de acuerdo a la actividad de las bacterias. La mayoría de estas pruebas están listadas en el Cuadro 4, donde además, se incluyen los resultados de las 10 bacterias que serán utilizadas en este estudio (Forbes 2009).

3. **Tinción de Gram:** Esta tinción se utiliza como técnica para separar la mayoría de especies bacterianas en dos grandes grupos, Gram-positivas y Gram-negativas, dependiendo de su capacidad de retener el colorante cristal violeta, debido a la composición de las paredes celulares. Las bacterias Gram-positivas, poseen una capa gruesa de peptidoglicanos, lo contrario con las bacterias Gram-negativas (Forbes 2009).

Cuadro 4. Pruebas microbiológicas utilizadas para identificar bacterias asociadas a las infecciones nosocomiales más comunes, y sus resultados.

| Bacteria | LIA | TSI | Motilidad | Fermentación | Reacción catalasa | Reacción oxidasa | Indol | Citrato |
|-------------------------------------|-----|-----|-----------|--------------|-------------------|------------------|-------|---------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | + | - | - | - | + | - | - | + |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | - | - | + | - | + | + | - | + |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | + | + | + | + | + | - | - | + |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | - | + | - |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> | + | + | - | + | + | - | - | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | + | - | + | - | - | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | + | - | + | + | - | - | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | + | + | - | + | + | + | - | - |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | + | - | + | - | + | - | - | + |

Los signos + y - indican reacciones positivas y negativas, respectivamente.

(Forbes 2009)

D. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS

1. **Bioinformática:** se refiere al análisis de datos biológicos por medio de programas de computación. En la actualidad, existen un sinnúmero de aplicaciones, que permiten visualizar y comprender comportamientos o patrones en ácidos nucleicos y/o proteínas de diferentes organismos; así como relaciones evolutivas y divergencias (Madden 2002).

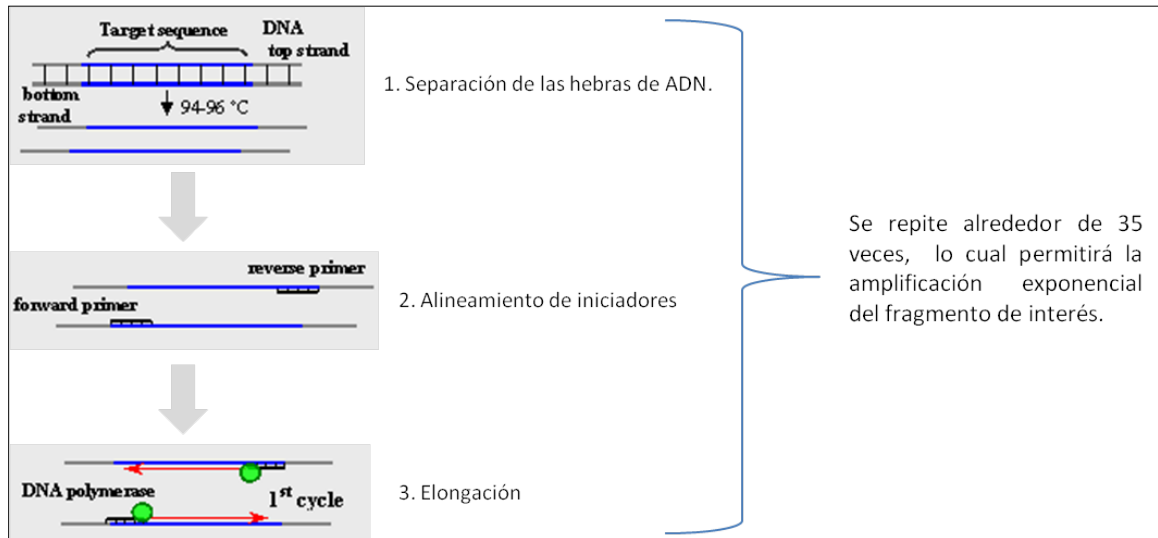
2. **Reacción en cadena de la polimerasa:** Por sus siglas en inglés, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), es un método que revolucionó al área de biología molecular al permitir sintetizar millones de copias de una secuencia específica de ADN, en aproximadamente dos horas. Los principales componentes de un PCR son el templado de ADN, que contiene la secuencia que se quiere amplificar; la ADN polimerasa, que es una enzima capaz de sintetizar nuevas hebras de ADN y que soporta las temperaturas a las que se lleva a cabo este método, generalmente se utiliza *Taq* ADN polimerasa (del organismo *Thermis aquaticus*); también es utilizar cebadores, que son pequeños fragmentos de ADN complementarios a secuencias cortas de la hebra de interés. También son necesarios los nucleótidos que se utilizarán para sintetizar la secuencia; y por último un buffer que sea capaz de mantener las condiciones ideales para llevar a cabo la PCR (NCBI 2014).

En general, una PCR se lleva a cabo en tres pasos principales: la desnaturalización del templado de ADN, alineamiento de los iniciadores y la elongación, o síntesis de las nuevas hebras (Figura 1).

a. **Gen 16S ARNr:** este gen es uno de los más utilizados para estudiar la evolución y ecología bacteriana (Pei *et al.* 2010). A pesar de ser un gen sumamente conservado, contiene regiones variables que muestran considerables diferencias para la clasificación de especies (Elgaml *et al.* 2013).

Estas características, además de su relativo pequeño tamaño (alrededor de 1500pb) hacen de este gen, un buen blanco para su uso en la detección de bacterias específicas por medio de metodologías moleculares, como el caso de la reacción en cadena de la polimerasa; y más específicamente en la identificación de los organismos causantes de infecciones nosocomiales, entre otros (Clifford *et al.* 2012).

Figura 1. Proceso general de la reacción en cadena de la polimerasa.



(NCBI 2014)

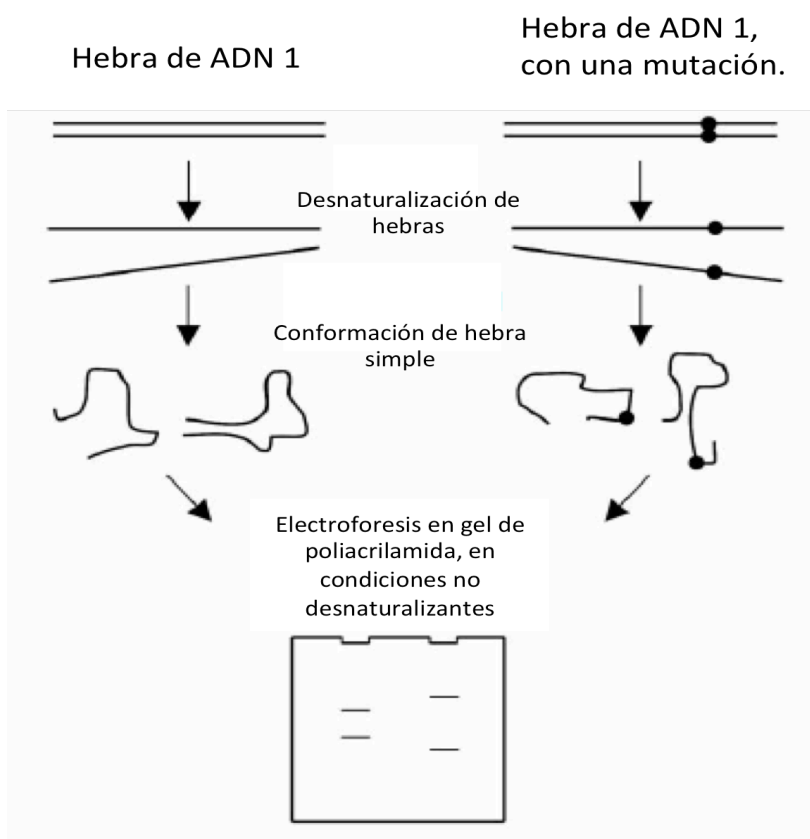
b. **Electroforesis en gel de agarosa:** Es una técnica ampliamente utilizada para separar moléculas de ADN (o ARN) de acuerdo a su tamaño. El gel se prepara a partir de agarosa, un polisacárido extraído de algas, que brinda resistencia al movimiento de los fragmentos de ADN. Una vez agregados los ácidos nucleicos en el gel, se aplica una corriente eléctrica que le permite migrar hacia el extremo positivo; entonces, los fragmentos más grandes tendrán mayor dificultad para migrar, por lo que será menor su desplazamiento. Al agregar ciertos colorantes, estos fragmentos podrán visualizarse para que su análisis sea mejor (Stellwagen 2009).

Esta técnica permite visualizar y analizar la eficiencia de extracciones y amplificaciones de ADN, entre otras.

3. Polimorfismo de conformación de cadena sencilla: Esta técnica se basa en las diferencias de la conformación de una sola hebra de un fragmento de ADN, por lo que dos secuencias básicamente idénticas pueden ser diferenciadas, debido a una sola base diferente (Humphries *et al.* 1997).

SSCP, por sus siglas en inglés (Single Strand Conformation Polymorphism) no solo permite identificar mutaciones en el genoma; también ha sido estudiada para la identificación de bacterias (Widjoatmodjo *et al.* 1994). En general, se realiza una amplificación de una región altamente conservada (de allí la adaptación a PCR-SSCP), se desnaturalizan las hebras y en condiciones específicas, se permite su conformación. Estas pueden ser reveladas a continuación, en un gel de poliacrilamida (Figura 2), donde se observarán distintos patrones de banda, a pesar de ser fragmentos del mismo tamaño.

Figura 2. Esquema general sobre la técnica SSCP.



(Gasser *et al.* 2007)

V. MÉTODOS

A. HIPÓTESIS

1. **Hipótesis de trabajo:** un set de iniciadores brinda un patrón de bandas específico que permite la identificación de al menos una bacteria.
2. **Hipótesis nula:** ningún set de iniciadores brinda un patrón de bandas que permite la identificación de al menos una bacteria.

B. PROCEDIMIENTO

1. **Bacterias:** se utilizaron diez bacterias, las cuales pertenecen al grupo reportado con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Stenotrophomonas maltophilia*, las cuales se obtuvieron a partir del cepario del Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.
2. **Crecimiento bacteriano:** a partir del cepario, se aisló cada bacteria en una placa de agar infusión cerebro-corazón, con la cual se obtuvieron colonias tanto para las pruebas confirmatorias como para el crecimiento en medio líquido.
 - a. **Pruebas confirmatorias:** se realizaron tinciones Gram y pruebas bioquímicas (LIA, TSI, urea, indol, citrato) para cada una de las bacterias.
 - b. **Crecimiento en medio líquido:** se utilizó caldo infusión cerebro-corazón. Se cultivó una colonia y se dejó incubando por al menos 12 horas a 37°C con agitación a 230rpm.
3. **Selección del método a utilizar para la diferenciación de las 10 bacterias:** Se hizo una revisión literaria para determinar el método más factible que permite diferenciar las bacterias, tomando en cuenta el tiempo, costos y los recursos con los que se cuentan en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. De acuerdo a esta revisión, se analizó por medio de programas bioinformáticos (Clustal Omega, herramienta BLAST de

nucleótidos de ncbi, Oligo Analyzer de Integrated DNA Technologies, NEBcutter V2.0 de New England BioLabs), la posibilidad de utilizar el método en este estudio. Además, se analizó el costo aproximado del análisis clínico que se realizaría con el método seleccionado en este estudio.

4. **Extracción de ADN:** se evaluaron dos diferentes métodos para la extracción de ADN de cada una de las diez bacterias.

a. **Método por ebullición:** se utilizó el protocolo de Queipo-Ortuño *et al.* (2008); brevemente: a partir del cultivo en medio líquido, se tomó 1.0mL y se centrifugó a 15,000 X g por 15 minutos. El sedimento de ADn se resuspendió en agua grado molecular y se centrifugó nuevamente por 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 50uL de agua grado molecular y se sometió a un baño de agua en ebullición por 10 minutos, se enfrió en hielo y se centrifugó por 10 segundos antes de ser almacenado a -20°C.

b. **Método por lisis con microondas:** se utilizó como guía el protocolo de Ahmed *et al.* (2014); brevemente: a partir del cultivo en medio líquido, se tomó 1.0mL y se centrifugó a 15 000 X g por 10 minutos, el sedimento de ADN se lavó con 500uL de buffer TE 1X y se resuspendió en 100uL del mismo buffer. Se adicionó 50uL de SDS 10% y se incubó a 65°C por 30 minutos. Se centrifugó nuevamente y el sedimento se sometió a 1 minuto de calentamiento en un horno microondas, marca LG. El sedimento se resuspendió en 200uL de buffer TE 1X.

El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis, mediante la medición de la absorbancia a las longitudes de onda de 260, 280 y 320nm. También se analizó la integridad mediante electroforesis en geles de agarosa: se prepararon a una concentración del 1% con buffer TBE 1X. Se utilizaron 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado, además de 3uL de buffer de carga y 5uL de muestra. Se cargaron 10uL en cada pozo; se utilizó 5uL de la escalera DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. El gel se corrió a 90V por 30 min, y se reveló en un transiluminador marca UVP. Se tomó registro fotográfico de cada gel, independiente de su resultado, a partir del fotodocumentador Photo-doc It, marca UVP.

5. Diferenciación de bacterias por PCR-SSCP

a. Selección de iniciadores: se utilizaron dos sets descritos en Widjoatmodjo *et al.* (1994), el primero: P13P (5'-AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC), y P11P (5'-GAG GAA GGT GGG GAT GAC GT), y el segundo: ER10 (5'-GGC GGA CGG GTG AGT AA), y ER11 (5'-ACT GCT GCC TCC CGT AG); además, se utilizó el set descrito en Shwieger & Tebbe (1998): Com1 (5'-CAG CAG CCG CGG TAA TAC), Y Com2 (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT). Los tres sets fueron sintetizados en Macrogen.

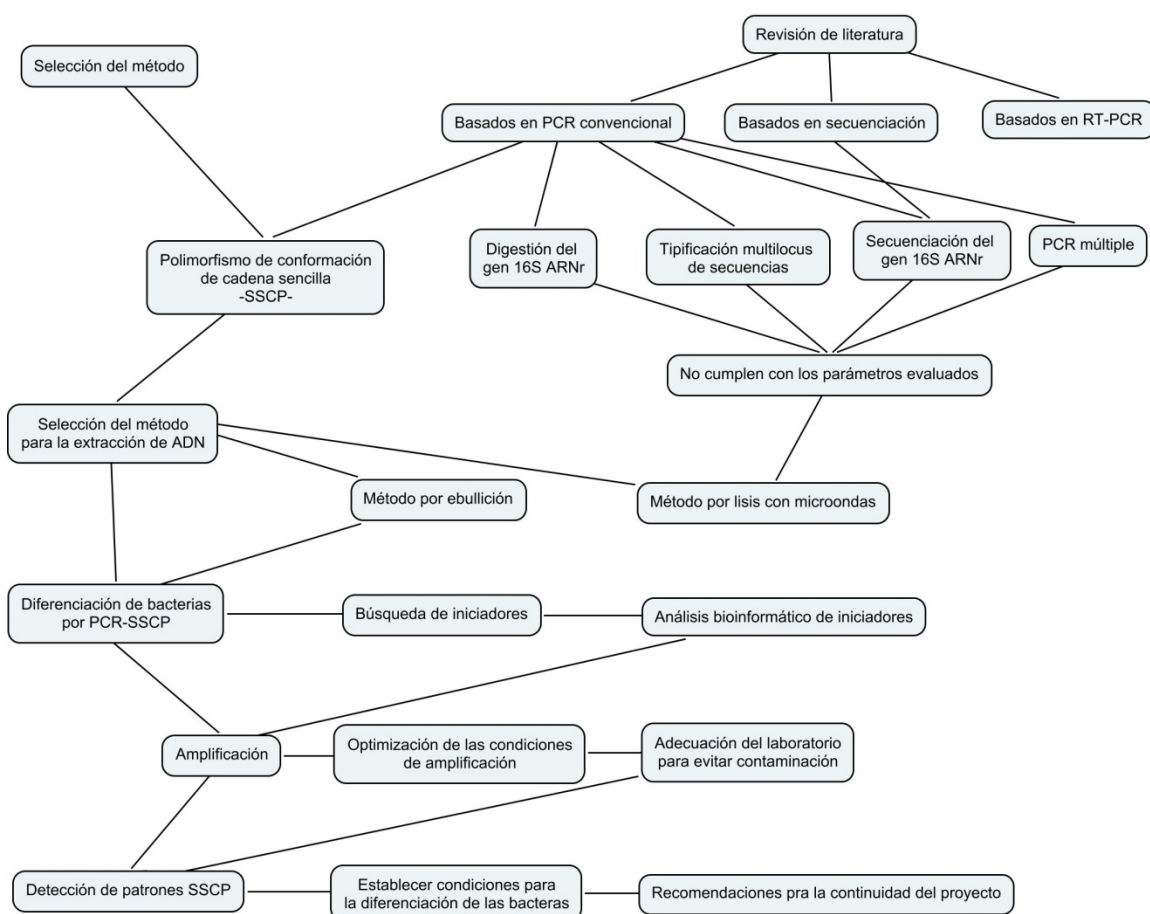
1) Análisis bioinformático: se realizó una alineación para cada iniciador con la secuencia fasta del gen 16S rRNA (Anexos) para cada una de las bacterias en el programa BLAST de nucleótidos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). También se utilizó el programa Oligo Analyzer de Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), para evaluar el porcentaje CG, la temperatura de anillamiento, formación de *hairpins*, *self-dimers*, *heterodimers*. Se llevó a cabo un PCR *in silico* a través del programa FastPCR 6.5

b. Condiciones de la amplificación: se utilizó un volumen final de 25uL, a partir de Green GoTaq Reaction Buffer 1X, MgCl₂ 1.5mM, dNTP's 0.2mM, cada uno de los iniciadores a 1uM y 1U de Taq Polymerase. Después de asegurar la correcta amplificación a partir de los iniciadores, se evaluó el uso de dos mezclas de reacción, el primero, Master mix PCR (2x) de BIO RAD; y el segundo, GoTaq® Hot Start Green Master mix 2X de PROMEGA. El volumen final de cada amplificación fue de 25uL. La concentración de cada primer estuvo sujeta a optimización, así como la temperatura de anillamiento y la concentración de ADN. El programa inicial de termociclador fue de 3min a 94°C, 30 ciclos de 1min a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 min a 72°C; la extensión final fue de 10 min a 72°C. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

c. Electroforesis SSCP: se agregaron 2uL del producto de amplificación a 3uL de buffer de carga y se calentó por 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN, seguidamente se colocó en hielo por 10 minutos. La concentración del gel fue de 20% de poliacrilamida (TBE 5X, APS 25%, glicerol 10% y TEMED). La electroforesis inicial se realizó a temperatura ambiente en un aparato Mini-PROTEAN® 3System a 150Amp por 2 horas; sin embargo estas condiciones están sujetas a optimización.

d. **Detección de los patrones SSCP:** tras la electroforesis, el gel se fijó en ácido acético al 10% por 20 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. Seguidamente, se lavó con agua deionizada tres veces, por dos minutos cada una. La tinción se realizó con nitrato de plata al 0.1% y 0.056% formaldehído por 30 minutos. Se lavó nuevamente por 20 seg. con agua deionizada, después se reveló con carbonato de sodio, formaldehído y tiosulfato de sodio hasta que se observaron bandas definidas. Esta reacción fue detenida nuevamente con ácido acético al 10%.

Figura 3. Esquema de la metodología realizada en esta investigación.



VI. RESULTADOS

A. PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y TINCIONES PARA LA CONFIRMACIÓN DE LAS BACTERIAS UTILIZADAS

Las 10 tinciones realizadas, así como la serie de pruebas bioquímicas, para colonias, coincidieron con lo previsto por la literatura. Estas pruebas también fueron hechas a partir del crecimiento en medio líquido (una vez vueltas a sembrar en placas de agar infusión cerebro-corazón), y los resultados fueron igualmente satisfactorios (debido a la naturaleza de los resultados, no son presentados en este reporte).

B. SELECCIÓN DEL MÉTODO

Los métodos considerados fueron los siguientes: secuenciación del gen 16S ARNr, tipificación multilocus de secuencias, RT-PCR (PCR en tiempo real), PCR múltiple, digestión del gen 16S con enzimas de restricción, polimorfismo de conformación de cadena sencilla, y variaciones de los mismos. Estos métodos fueron analizados bajo los siguientes parámetros: costos, tiempo de ejecución y disponibilidad en el laboratorio. Se realizó un aproximado para cada parámetro, y de acuerdo a esto se descartaron varios métodos (Cuadro 5).

Los métodos PCR múltiple, digestión con enzimas de restricción y polimorfismo de conformación de cadena sencilla fueron analizados con herramientas de bioinformática, donde se evaluó la especificidad para la identificación de las 10 bacterias incluidas en este estudio.

El diseño de iniciadores que originaran fragmentos de tamaños específicos para cada bacteria también fue considerado en este estudio; por conveniencia, se tomó como base la secuencia del gen 16S ARNr (Anexo 1). La alta similitud en la secuencia de las bacterias (Figura 4), impidió que pudieran diseñarse iniciadores que amplificaran secuencias lo suficientemente diferentes para su identificación.

Cuadro 5. Análisis general para la selección del método a utilizar para la diferenciación de las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR.

| Método | Parámetros evaluados | | |
|---|----------------------|---------------------|----------------------------------|
| | Costos | Tiempo de ejecución | Disponibilidad en el laboratorio |
| Secuenciación del gen 16S ARNr | + | - | - |
| Tipificación multilocus de secuencias | - | - | - |
| RT-PCR | - | + | - |
| PCR múltiple | + | + | + |
| Digestión del gen 16S ARNr con enzimas de restricción | + | + | + |
| Polimorfismo de conformación de cadena sencilla | + | + | + |

Los signos “+” y “-” indican que la metodología es o no apropiada, respectivamente, para realizar la diferenciación, tomando en consideración los recursos con los que se cuenta para este estudio.

Figura 4. Alineamiento de secuencias del gen 16S ARNr, para el diseño de iniciadores. Se muestra parte del alineamiento.

```

Staphylococcus_epidermidis      GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Staphylococcus_aureus          GCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Aeromonas_hydrophila          GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Escherichia_coli              GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Enterobacter_cloacae          GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Klebsiella_pneumoniae         GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Acinetobacter_baumannii       GCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCC
Pseudomonas_aeruginosa        GCGACGATCCGTAAGTGGTCTG-GAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Pseudomonas_luteola           GCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Burkholderia_cepacia           GCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
Strenotrophomonas_maltophilia GCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
**,* **** **,* *, *** ***, ** * * *****,***** **

Staphylococcus_epidermidis      AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGC
Staphylococcus_aureus          AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGC
Aeromonas_hydrophila          AGACTCNTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
Escherichia_coli              AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
Enterobacter_cloacae          AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
Klebsiella_pneumoniae         AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
Acinetobacter_baumannii       AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
Pseudomonas_aeruginosa        AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
Pseudomonas_luteola           AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
Burkholderia_cepacia           AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
Strenotrophomonas_maltophilia AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
***** ***** **,* **** **,* *****,***** **

```

Los nucleótidos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. El alineamiento completo se muestra en Anexo 2.

El análisis de PCR múltiple inició con la selección de iniciadores reportados en la literatura; debido a las condiciones del método, se optó por dividir las bacterias en dos grupos; de manera que primero se analizaron las condiciones de la posible amplificación para: *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. En el Cuadro 6 se presentan los sets de iniciadores que comparten similares condiciones de amplificación, *i. e* temperatura de anillamiento. El análisis de este método continuó con la alineación de cada primer con las demás bacterias, *i.e* el set de iniciadores descrito para *Burkholderia cepacia* se alineó con las cuatro bacterias restantes de su grupo, con lo que se pudo determinar que los iniciadores no eran específicos para esa bacteria. Dados los resultados para el primer grupo, se decidió desechar este método para la diferenciación de las 10 bacterias.

Cuadro 6. Iniciadores considerados para PCR múltiple, para el primer grupo de bacterias

| Bacteria | Secuencia del iniciador (5' – 3') | T _A | Tamaño del amplicón | Fuente |
|-----------------------------------|---|----------------|------------------------|----------------------------------|
| <i>Burkholderia cepacia</i> | AGGACCCGCGGCGAT TGCAGCATCCCGTCGCG | 67°C | 442pb | Papaleo <i>et al</i> 2010 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | GGTAGAAGAAGGCGTGGTTGC ATGCATTCGGTGGTGATCATCAG | 50°C | 341pb | Hoffmann & Roggenkamp 2003 |
| <i>Escherichia coli</i> | GCGACGATAACACTAACTTCA ACGACACTGCCTTTACCATTC | 55°C | 302pb | Barak <i>et al</i> 2005 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ACGGCCGAATATGACGAATTC AGAGTGATCTFCTCATGAA | 56°C | 68pb | Clifford <i>et al</i> 2012 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC CGCTGGCCCATTGCTCCAGCGCT | 73°C | 395pb | Khan & Cerniglia 1994 |

El análisis para la digestión con enzimas de restricción se inició con las enzimas capaces de digerir el gen 16S ARNr de las 10 bacterias en dos sitios diferentes; sin embargo, ninguna cumplió este requisito. Se optó por analizar los fragmentos generados por las enzimas que digirieran al menos a seis bacterias (Cuadro 7). Debido a razones que se detallan más adelante, este método fue descartado. La doble digestión no fue considerada.

Cuadro 7. Fragmentos originados por enzimas de restricción que digieren dos sitios, en al menos seis bacterias utilizadas en este estudio.

| Bacteria | Enzimas de restricción | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|------|--------------|------|-----|-----------|------|-----|-----------|------|------|-----------|-----|-----|
| | BspEI | EaeI | EcoP15I (pb) | | | NspI (pb) | | | StuI (pb) | | | XmnI (pb) | | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | N.A. | *Met | 368 | 168 | 991 | 49 | 890 | 568 | 252 | 151 | 1124 | N.A. | | |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | *Met | *Met | 383 | 167 | 941 | | N.A. | | 45 | 373 | 1073 | 418 | 961 | 112 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | *Met | N.A. | | N.A. | | | N.A. | | 335 | 151 | 1124 | N.A. | | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | *Met | *Met | 372 | 167 | 965 | 50 | 890 | 564 | 39 | 368 | 1097 | 407 | 959 | 138 |
| <i>Escherichia coli</i> | *Met | *Met | 380 | 167 | 992 | 56 | 893 | 590 | 45 | 370 | 1124 | 415 | 960 | 164 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | *Met | N.A. | 346 | 167 | 892 | 23 | 892 | 490 | 12 | 369 | 1024 | 381 | 960 | 64 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | *Met | *Met | 363 | 167 | 992 | | N.A. | | 34 | 214 | 1274 | 398 | 960 | 164 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | N.A. | N.A. | 373 | 167 | 958 | | N.A. | | | N.A. | | 408 | 962 | 128 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | N.A. | N.A. | | N.A. | | 113 | 774 | 411 | | N.A. | | N.A. | | |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | *Met | *Met | 370 | 167 | 988 | 35 | 942 | 538 | 24 | 371 | 1120 | 395 | 963 | 157 |

*Met: la enzima es sensible a metilaciones, no puede utilizarse para este estudio

N.A.: No aplica.

Por último, se analizó modificar la técnica de SSCP para diferenciar las 10 bacterias. Existe evidencia de su uso para la identificación de bacterias, además, es un método simple, relativamente económico y rápido. Por estas razones, se seleccionó esta técnica para evaluarla *in silico* (ver inciso C de esta sección) y en el laboratorio, y verificar su factibilidad para el propósito de este estudio.

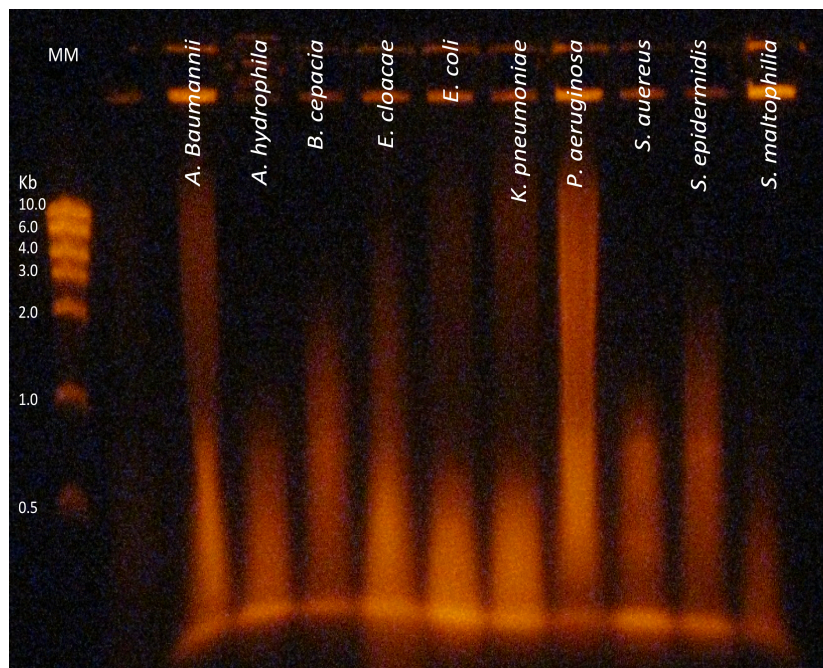
Cuadro 8. Costo aproximado por análisis: una muestra y 10 bacterias como control positivo.

| Cálculo aproximado | Quetzales (Q) |
|-------------------------------|---------------|
| Plásticos | 50.00 |
| Extracción ADN | 20.00 |
| Amplificación PCR | 100.00 |
| Electroforesis agarosa | 50.00 |
| Electroforesis poliacrilamida | 100.00 |
| TOTAL | Q 320.00 |

C. EXTRACCIÓN DE ADN

1. Extracción por método de ebullición: la simpleza de este método se pone en evidencia en la Figura 5, donde se observa un barrido para la extracción de las 10 bacterias, independientemente de ser Gram-positivas o negativas. A partir de esta extracción, se realizaron las pruebas preliminares para determinar la factibilidad de los iniciadores elegidos para la amplificación a partir de la reacción en cadena de la polimerasa.

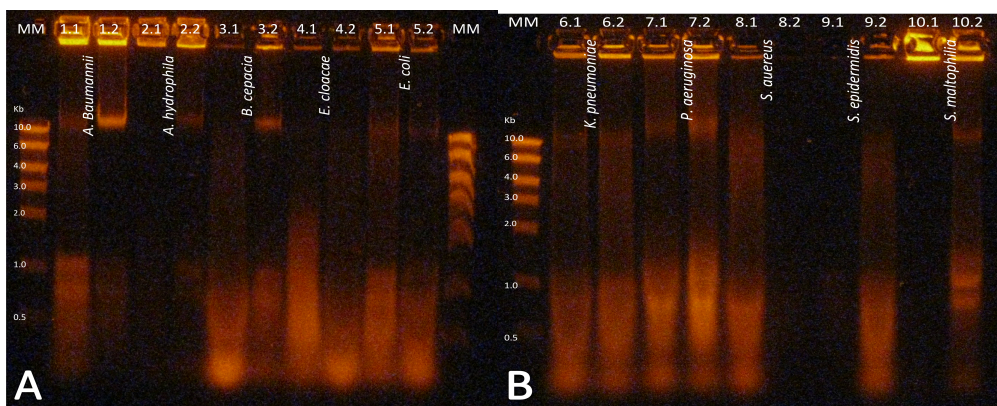
Figura 5. Extracción de ADN por método de ebullición, para las 10 bacterias utilizadas



Gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizaron 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado, 3uL de buffer de carga y 5uL de muestra. Se cargaron 10uL en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. El gel se corrió a 90V por 30 min

2. Extracción por lisis con microondas: los extractos en duplicado se muestran en la Figura 6, donde se observa inconsistencia para una misma bacteria. Además, este método parece no ser apto para bacterias Gram-positivas (Figura 6, gel B, carriles 8-9). La metodología original propone hacer una purificación, lo cual se omitió en este estudio.

Figura 6. Extracción de ADN en duplicado por lisis con microondas para las 10 bacterias utilizadas en este estudio.



Geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizaron 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado, 3uL de buffer de carga y 5uL de muestra. Se cargaron 10uL en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. Los geles se corrieron a 90V por 30 min

D. DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS POR PCR-SSCP

El análisis de los polimorfismos conformacionales de una hebra de un producto de amplificación inició con la búsqueda de iniciadores que produjeran fragmentos menores a 500pb para las 10 bacterias (Cuadro 9). Además, se evaluaron las características generales de los iniciadores: la formación de estructuras de lazo (Cuadro 10) y la formación de dímeros con él mismo y con el otro iniciador (Cuadros 11, 12 y 13).

Cuadro 9. Información de iniciadores para la amplificación de un segmento del gen 16S ARNr

| Iniciador | Dirección | Secuencia (5' – 3') | Amplicón* | T _M | Contenido GC % |
|-----------|-----------|------------------------|-----------|----------------|-------------------|
| Com1 | F | CAGCAGCCGCGGTAATAC | 407 | 58.4 | 61.1 |
| Com2 | R | CCGTCAATTCCTTTGAGTT | | 54.3 | 50.0 |
| ER10 | F | GCGGACGGGTGAGTAA | 255 | 57.2 | 64.7 |
| ER11 | R | ACTGCTGCCTCCCGTAG | | 57.2 | 64.7 |
| P11P | F | GAGGAAGGTGGGATACGT | 216 | 62.5 | 60.0 |
| P13P | R | AGGCCCGGGAACGTATTCAC | | 62.5 | 60.0 |

*Aproximado utilizando como base la amplificación de *E. coli*.

Cuadro 10. Formación de estructuras de lazo y su ΔG para los seis iniciadores

| Estructura | ΔG (Kcal/mol) de iniciadores | | | | | |
|------------|--------------------------------------|-------|------|------|------|-------|
| | Com1 | Com2 | ER10 | ER11 | P11P | P13P |
| 1 | -0.22 | -0.99 | 0.64 | 0.88 | 0.62 | -1.87 |
| 2 | | -0.75 | 1.53 | 1.04 | | |
| 3 | | | 1.56 | 1.55 | | |
| 4 | | | | 1.56 | | |

Cuadro 11. Análisis de la formación de homodímeros y heterodímeros para los iniciadores Com1 y Com2

| Estructura | Com1 | | Com1 y Com2 | | Com2 | |
|------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| | Homodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) | Heterodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) | Homodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) |
| 1 | 6 | -16.5 | 3 | -6.68 | 4 | -5.47 |
| 2 | 2 | -3.61 | 2 | -3.61 | 4 | -5.36 |
| 3 | 2 | -3.14 | 3 | -3.42 | 2 | -3.61 |
| 4 | 3 | -2.3 | 2 | -3.07 | 2 | -1.94 |
| 5 | 2 | -1.47 | 2 | -1.95 | 2 | -1.6 |
| 6 | 2 | -0.96 | 2 | -1.94 | | |
| 7 | | | 2 | -1.6 | | |

Cuadro 12. Análisis de la formación de homodímeros y heterodímeros para los iniciadores ER10 y ER11

| Estructura | ER10 | | ER10 y ER11 | | ER11 | |
|------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| | Homodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) | Heterodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) | Homodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) |
| 1 | 2 | -3.61 | 5 | -11.09 | 2 | -3.61 |
| 2 | 2 | -3.14 | 3 | -6.68 | 2 | -3.14 |
| 3 | 2 | -1.34 | 3 | -6.21 | 2 | -1.6 |
| 4 | 2 | -0.96 | 3 | -4.64 | 2 | -1.34 |
| 5 | | | 3 | -3.17 | 2 | -0.96 |
| 6 | | | 2 | -3.14 | | |
| 7 | | | 2 | -3.07 | | |
| 8 | | | 2 | -1.6 | | |
| 9 | | | 2 | -1.34 | | |

Cuadro 13. Análisis de la formación de homodímeros y heterodímeros para los iniciadores P11P y P13P.

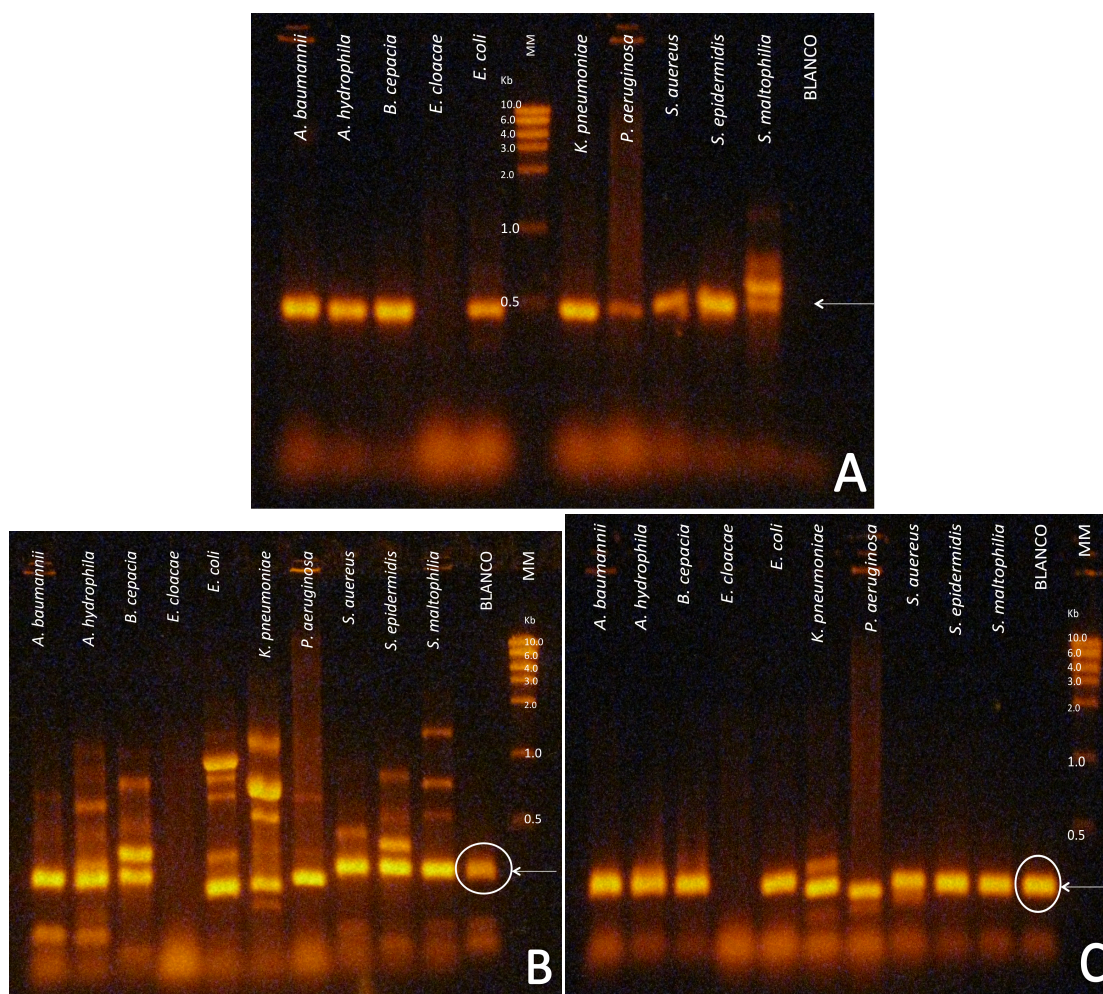
| Estructura | P11P | | P11P y P13P | | P13P | |
|------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| | Homodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) | Heterodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) | Homodímero (pb) | ΔG (Kcal/mol) |
| 1 | 4 | -6.3 | 6 | -8.73 | 6 | -15.89 |
| 2 | 2 | -1.47 | 3 | -6.14 | 4 | -9.28 |
| 3 | 2 | -1.34 | 2 | -3.61 | 4 | -6.3 |
| 4 | 2 | -0.96 | 3 | -3.52 | 2 | -3.61 |
| 5 | | | 3 | -3.3 | 3 | -3.52 |
| 6 | | | 2 | -3.07 | 2 | -3.07 |
| 7 | | | 2 | -1.57 | 2 | -1.47 |
| 8 | | | 2 | -1.34 | 2 | -1.34 |
| 9 | | | | | 2 | -0.96 |

La amplificación *in silico* (Anexo D) mostró un alto porcentaje de coincidencia entre los sets de iniciadores y el gen objetivo, excepto para P11P y P13P con *A. baumannii* y *S. epidermidis*, donde no hubo amplificación. Además, se observa un aproximado del producto y la T_m de cada iniciador respecto a la bacteria que se está analizando. De acuerdo a estos resultados, se optó por evaluar los tres sets en el laboratorio y optimizar su amplificación.

Los productos de la amplificación con los tres sets de iniciadores a una concentración de 1uM para cada uno, puede observarse en la Figura 7; ER10 y ER11 (A), Com1 y Com2 (B), y P11P y P13P (C). No se obtuvo producto de amplificación para *B. cepacia* con ninguno de los tres sets. En cada gel es evidente la formación de dímeros y bandas inespecíficas, así como contaminación del blanco para las amplificaciones con los últimos dos sets de iniciadores (B y C). También se utilizó una concentración de 10uM para cada iniciador, según lo recomendado por la literatura, sin embargo, solamente siete bacterias presentaron amplificación (Anexo D) y la formación de dímeros fue aun mayor.

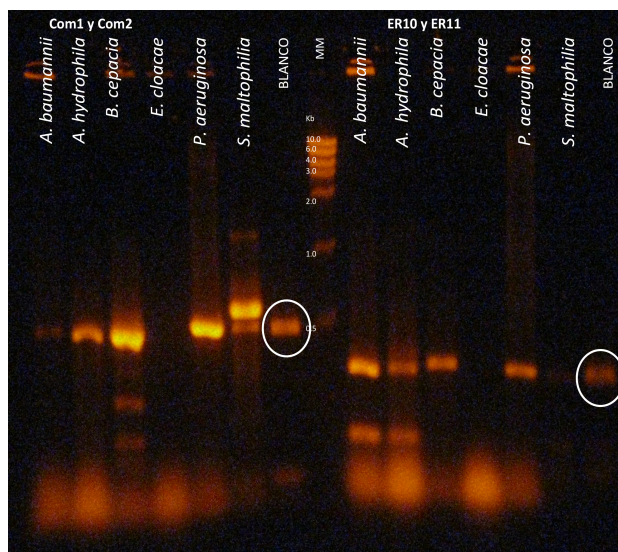
A partir de estos resultados, se optó por utilizar una concentración de 0.5uM para cada iniciador, y verificar la contaminación de los blancos. Se utilizó el ADN extraído de *A. baumannii*, *A. hydrophila* y *B. cepacia* como punto de comparación; además, se utilizó la mitad de concentración de ADN para *E. cloacae*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*. Como se muestra en la Figura 8, la contaminación para los iniciadores Com1 y Com2 se volvió a presentar, y además, surgió blanco contaminado para los iniciadores ER10 y ER11.

Figura 7. Amplificación para las 10 bacterias con los tres sets de iniciadores a una concentración de 1uM y temperatura de anillamiento a 55°C



Geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizaron 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado y 5uL del producto de amplificación. Se cargaron 8uL en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. Los geles se corrieron a 90V por 30 min. La flecha indica la posición aproximada de la banda esperada. Los círculos indican una banda no esperada debido a contaminación. A: iniciadores ER10 y ER11. B: iniciadores Com1 y Com2. C: iniciadores P11P y P13P.

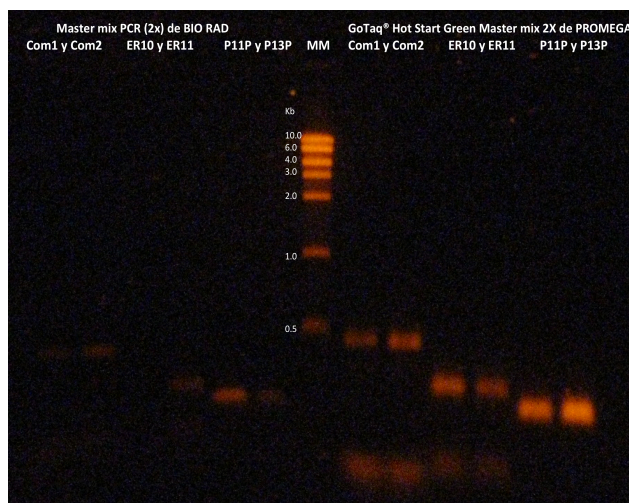
Figura 8. Amplificación para bacterias seleccionadas con concentración de iniciadores de 0.5uM, y temperatura de anillamiento a 55°C.



Gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizó 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado, y 5uL de muestra. Se cargaron 8uL en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. Los geles se corrieron a 90V por 30 min. Los círculos indican una banda no esperada debido a contaminación del blanco.

La optimización de la amplificación fue suspendida hasta determinar el foco de contaminación; que dio inicio con el cambio de reactivos para PCR, y el agua DEPC utilizada. Para esto, solamente se evaluaron blancos para cada iniciador con cada una de las mezclas de reacción preparadas comercialmente. De acuerdo a la Figura 9, hubo contaminación aun con los nuevos reactivos y nuevas alícuotas de agua. La intensidad de las bandas fue mayor para los productos de amplificación a partir de GoTaq® Hot Start Green Master mix 2X de PROMEGA. Estos resultados permitieron descartar a los reactivos como el foco de contaminación.

Figura 9. Amplificación de blancos con concentración de iniciadores a 0.5uM, temperatura de anillamiento a 55°C, con nuevas mezclas de reacción comerciales



Gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizó 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado, y 5uL de muestra. Se cargaron 8uL en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. Los geles se corrieron a 90V por 30 min.

A continuación, se realizó una profunda limpieza del equipo utilizado para la preparación de las mezclas de reacción; aunque la intensidad de las bandas disminuyó, no se eliminó por completo la banda (no se muestra el gel). Se procedió con la preparación de las mezclas en un laboratorio ajeno al trabajo con bacterias, los resultados de esta amplificación se muestran en la Figura 10, donde se observa que hay bandas para los iniciadores ER10 - ER11 y P11P - P13P. La siguiente prueba fue la confirmación de la contaminación de las soluciones stock de los iniciadores; se prepararon nuevas alícuotas en el laboratorio ajeno al trabajo con bacterias. La amplificación de blancos no mostró ninguna banda para ni uno de los tres sets de iniciadores (Figura 11, A); sin embargo, sí se presentaron bandas para la amplificación de blancos con las nuevas alícuotas de trabajo, cuando fueron utilizadas en el laboratorio original (Figura 11, B).

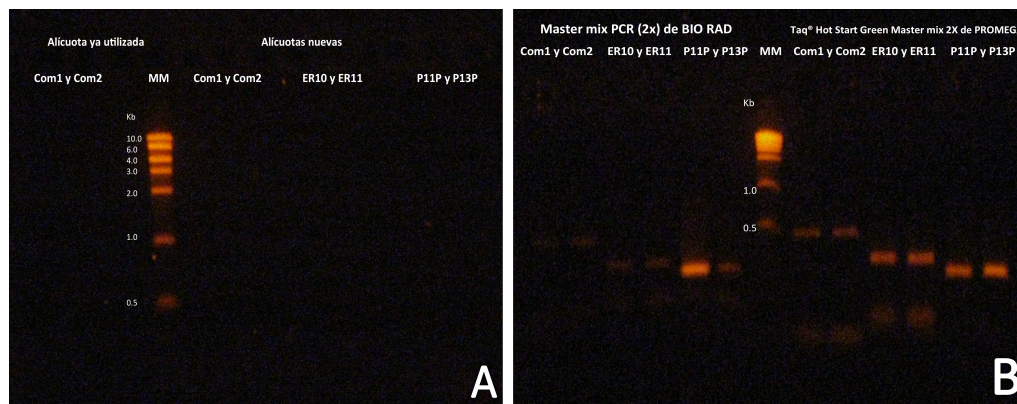
Estos resultados dieron inicio a pequeñas reformas en el laboratorio, de manera que pudiera eliminarse o al menos reducirse la contaminación. A partir de esto, se continuó con la amplificación de las 10 bacterias, con los tres sets de iniciadores (Figura 12); en los tres geles se observa la ausencia de la banda indicadora de contaminación. Además, no se obtuvo amplificación para la bacteria *Enterobacter cloacae* para los tres sets de iniciadores, y tampoco para la bacteria *Staphylococcus aureus* para los sets de iniciadores Com1-Com2 y ER10-ER11.

Figura 10. Amplificación de blancos con concentración de iniciadores a 0.5uM, temperatura de anillamiento a 55°C, preparados en un laboratorio ajeno al trabajo con bacterias, y sus reactivos.



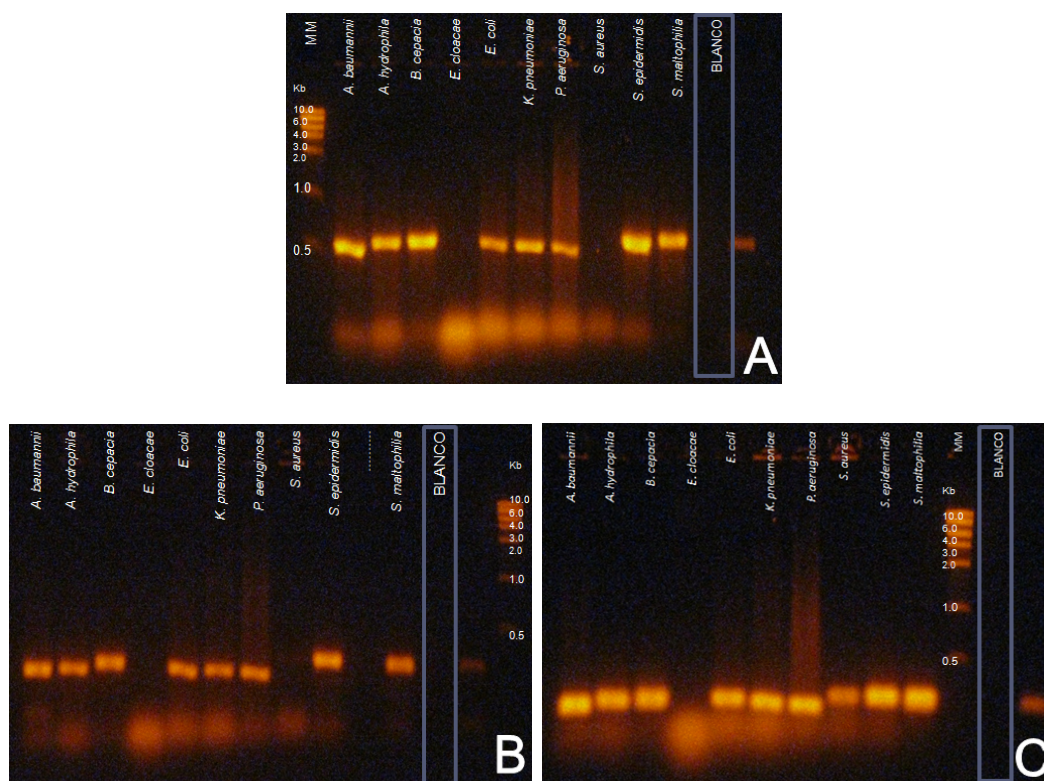
Gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizó 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado, y 5uL de muestra. Se cargaron 8uL en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. Los geles se corrieron a 90V por 30 min. Los círculos indican bandas debido a contaminación.

Figura 11. Amplificación de blancos con nuevas alícuotas de iniciadores a 0.5uM, temperatura de anillamiento a 55°C, preparados en un laboratorio ajeno al trabajo con bacterias, y sus reactivos (A) y preparados con mezclas de reacción comerciales en el laboratorio original (B)



Geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizaron 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado y 5uL del producto de amplificación. Se cargaron 8uL en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. A: el gel se corrió a 90V por 30 min. B: el gel se corrió a 90V por 18 min.

Figura 12. Amplificación para las 10 bacterias con los tres sets de iniciadores a una concentración de 0.5uM y temperatura de anillamiento a 55°C.



Geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizaron 3uL de GelRed 100X en cada muestra para el revelado y 5uL del producto de amplificación. Se cargaron 8uL en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3uL de GelRed 100X. Los geles se corrieron a 90V por 30 min. Los recuadros indican el carril libre de banda debido a contaminación. A: iniciadores Com1 y Com2. B: iniciadores ER10 y ER11. C: iniciadores P11P y P13P.

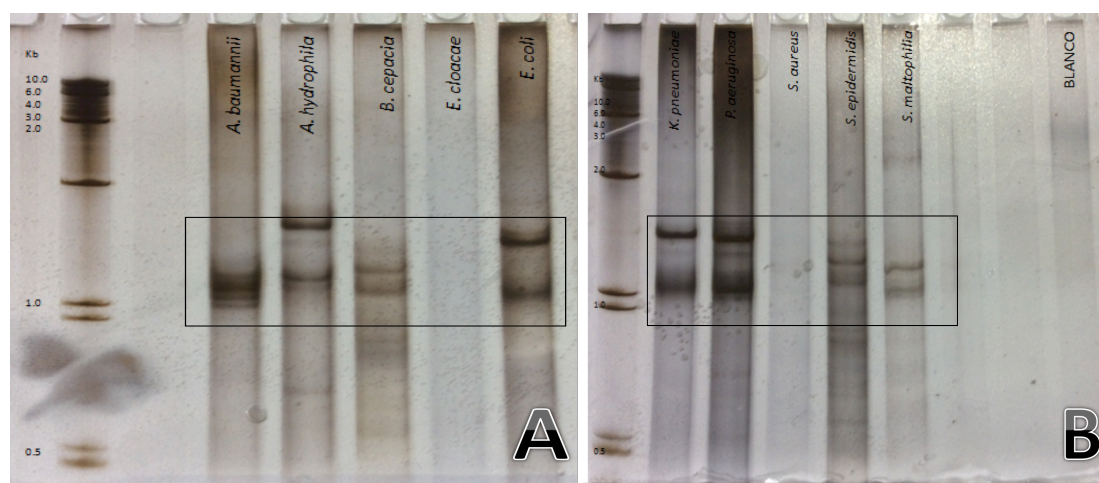
La factibilidad de la técnica de polimorfismo de conformación de cadena sencilla para la diferenciación de las 10 bacterias inició con la evaluación de las condiciones de corrida para la electroforesis descritas en Widjoatmodjo *et al.* (1994), por lo que solamente se utilizaron los productos de la amplificación con los iniciadores Com1 y Com2; sin embargo, las condiciones de corrida para la electroforesis no permitieron la resolución de las bandas de interés, que se creía eran las bandas dentro del recuadro negro de la Figura 13; estos geles también muestran la ausencia de productos de amplificación de *E. cloacae*, lo cual coincide con lo geles de agarosa previamente mostrados.

En este punto es importante recordar que los fragmentos de interés son de menos de 500pb, por lo que, según la Figura 13, ya no estaban presentes en el gel al momento de teñirlos. A partir

de esto se realizaron múltiples electroforesis con una serie de condiciones modificando el tiempo y el voltaje de corrida: 20mAmp por 120 min, 25mAmp por 90min, 35mAmp por 45min y 40mAmp por 40min (estos geles no se muestran). Debido al equipo utilizado para estas pruebas, cuando se utilizaba el voltaje constante se presentaban bandas poco definidas, por esta razón se optó por utilizar el amperaje constante.

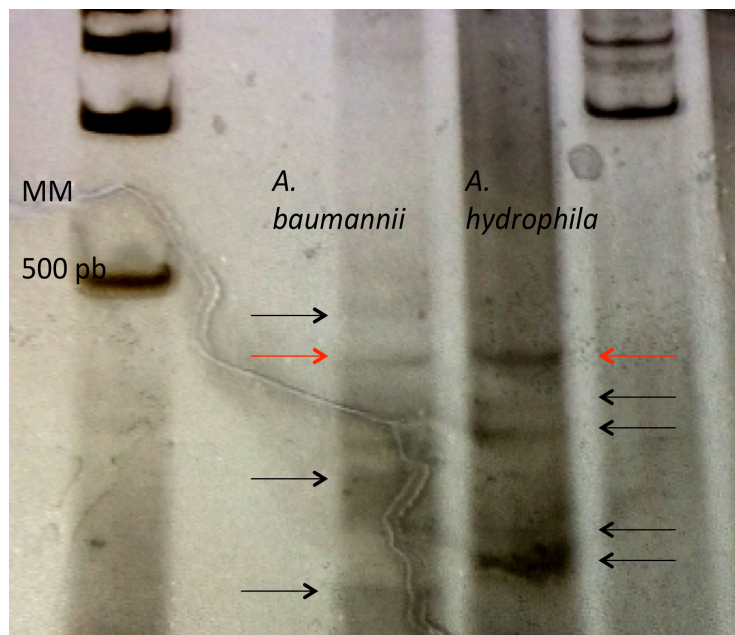
La mejor resolución para los fragmentos de *A. baumannii* y *A. hydrophila* amplificados, se obtuvo corriendo los geles de poliacrilamida por 30 minutos a 40mAmp (Figura 14). Con esto, se obtuvo bandas distintivas para cada una de las bacterias por lo que, potencialmente, se tiene un método que permite la diferenciación entre las bacterias utilizadas en este estudio.

Figura 13. Detección de patrones SSCP para la amplificación de las 10 bacterias con los iniciadores Com1 y Com2.



Geles de poliacrilamida al 20% (TBE 5X, APS 25%, glicerol 10% y TEMED). Se cargaron 3uL del producto con 1uL de buffer de carga. Se utilizó 3uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 1uL de buffer de carga. Se realizó un protocolo convencional para la tinción del gel. El gel se corrió por 30min a 40mAmp. Las 10 bacterias se separaron en dos geles: A y B que se corrieron en el mismo equipo al mismo tiempo.

Figura 14. Detección de patrones SSCP para la amplificación de *A. baumannii* y *A. hydrophila* con los iniciadores Com1 y Com2.



Gel de poliacrilamida al 20% (TBE 5X, APS 25%, glicerol 10% y TEMED). Se cargaron 3uL del producto con 1uL de buffer de carga. Se utilizó 3uL de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 1uL de buffer de carga. Se realizó un protocolo convencional para la tinción del gel. El gel se corrió por 2 horas y 30 minutos a 90V.

VII. DISCUSIÓN

A. SELECCIÓN DEL MÉTODO

Seleccionar el método ideal para la diferenciación de las 10 bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR fue uno de los objetivos de este estudio; tras una búsqueda de literatura, se encontró que existen múltiples métodos que permiten la identificación de una bacteria (Fook *et al.* 2012; Miyoshi-Akiyama *et al.* 2013; Papaleo 2010; Widjoatmodjo *et al.* 1994). Los más comunes son listados en el Cuadro 5; no obstante, día a día emergen nuevos métodos que intentan reducir el impacto económico y social de estas infecciones (Endimiani *et al.* 2011), debido a la tecnología empleada de estas novedosas técnicas, económicamente es poco factible emplearlo para el diagnóstico en un país como Guatemala. Por estas razones, el análisis de métodos seleccionados se basó en tres grandes parámetros: costos, tiempo de ejecución y disponibilidad del equipo en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, donde se llevó a cabo el estudio. Estos parámetros fueron elegidos debido a la necesidad de reducir el tiempo que toma identificar las bacterias, de manera que también puedan reducirse los costos causados por días de hospitalización en el intensivo pediátrico de UNICAR.

La mayoría de métodos utilizados en la actualidad exigen equipo sofisticado que, dados los recursos con los que se cuentan, no es posible utilizarlos en este estudio. Un ejemplo de ello, es la tipificación multilocus de secuencias, que requiere amplificar diversas regiones de diferentes genes para que después sean secuenciadas. Este método, aunque mucho más exacto que la secuenciación del gen 16S ARNr (Elgaml *et al.* 2013), es más costoso, debido al múltiple uso de iniciadores para una sola bacteria. Además, debe mencionarse que el problema principal con métodos que involucran la secuenciación, es el tiempo que se lleva en ejecutarlos, y debe recordarse que este debe ser menor que aquel que toman las técnicas microbiológicas convencionales (3 – 4 días). Uno de los métodos más utilizados en la actualidad para la identificación de bacterias consiste en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, debido principalmente a su rapidez; sin embargo, el elevado costo del equipo y los reactivos, lo hacen inadecuado para este estudio.

La amplificación múltiple por PCR fue uno de los métodos que cumplió el análisis preliminar (Cuadro 5); sin embargo, los iniciadores seleccionados también amplificaban regiones de otras bacterias, por lo que había productos inespecíficos. Por esta razón, se optó por la división de las 10 bacterias, en dos grupos de cinco. Para el primer grupo de bacterias (Cuadro 6), la búsqueda de iniciadores se basó en seleccionar aquellos que además de amplificar fragmentos lo suficientemente diferentes para ser reconocidos por electroforesis en geles, tuvieran las mismas condiciones de amplificación; sin embargo, al realizar el PCR in silico se obtuvieron múltiples bandas inespecíficas a partir de reacciones cruzadas.

La digestión del gen 16S ARNr con enzimas de restricción para generar fragmentos específicos para cada bacteria no puede utilizarse en este estudio, ya que dos son sensibles a metilaciones (BspEI y EaeI); además, las diferencias en los fragmentos originados por EcoP15I, NspI y XmnI no son suficientes para ser visualizados por electroforesis en geles de agarosa. La enzima restante, StuI, sí produce fragmentos de diferentes tamaños para ocho bacterias; sin embargo, no digiere a *S. aureus* ni a *S. epidermidis*, y no existe otra enzima que sí digiera a ambas. El uso de una doble digestión no fue considerada por el hecho de que no solo aumenta el tiempo de ejecución (además del tiempo utilizado para la amplificación del gen 16S ARNr y la incubación para la digestión), sino también, el aumento de los costos.

La simplicidad de PCR-SSCP es la mayor ventaja sobre otros métodos moleculares para la identificación de bacterias, debido al alto poder de resolución de la electroforesis en poliacrilamida, ya que esta permite detectar cambios conformacionales causados por la sustitución de una sola base en una secuencia dada (Hayashi 1991).

B. EXTRACCIÓN DE ADN

La importancia de evaluar diferentes métodos para la extracción de ADN de las 10 bacterias, se debe a que estos extractos serán utilizados como control positivo, una vez el método seleccionado sea adaptado a la identificación de bacterias causantes de infecciones nosocomiales a partir de muestras clínicas. El método por lisis con microondas fue reportado como el ideal para ser utilizado como plantilla para amplificaciones por la reacción en cadena de la polimerasa (Ahmed *et al.* 2014); a pesar de reportar que este método es efectivo tanto para bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, según la Figura 6, hubo poca consistencia extrayendo ADN de *S. aureus* y *S. epidermidis*, las dos únicas bacterias Gram-positivas; esto podría deberse a que el protocolo original sugiere utilizar una potencia de 900W para el microondas, y la potencia del equipo utilizado se desconoce, por lo que pudo ser tan débil que no

lisó la pared de peptidoglicano que las compone. Además, se omitió la purificación orgánica sugerida, debido principalmente al tiempo extra que tomaría realizarlo.

La extracción de ADN por ebullición es un método rápido y económico, por estas razones fue considerado para ser incluido en el estudio. La simpleza de este método promueve la degradación de ADN; sin embargo, la región de interés que se desea amplificar es relativamente pequeña (alrededor de 1500 pb), por lo que esto no afecta el resultado deseado.

C. DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS POR PCR-SSCP

El objetivo general de este estudio consiste en evaluar la factibilidad de PCR-SSCP para la diferenciación de bacterias a partir de variaciones en la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida; debido a que la sensibilidad de esta técnica depende del tamaño de los fragmentos amplificados (Sunnunks *et al* 2000), era necesario un análisis profundo de los iniciadores que fueran a utilizarse para la amplificación. Publicaciones sobre la rápida identificación de bacterias (Widjoatmodjo *et al.* 1994) y análisis de comunidades bacterianas (Schwieger & Tebbe 1998) a través de PCR-SSCP, describen sets de iniciadores para amplificar regiones variables del gen 16S ARNr, por lo que se procedió a evaluar su uso para los fines de este estudio. Como se mencionó anteriormente, era importante que los fragmentos amplificados por estos iniciadores no superaran las 500pb (Cuadro 9).

El rendimiento del PCR fue estimado con base en el análisis de la formación de estructuras de lazo, homodímeros y heterodímeros (Cuadros 10, 11, 12 y 13); según estos resultados, el set de iniciadores Com1-Com2, podría presentar los más grandes problemas de rendimiento, ya que presenta hasta siete estructuras con el más bajo AG. Los otros dos sets de iniciadores analizados también presentan problemas de formación de estructuras, que involucran hasta seis bases; a pesar de estos resultados, se continuó con el análisis bioinformático, debido a que existe evidencia de su funcionamiento, en donde los autores de esos estudios parecen contrarrestar esos problemas utilizando concentraciones mayores.

La amplificación *in silico* confirmó el apareamiento de los tres sets de iniciadores con la secuencia del gen 16S ARNr de las 10 bacterias, excepto los iniciadores P11P con *A. baumannii*, y P13P con *S. epidermidis*. El mejor porcentaje de apareamiento y las T_M ideales las presentó el set ER10-ER11, coincidiendo también con los mejores resultados sobre la formación de estructuras. El set Com1-Com2 también presentó apareamientos aceptables; sin embargo, las T_M está lejos de llegar a ser las ideales para una amplificación por PCR. A pesar de los poco favorables resultados obtenidos con la amplificación *in silico* para los iniciadores Com1-Com2 y

P11P-P13P, fueron considerados para su análisis en el laboratorio, de manera que pudieran ser utilizados como punto de comparación para el set ER10-ER11.

La excesiva cantidad de estructuras indeseadas que forman los iniciadores, contribuyó a utilizarlos a concentraciones mayores a las que generalmente se usan (Figura 7 y Anexo E); sin embargo, no hubo diferencia considerable entre las dos concentraciones utilizadas, excepto en la intensidad de las bandas correspondientes a los productos inespecíficos. Además, cabe mencionar que a pesar del análisis bioinformático que indicaba falta de amplificación para las bacterias *A. baumannii* y *S. epidermidis* con los iniciadores P11P-P13P, sí hubo amplificación *in vitro*; caso contrario con *E. cloacae*, la cual no presentó ni una sola banda con ninguno de los tres iniciadores; una de las razones podría ser la falta de ADN, sin embargo, en la Figura 5 puede observarse que sí hubo extracción para todas las bacterias. El exceso de ADN también fue considerado, por lo que se repitió con una dilución 1:2 (Figura 8); debido a que tampoco hubo amplificación, se evaluó la posibilidad de que el ADN extraído tuviera inhibidores de la reacción.

Durante la revisión de literatura no se encontró ninguna razón para la falta de amplificación de *E. cloacae*, lo cual sugiere que el problema sea por la cepa utilizada. Esta dificultad encontrada con *E. cloacae* resalta la importancia de ampliar el número de bacterias que se intentan diferenciar en este estudio y, por supuesto, incluir diversas cepas de ellas; también es necesario incluir cepas ATCC (*American Type Culture Collection*); asimismo, debe considerarse el uso de ADN no procariota para apoyar la confiabilidad de este método.

El problema principal con las primeras amplificaciones se dio debido a la contaminación del blanco, con los iniciadores Com1-Com2 y P11P-P13P; para descartar a los reactivos como el foco de contaminación, se utilizaron nuevas mezclas de reacción comerciales (Figura 9); donde también se presentó contaminación. Debido a la alta especificidad de la polimerasa incluida en GoTaq® Hot Start Green Master mix 2X de PROMEGA, la intensidad de las bandas es mayor que aquellas en las que se utilizó Master mix PCR (2x) de BIO RAD.

Tras una serie de pruebas se determinó que el foco de contaminación es el propio laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica y Microbiología, donde se llevan a cabo diferentes estudios con bacterias, y el equipo es utilizado por estudiantes de diferentes cursos, con lo que no existe un área específica libre de ADN. A partir de estos resultados, se inició con una serie de reformas para reducir en lo más posible, las fuentes de contaminación dentro del laboratorio, de manera que haya un espacio específico para llevar a cabo no solo este estudio, si no el proyecto en general.

Una vez eliminado el problema de la contaminación durante esta investigación, se continuó con la optimización de las amplificaciones para los tres sets de iniciadores, de manera que el mejor set fuera seleccionado tras el análisis de la migración electroforética de los polimorfismos

conformacionales de hebras simples de sus productos de amplificación. Debido a la falta de recursos, se optó por seleccionar solo un set de iniciadores para llevar a cabo las pruebas preliminares para la detección de patrones SSCP. Para esto, se tomó en cuenta el análisis mostrado en el Anexo E, donde se observa claramente que la mejor alineación de los iniciadores a la secuencia de interés es mejor con Com1 y Com2. Además, los productos de amplificación obtenidos son sutilmente diferentes (Anexo G) entre las 10 bacterias, lo cual es ideal para llevar a cabo esta técnica.

Las pruebas preliminares con la electroforesis en geles de poliacrilamida para dos bacterias (Figura 13) demuestran que sí es factible utilizarlo en el laboratorio para diferenciar patrones de bandeo específicas; sin embargo debe recalcarse que esta técnica involucra diferentes variables que deben ser optimizadas en futuros estudios, para que más adelante puedan iniciarse las pruebas con muestras clínicas.

Para prevenir la contaminación de las muestras a analizar, así como la contaminación cruzada por aerosoles de los productos de amplificación, en el Anexo H se muestra un esquema básico para la construcción y adecuación de un laboratorio de biología molecular, Es importante que al continuar con el proyecto, se tomen estas medidas para evitar pérdida de tiempo y de reactivos como sucedió con esta investigación; asimismo, si esta prueba está destinada para su uso como herramienta de diagnóstico en muestras clínicas, es necesario cumplir requisitos bien establecidos que validen todo el proceso, dentro de los cuales, el flujo correcto de trabajo es indispensable.

VIII. CONCLUSIONES

La extracción de ADN por ebullición es un método rápido, sencillo y económico que permite la obtención de ADN de las 10 bacterias de interés para este estudio.

La simplicidad de PCR-SSCP fue una de las razones por las que se eligió como el método molecular ideal para ser utilizado en este estudio.

Los sets de iniciadores Com1-Com2, ER10-ER11 y P11P-P13P pueden utilizarse para la amplificación de regiones variables del gen 16S ARNr de las 10 bacterias de interés en este estudio.

El set de iniciadores más efectivo para la amplificación por PCR es ER10-ER11, de acuerdo al análisis bioinformático realizado.

La alta tendencia a formar estructuras de lazo, homodímeros y heterodímeros por parte de los iniciadores no interfirió con la amplificación de los fragmentos de interés.

La banda presente en la reacción del blanco fue ocasionada por contaminación del laboratorio donde se llevó a cabo el estudio.

El tamaño de los fragmentos originados por los tres sets de iniciadores, permite obtener alta sensibilidad en la diferenciación de las bacterias por medio de la técnica de SSCP.

El set de iniciadores Com1-Com2 permite la diferenciación entre *A. baumannii* y *A. hydrophila*, de acuerdo al patrón de bandas obtenido

Es factible utilizar el método PCR-SSCP para la diferenciación de 9 bacterias incluidas en este estudio.

IX. RECOMENDACIONES

Utilizar más cepas de bacterias, además de las incluidas en este estudio, para analizar posibles diferencias en el patrón de bandeo en la electroforesis en poliacrilamida.

Extraer regularmente ADN de bacterias para asegurar su función como controles positivos una vez el método sea implementado a muestras clínicas.

Realizar una validación de la amplificación con los tres sets de iniciadores, tomando en cuenta la sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad del método.

Optimizar y validar el método PCR-SSCP antes de ser utilizado con muestras clínicas.

Adecuar un laboratorio específico para este análisis antes de continuar con la siguiente fase del proyecto.

Realizar amplificaciones regulares con los tres sets de iniciadores utilizados en esta prueba para identificar focos de contaminación en los laboratorios del departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, Omar; A. Asghar y M. Elhassan. 2014. <<Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA>>. *African Journal of Microbiology Research*. 8 (6): 598-602.
- Alp; Emine, *et al.* 2011. <<Infection control practice in countries with limited resources>>. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 10: 36.
- Barack, J.D.; K. Sananikone y M.J. Delwiche. 2005. <<Comparison of primers for the detection of pathogenic *Escherichia coli* using real-time PCR>>. *Letters in Applied Microbiology*. 41: 112-118.
- Breidenstein, E.; C. de la Fuente y R. Hancock. 2011. <<*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance>>. *Trends in Microbiology*. 19 (8): 419-426.
- Brooke, Joanna. 2012. <<*Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen>>. *Clinical Microbiology Reviews*. 25 (1): 2.
- Clark, Nina; C. Chenoweth. 2003. <<*Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature>>. *Clinical Infectious Diseases*. 37: 506-513.
- Clifford, Robert, *et al.* 2012. <<Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by Real-Time PCR>>. *PLoS One*. 7(11): e48558.
- Coenye, Tom, *et al.* 2001. <<Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex>>. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (10): 3427-3436.
- Del Cid, José. 1998. <<Incidencia de infecciones nosocomiales en los servicios de área general de medicina interna del hospital Roosevelt>>. Tesis Universidad Francisco Marroquín. 95 págs.
- Denton, Miles; K. Kerr. 1998. <<Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*>>. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (1): 57-80.
- Dijkshoorn, Lenie; A. Nemec y H. Seifert. 2007. <<An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*>>. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 939-951.

- Doit, C, *et al.* 2004. <<Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in a pediatric hospital due to contamination of lipid emulsion stoppers>>. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (5): 2227-2230
- Dunbar, Sherry, *et al.* 2003. <<Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP™ system>>. *Journal of Microbiological Methods*. 53: 245-252.
- Dunbar, Sherry; H. Zhang y T. Yi-Wei. 2013. <<Advanced techniques for detection and identification of microbial agents of gastroenteritis>>. *Clinics in Laboratory Medicine*. 33 (3): 527-552.
- Elgaml, Abdelaziz, *et al.* 2013. <<Analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of Gram negative pathogenic bacteria isolated from urinary tract infections>>. *African Journal of Microbiology Research*. 7(23): 2862-2869.
- Emori, Grace; R. Gaynes. 1993. <<An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory>>. *Clinical Microbiology Reviews*. 6 (4): 428-442.
- Endimiani, Andrea, *et al.* 2011. <<Are we ready for novel detection methods to treat respiratory pathogens in hospital-acquired pneumonia?>>. *Molecular Diagnostics in Pneumonia*. 52 (S4): 373-383
- Fook, Seng, *et al.* 2012. <<Development of a multiplex PCR assay for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia cepacia* complex>>. *Journal of Microbiological Methods*. 90: 305-308.
- Forbes, Betty. 2009. <<Principios generales de microbiología clínica>>. *Diagnóstico Microbiológico*. México: Editorial Médica Panamericana. Pág. 81.
- Garner, Julia; *et al.* 1988. <<CDC, definitions for nosocomial infections, 1988>>. *American Journal of Infection Control*. 16 (3): 128-140.
- Gasser, Robin, *et al.* <<Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation>>. *Nature Protocols*. 1 (6): 3121-3128.
- Gaynes, Robert; J. Edwards. 2005. <<Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli>>. *Healthcare Epidemiology*. 41: 848-854.

- Gomes, R.; P. Teixeira y R. Oliveira. 2014. <<Staphylococcus epidermidis as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies>>. *Biofouling*. 30 (2): 131-141.
- Gorwits, R. *et al.* 2008. <<Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004>>. *Journal of Infection Diseases*. 197 (9): 1226-1234.
- Grazioso, Carlos; S. Santay y E. Jáuregui. 2003. <<Costo de las infecciones intrahospitalarias en áreas de cuidado maternoinfantil de un hospital de la ciudad de Guatemala>>. En *Costo de la infección nosocomial en nueve países de América Latina*, de Roxane Salvatierra-González. Washington, D.C: OPS. Págs: 85-98.
- Grim, C, *et al.* 2013. <<Characterization of *aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes>>. *mBio*. 4 (2): e00064.
- Harbarth, Stephan, *et al.* 1999. <<Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices>>. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 20 (9): 598-603.
- Hayashi, K. 1991. <<PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA>>. *Genome Research*. 1(1): 34-38.
- Hoffmann, Harald; A. Roggenkamp. 2003. <<Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (9): 5306-5318.
- Howard, Aoife, *et al.* 2012. <<*Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen>>. *Virulence*. 3 (3): 243-250.
- Humphries, Steve, *et al.* 1997. <<Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia>>. *Clinical Chemistry*. 43 (3): 427-435.
- Jayavignesh, V.; K. Sendesh y A. Bhat. 2011. <<Biochemical characterization and cytotoxicity of the *Aeromonas hydrophila* isolated from catfish>>. *Archives of Applied Science Research*. 3 (3): 85-93
- Khan, Ashraf; Carl Cerniglia. 1994. <<Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (10): 3739-3745.

- Kharazmi, A. 1991. <<Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*>>. *Immunology Letters*. 30: 201-206
- Klein, Eili; D. Smith y R. Laxminarayan. 2007. <<Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005>>. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (12): 1840-1846.
- Kollef, Marin, *et al.* 1997. <<The impact of nosocomial infections on patient outcomes following cardiac surgery>>. *Clinical Investigations*. 3 (112): 666-675.
- Kraker, Marlieke; P. Davey y H. Grundmann. 2011. <<Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteriemia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe>>. *PLoS Medicine*. 8 (10): e1001104.
- Kubica, M., *et al.* 2008. <<A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages>>. *PLoS One*. 3: e1409.
- Lima, Leonora. 2004. <<Determinación de posibles fuentes de infección nosocomial en unidades de cuidados intensivos pediátricos del Hospital General San Juan de Dios>>. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. 50 págs.
- Lu, Qin, *et al.* 2014. <<*Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes>>. *Critical Care*. 18:R17.
- Madden, T. 2002. <<The BLAST sequence analysis tool>>. The NCBI Handbook. Maryland
- Mejia, Carlos, *et al.* 2003. <<Impacto económico de las infecciones nosocomiales en un hospital universitario de la ciudad de Guatemala>> En *Costo de la infección nosocomial en nueve países de América Latina*, de Roxane Salvatierra-González. Washington, D.C: OPS. Págs: 99-112.
- Miyoshi-Akiyama, Tohru, *et al.* 2013. <<Multilocus Sequence Typing (MLST) for Characterization of *Enterobacter cloacae*>>. *PLoS one*. 8(6): e66358
- Mulvey, Michael; A. Simor. 2009. <<Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?>>. *Canadian Medical Association Journal*. 180 (4): 408-415.
- Murphy, Caitlin; S. Clegg. 2012. <<*Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation>>. *Future Microbiology*. 7 (8): 991-1002.

- Musil, Ian, *et al.* 2010. <<*Enterobacter cloacae* infection of an expanded polytetrafluoroethylene femoral-popliteal bypass graft: a case report>>. *Journal of Medical Case Reports*. 4 (1): 131-134.
- National Center for Biotechnology Information. PCR. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechPCR.shtml> [05 de abril de 2014]
- Obritsch, Marilee, *et al.* 2005. <<Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options>>. *Pharmacotherapy*. 25 (10): 1353-1364.
- Otto, Michael. 2012. <<Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections>>. *Seminars Immunopathology*. 34: 201-214.
- Organización Mundial de la Salud. 2003. *Prevención de las infecciones nosocomiales*. Malta. Minimum graphics. 71 págs.
- Papaleo, Maria, *et al.* 2010. <<Identification of species of the *Burkholderia cepacia* complex by sequence analysis of the *hisA* gene>>. *Journal of Medical Microbiology*. 59: 1163-1170.
- Pei, Anna, *et al.* 2010. <<Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (12): 3886-3897
- Peleg, Anton; D. Hooper. 2010. <<Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria>>. *The New England Journal of Medicine*. 362: 1804-1813.
- Podschun, R; U. Ullmann. 1998. <<*Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors>>. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (4): 589-603.
- Poole, K. 2001. <<Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms>>. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*. 3 (2): 255-264.
- Queipo-Ortuño, Maria, *et al.* 2008. <<Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis>>. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15 (2): 293-296
- Richards, Michael, *et al.* 1999. <<Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States>>. *Pediatrics*. 103 (4): e39

- Rosenthal *et al.* 2012. <<International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009>>. *American Journal of Infection Control*. 40: 396-407.
- Samonis, George, *et al.* 2012. <<*Stenotrophomonas maltophilia* infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome>>. *PLoS One*. 7 (5): e37375
- Sartor, Catherine, *et al.* 2002. <<Nosocomial infections with *Aeromonas hydrophila* from leeches>>. 35: e1-5
- Schoenfelder, Sonja, *et al.* 2010. <<Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen>>. *International Journal of Medical Microbiology*. 300: 380-386
- Schwieger, Frank; C. Tebbe. 1998. <<A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (12): 4870-4876.
- Seaman, Isabel. 2011. <<Costo social de las infecciones nosocomiales>>. *Revista Medica Hondureña*. 79 (3): 155-160
- Senol, E. 2004. <<*Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen>>. *Journal of Hospital Infection*. 57: 1-7.
- Stellwagen, Nancy. 2009. <<Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrilamide gels and in free solution>>. *Electrophoresis*. 30(Suppl 1): S188-S195.
- Sunnucks, P., *et al.* 2000. <<SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology>>. *Molecular Ecology*. 9: 1699-1710.
- Toval, Francisco, *et al.* 2014. <<Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection>>. *Journal of Clinical Microbiology*. 52 (2): 407-418.
- Valaperta, Rea, *et al.* 2010. <<*Staphylococcus aureus* nosocomial infections: the role of a rapid and low-cost characterization for the establishment of a surveillance system>>. *New Microbiologica*. 33: 223-232.
- Vial, Ludovic, *et al.* 2011. <<The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation>>. *Environmental Microbiology*. 13 (1): e1-12.

- Villela, Ana. 2009. <<Lucha contra las infecciones intrahospitalarias>>. *El Periódico*. [Guatemala]. 5 de octubre
- Weinstein, Robert. 1998. <<Nosocomial infection update>>. *Emerging infectious diseases*. 4 (3): 416-420.
- Whitby, Paul, *et al.* 1998. <<Comparison of cultura and PCR for detection of *Burkholderia cepacia* in sputum samples of patients with cystic fibrosis>>. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (6): 1642-1645.
- Widjoatmodjo, Myra; A. Fluit y J. Verhoef. 1994. <<Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism>>. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (12): 3002-3007.
- Yin-Yin, Chen; C. Yi-Chang y C. Pesus. 2005. <<Impact of nosocomial infection on cost of illness and length of stay in intensive care units>>. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 26 (3): 281-287.
- Ziebuhr, Wilma, *et al.* 2006. <<Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen>>. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 28S: S14-S20.

XI. ANEXOS

A. SECUENCIAS FASTA DEL GEN 16S ARNr DE LAS 10 BACTERIAS UTILIZADAS

1. *Acinetobacter baumannii*

```
>gi|506689|gb|U10874.1|AAU10874 Acinetobacter baumannii 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
>Acinetobacter_baumannii
AAAAAATNTCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGGAAGGT
AGCTTGCTACCGGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAAC
ATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTA
ATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCACGATCTGTAGCGGG
TCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAG
CACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCA
CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTAAATCGGATTTACTGGGCGTA
AAGCGTGCCTAGGCGGCTTATTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTTCGATA
CTGGTGAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA
GGAATACCGATGGGGAAGGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTT
AGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATT
GACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCT
TGACATACTAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTACTTGCCAG
CATTTTCGGATGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCA
TCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACACAGCGATG
TGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT
CGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTCCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
CATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGCTAGCCTAACTGCAAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGAT
GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCC
```

2. *Aeromonas hydrophila*

```
>gi|173692|gb|M59148.1|AEORR16SA Aeromonas hydrophila 16S ribosomal RNA
>Aeromonas_hydrophila
NAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGC
AGCGGGAAGTAGCTTGCTACTTTTGGCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCA
GTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCT
TCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGCTCACCAAGGCG
ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCNTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGC
```

CTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACGTTAC
 TCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
 AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGG
 NATTGCAATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA
 GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGATTTGGAGGCTGTG
 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
 ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCNGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGNAACGCGAAGAA
 CCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGG
 TGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGT
 CCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGAACTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGN
 ATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCT
 GCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTGTGAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTC
 CGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
 ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCNTCGGGAGGGCGTTTACC
 ACGGTGTGATTACANGACNNGG

3. *Burkholderia cepia*

>gi|255708544|gb|GQ359110.1| Burkholderia cepacia 16S ribosomal RNA
 gene, complete sequence

>Burkholderia_cepacia

TGAAGCAATTCATATTCCTGTGAGCTTTGAGTGAGCGACCCGGTCTTAACTGAACCGAAAACAGTAACAG
 GTTTAAACTGAAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA
 CGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGT
 AGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTC
 GGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC
 GATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT
 TCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCG
 GAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA
 TTAATGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTGSTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
 CTGCATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCG
 TAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGC
 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGAT
 TCATTTCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAATAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACT
 TACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTGCCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGT
 GCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTC
 CTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
 AAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCC
 GCGAGGGGGAGCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGC
 TGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCG
 TCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGG
 ATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTCCAG
 A

4. *Enterobacter cloacae*

>gi|68989453|gb|DQ089673.1| Enterobacter cloacae strain CP1 16S
 ribosomal RNA gene, complete sequence

>Enterobacter_cloacae

TAGAGTTTGATTATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGCGAACGGTAGCACAG

AGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGA
 TAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTT
 GCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAG
 CTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGGAAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
 AAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAA
 GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
 GTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTG
 AAAGTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
 GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGTGATTTGGAGTTGTGCCCTTGAGGCGT
 GGCTTCGGAGTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGCAT
 TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTC
 TTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
 GTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCA
 GCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTC
 ATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAG
 AGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA
 TCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTCGATTCA
 TGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGA

5. *Escherichia coli*

>gi|174375|gb|J01859.1|ECORRD E.coli 16S ribosomal RNA

>Escherichia_coli

AAATTGAAGAGTTTGTATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGT
 AACAGGAAGAAGCTTGCTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG
 GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCG
 GGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACG
 ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
 CGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG
 CAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT
 TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAAGTGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
 TGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCG
 TGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCC
 TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCCAGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC
 CAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT
 TACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGC
 TGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCT
 TTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA
 CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGA
 CCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
 AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
 CCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTT
 TGTGATTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTT
 A

6. *Klebsiella pneumoniae*

>gi|94958396|gb|DQ470487.1| Klebsiella pneumoniae strain NKU238 16S
 ribosomal RNA gene, complete sequence

>Klebsiella_pneumoniae

CGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAC
 CGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATT
 AGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACA
 CTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
 CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGC
 GGTGAGGTTAATAACCTTGTTCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCA
 AGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGA
 GGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
 CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAAT
 CGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCAGAG
 ATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGT
 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGA
 GACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGT
 CGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATG
 CTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAG
 TAGGTA

7. *Pseudomonas aeruginosa*

>gi|288860101|emb|AM419153.2| *Pseudomonas aeruginosa* 16S rRNA gene,
 strain DS10-129

>*Pseudomonas_aeruginosa*

TTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCT
 TGCTCCTGGATTGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCC
 GGAAACGGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAG
 ATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTG
 GAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGATTGTAAAGCACTT
 TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGTCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACC GGCT
 AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
 GCGTAGGTGGTTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTACTG
 AGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA
 CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
 TAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCG
 CAGCTAACGCGATAAGTTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATG
 CTGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCG
 GGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGC
 CCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCT
 AATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT
 AATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA
 GTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACC GCAAGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTGACTGGG
 GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

8. *Staphylococcus aureus*

>gi|576603|gb|L37597.1|STARGDB *Staphylococcus aureus* 16S ribosomal RNA
 (16S rRNA) gene

```
>Staphylococcus_aureus
ATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTG
CTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTC
GGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGT
CACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATCG
TAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG
GAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATA
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGAT
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAA
ATCTTGACATCCTTTGACAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCA
TGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGT
TGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCG
CGAGGTCAAGCAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCT
GGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCCT
CACACCAGGAGTTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTGCAAGGTGGG
ACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAGT
```

9. *Staphylococcus epidermidis*

```
>gi|90896407|gb|DQ447776.1| Staphylococcus epidermidis strain MSFC 3-
M5-R-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
```

```
>Staphylococcus_epidermidis
AGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAG
ACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATGTTGAACCGCATGGTTCAACAGTGAAA
GACGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA
GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA
AGGTCTTCCGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTGACG
GTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT
CCGGAATTTATGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCACGGCTCAAC
GTGGAGGGTCATTGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGA
AATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGC
GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT
ACGGGGTTTTCCGCCCTTANTGCTGCAGCTAACGCATTAANCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGG
TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCCTTCGGGGGACAGAG
TGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAA
GGGTAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTC
GACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGC
```

10. *Stenotrophomonas maltophilia*

```
>gi|343200117|ref|NR_040804.1| Stenotrophomonas maltophilia strain ATCC
19861 16S ribosomal RNA, complete sequence
```

```
>Stenotrophomonas_maltophilia
GCTCAGAGTGNACGCTGGCAGTAGGCCTAANACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCTTGCTCTC
```

TGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAA
ACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGA
GCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTG
TTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAAC
TTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG
TAGGTGGTTATTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGATGAC
TAGAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCC
ATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAA
NNTAACCGCTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTC
GAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATG
GTGGGAAGTCTAAGGAGACCGCCGGTGCACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGGCCAGGGCTACACACGTAATAAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCA
ATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
ATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGA
GTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTNNNGATGACTGGG
GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCAC

B. ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL GEN 16S ARNr DE LAS 10 BACTERIAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

```

Staphylococcus_epidermidis -----
Staphylococcus_aureus -----
Aeromonas_hydrophila -----
Escherichia_coli -----
Enterobacter_cloacae -----
Klebsiella_pneumoniae -----
Acinetobacter_baumannii -----
Pseudomonas_aeruginosa -----
Burkholderia_cepacia TGAAGCAATTCATATTCCTGTCTGAGCTTTGAGTGAGCGACCGGTTCTTAACTGAACCGAAA
Strenotrophomonas_maltophilia -----

```

```

Staphylococcus_epidermidis -----
Staphylococcus_aureus -----ATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCCTG
Aeromonas_hydrophila -----NAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGG
Escherichia_coli -----AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGG
Enterobacter_cloacae -----TAGAGTTTGATTATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGG
Klebsiella_pneumoniae -----CGCTGGCGGCAGG
Acinetobacter_baumannii -----AAAAAATNTCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGG
Pseudomonas_aeruginosa -----TTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGG
Burkholderia_cepacia ACAGTAACAGGTTTAACTGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATG
Strenotrophomonas_maltophilia -----GCTCAGAGTGNACGCTGGCGGTAGG

```

```

Staphylococcus_epidermidis -----AGACGAGGAGCTTGCTCCTCT----GACGTTAGCG
Staphylococcus_aureus CCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCT----GATGTTAGCG
Aeromonas_hydrophila CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCG
Escherichia_coli CCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTG----CTCTTTGCTGACGAGTG
Enterobacter_cloacae CCTAACACATG-CAAGCGAACGGTAGCACA-GAGAGCTTG----CTCTCGGGTGACGAGTG
Klebsiella_pneumoniae CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACA-GAGAGCTTG----CTCTCGGGTGACGAGCG
Acinetobacter_baumannii CTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAGGTAGCTTG-----CTACCGGACCTAGCG

```

```

Pseudomonas_aeruginosa      CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTG-----CTCCTGGATTTCAGCG
Burkholderia_cepacia        CCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGC----T--TGCACCTGGTGGCGAGTG
Strenotrophomonas_maltophilia CCTAANACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCTTG--CTCTCTGGGTGGCGAGTG
                               . . . .
Staphylococcus_epidermidis  GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAAC
Staphylococcus_aureus      GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAAC
Aeromonas_hydrophila       GCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAA--TTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAAC
Escherichia_coli           GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA--CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAAC
Enterobacter_cloacae       GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA--CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAAC
Klebsiella_pneumoniae      GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA--CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAAC
Acinetobacter_baumannii    GCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAAT--CTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAG
Pseudomonas_aeruginosa     GCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAT--CTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAAC
Burkholderia_cepacia       GCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAAC--ATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAG
Strenotrophomonas_maltophilia GCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAAT--CTACTCTGTCTGGGGGATAACGTAGGGAAAC
                               ***.***** ** . * *.:* *. : *: **** *.* ****
Staphylococcus_epidermidis  CGGAGCTAATACCGGATAACATGTTGAACCGCATGGTTCAACAGTGAAAGACGGTCTTGC
Staphylococcus_aureus      CGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGC
Aeromonas_hydrophila       GACTGCTAATACCGCATAACGCTACGGG-----GGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCC
Escherichia_coli           GGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGA-----CCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC
Enterobacter_cloacae       GGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGA-----CCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC
Klebsiella_pneumoniae      GGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGA-----CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCC
Acinetobacter_baumannii    GGATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGG-----AGAAAGCAGGGGATCTTCGGACC
Pseudomonas_aeruginosa     GGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGGG-----AGAAAGTGGGGGATCTTCGGACC
Burkholderia_cepacia       CCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGA-----TGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCC
Strenotrophomonas_maltophilia TTACGCTAATACCGCATAACGATCTACGGA-----TGAAAGCAGGGGATCTTCGGACC
                               . ***** **.. .. **.. *.... *
Staphylococcus_epidermidis  TGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAG
Staphylococcus_aureus      TGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAG
Aeromonas_hydrophila       TTGCGCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAG
Escherichia_coli           TCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAG
Enterobacter_cloacae       TCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAG
Klebsiella_pneumoniae      TCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAG
Acinetobacter_baumannii    TTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
Pseudomonas_aeruginosa     TCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
Burkholderia_cepacia       TCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG

```

```

Strenotrophomonas_maltophilia      TTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAG
*   .* :: ...*   . * . .   *****:*** ..***** ***   ***:**

Staphylococcus_epidermidis         GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Staphylococcus_aureus              GCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Aeromonas_hydrophila               GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Escherichia_coli                   GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Enterobacter_cloacae               GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Klebsiella_pneumoniae              GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Acinetobacter_baumannii            GCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
Pseudomonas_aeruginosa             GCGACGATCCGTAACCTGGTCTG-GAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
Burkholderia_cepacia               GCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
Strenotrophomonas_maltophilia      GCGACGATCCGTAAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
**..*****   **.* *. *** *****. ** * * *****.***** **

Staphylococcus_epidermidis         AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGC
Staphylococcus_aureus              AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGC
Aeromonas_hydrophila               AGACTCNTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGC
Escherichia_coli                   AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
Enterobacter_cloacae               AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
Klebsiella_pneumoniae              AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
Acinetobacter_baumannii            AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGC
Pseudomonas_aeruginosa             AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
Burkholderia_cepacia               AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
Strenotrophomonas_maltophilia      AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGC
***** *****.***** ** ..***** * ** * ***   ***

Staphylococcus_epidermidis         AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACA
Staphylococcus_aureus              AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACA
Aeromonas_hydrophila               CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGG
Escherichia_coli                   CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGG
Enterobacter_cloacae               CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGT
Klebsiella_pneumoniae              CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGC
Acinetobacter_baumannii            CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCT
Pseudomonas_aeruginosa             CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
Burkholderia_cepacia               AATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATC
Strenotrophomonas_maltophilia      CATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATC

```

. * .***** .***:***** * * . * . * ***** . ** * . . * . * . * .

Staphylococcus_epidermidis
Staphylococcus_aureus
Aeromonas_hydrophila
Escherichia_coli
Enterobacter_cloacae
Klebsiella_pneumoniae
Acinetobacter_baumannii
Pseudomonas_aeruginosa
Burkholderia_cepacia
Strenotrophomonas_maltophilia

ATGTGTAAGTAACTATGC-ACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
ATGTGTAAGTAACTGTGC-ACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
TTGATGCCTAATACGTATC-AACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCC
AGTAAAGTTAATACCTTTG-CTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCC
GTTGTGGTTAATAACCACA-GCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCC
GGTGAGGTTAATAACCTTG-TCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCC
ACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACC GGCTAACTCT
CAGTAAGTTAATACCTTGC-TGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACC GGCTAACTTC
CTTGGCTCTAATACGTCG-GGGGATGACGGTACC GGAAGAATAAGCACC GGCTAACTAC
CAGCTGGCTAATACCCGGT-TGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACC GGCTAACTTC
: * : . ***** ** . . : * . ***** ..*****

Staphylococcus_epidermidis
Staphylococcus_aureus
Aeromonas_hydrophila
Escherichia_coli
Enterobacter_cloacae
Klebsiella_pneumoniae
Acinetobacter_baumannii
Pseudomonas_aeruginosa
Burkholderia_cepacia
Strenotrophomonas_maltophilia

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
*****. *** ** .***** ****:*** *****

Staphylococcus_epidermidis
Staphylococcus_aureus
Aeromonas_hydrophila
Escherichia_coli
Enterobacter_cloacae
Klebsiella_pneumoniae
Acinetobacter_baumannii
Pseudomonas_aeruginosa
Burkholderia_cepacia
Strenotrophomonas_maltophilia

GCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTGC
GCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTGC
GCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGNATTGC
GCGCACGCAGGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC
GCGCACGCAGGCGGTTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC
GCGCACGCAGGCGGTTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC
GCGTGCCTAGGCGGCTTATTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTGGGAATTGC
GCGCGCGTAGGTTGGTTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC
GCGTGCCTAGGCGGTTTGSTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC
GCGTGCCTAGGTTGTTATTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGC
*** . ** ** * * * * * : . : ***** ** . *** ** * * . *

```

Staphylococcus_epidermidis      ATTGGAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGGAATTCATGTGTAGCGGTGA
Staphylococcus_aureus           ATTGGAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGGAATTCATGTGTAGCGGTGA
Aeromonas_hydrophila            ATTTAAAACCTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGA
Escherichia_coli                 ATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGA
Enterobacter_cloacae            ATTTGAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGA
Klebsiella_pneumoniae           ATTCGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGA
Acinetobacter_baumannii         ATTCGATACTGGTGAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGA
Pseudomonas_aeruginosa          ATCCAAAACCTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGGAATTCCTGTGTAGCGGTGA
Burkholderia_cepacia            ATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGA
Strenotrophomonas_maltophilia   AGTGGATACTGGATGACTAGAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGA
*      .:  ***.      ..** **.*      *  *****.  .*  .***** *  *****.*****

```

```

Staphylococcus_epidermidis      AATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGA-AGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGA
Staphylococcus_aureus           AATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGA-AGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGA
Aeromonas_hydrophila            AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA-AGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGA
Escherichia_coli                 AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA-AGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGA
Enterobacter_cloacae            AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA-AGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGA
Klebsiella_pneumoniae           AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA-AGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGA
Acinetobacter_baumannii         AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGGGAAGGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGA
Pseudomonas_aeruginosa          AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGA-AGGCGACCACCTGGACTGATACTGA
Burkholderia_cepacia            AATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA-AGGCGCCCCCTGGGCCAATACTGA
Strenotrophomonas_maltophilia   AATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGA-AGGCGACTACCTGGACCAACATTGA
***** *** ** *.****** * * .*** ** .***..*  **** * .: * ***

```

```

Staphylococcus_epidermidis      CGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
Staphylococcus_aureus           CGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
Aeromonas_hydrophila            CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
Escherichia_coli                 CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
Enterobacter_cloacae            CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
Klebsiella_pneumoniae           CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
Acinetobacter_baumannii         CGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT
Pseudomonas_aeruginosa          CACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
Burkholderia_cepacia            CGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
Strenotrophomonas_maltophilia   CACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
*.* ** * * .*****.***** *****  *****  *****  *****

```

```

Staphylococcus_epidermidis      AAACGATGAGTGCTAAGTGTACGGGGTTTCCGCCCTTANTGCTGCAGCTAACGCATTA

```

Staphylococcus_aureus AAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
Aeromonas_hydrophila AAACGATGTTCGATTTGGAGGCTGTGTCCCT-TGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTA
Escherichia_coli AAACGATGTTCGACTTGGAGGTTGTGCCCT-TGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTA
Enterobacter_cloacae AAACGATGTTCGATTTGGA-GTTGTGCCCT-TGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTA
Klebsiella_pneumoniae AAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCT-TGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTA
Acinetobacter_baumannii AAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTT-TGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATA
Pseudomonas_aeruginosa AAACGATGTTCGACTAGCCGTTGGGATCCT-TGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATA
Burkholderia_cepacia AAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTTCAT--TTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGA
Strenotrophomonas_maltophilia AAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAANNTAACGCGTTA
***** . * . . * * * *****.: *

Staphylococcus_epidermidis ANCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
Staphylococcus_aureus AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
Aeromonas_hydrophila AATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCN
Escherichia_coli AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
Enterobacter_cloacae AATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGCATTGACGGGGGCC
Klebsiella_pneumoniae AATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
Acinetobacter_baumannii AGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
Pseudomonas_aeruginosa AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
Burkholderia_cepacia AGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
Strenotrophomonas_maltophilia AGTTGCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
* *****. *****. *.***** *.******.**

Staphylococcus_epidermidis GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTT
Staphylococcus_aureus GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTT
Aeromonas_hydrophila GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGNAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT
Escherichia_coli GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT
Enterobacter_cloacae GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT
Klebsiella_pneumoniae GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT
Acinetobacter_baumannii GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT
Pseudomonas_aeruginosa GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT
Burkholderia_cepacia GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTT
Strenotrophomonas_maltophilia GCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT
***** *****:*****:* **** *.*****.:. ***

Staphylococcus_epidermidis GACATCCTCTGACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTG
Staphylococcus_aureus GACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTG
Aeromonas_hydrophila GACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCG--GGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTG

```

Escherichia_coli      GACATCCACGGAAGTTTTCCAGAGATGAG--AATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTG
Enterobacter_cloacae GACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGA--TTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTG
Klebsiella_pneumoniae GACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGA--TTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTG
Acinetobacter_baumannii GACATACTAGAAACTTTCCAGAGATGGA--TTGGTGCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTG
Pseudomonas_aeruginosa GACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGA--TTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTG
Burkholderia_cepacia GACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTG
Strenotrophomonas_maltophilia GACATGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGA--TTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTG
*****      .*.      *      :*****      .      *      :      *.*.*      *****

```

```

Staphylococcus_epidermidis GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Staphylococcus_aureus      GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Aeromonas_hydrophila      CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Escherichia_coli          CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Enterobacter_cloacae      CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Klebsiella_pneumoniae    CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Acinetobacter_baumannii  CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Pseudomonas_aeruginosa   CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCA
Burkholderia_cepacia     CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Strenotrophomonas_maltophilia CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

```

Staphylococcus_epidermidis ACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAA--AGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACA
Staphylococcus_aureus     ACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAA--AGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACA
Aeromonas_hydrophila     ACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCAAGGGAGACTGCCAGTGATA
Escherichia_coli         ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGG-TCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATA
Enterobacter_cloacae     ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGG-TCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATA
Klebsiella_pneumoniae   ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGG-TTAGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATA
Acinetobacter_baumannii ACCCTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTCG-GATGGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTGACA
Pseudomonas_aeruginosa  ACCCTTGTCTTAGTTGCTACGC-----AAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACA
Burkholderia_cepacia    ACCCTTGTCTTAGTTGCTACGC-----AAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACA
Strenotrophomonas_maltophilia ACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCTAAGGAGACCGCCGGTGACA
**** * : ***: *.* *      *.*.* :*. * : ** **.* **** *

```

```

Staphylococcus_epidermidis AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACA
Staphylococcus_aureus    AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACA
Aeromonas_hydrophila    AACCGGAGGAAGGTGGGNATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGGCCAGGGCTACACA
Escherichia_coli        AACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGACCAGGGCTACACA
Enterobacter_cloacae    AACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGACCAGGGCTACACA

```

Klebsiella_pneumoniae AACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACA
Acinetobacter_baumannii AACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACA
Pseudomonas_aeruginosa AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACA
Burkholderia_cepacia AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACA
Strenotrophomonas_maltophilia AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACA
*** ***** ** * *****.**.***** ***** * . :*****:****

Staphylococcus_epidermidis CGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGTAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAA
Staphylococcus_aureus CGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAA
Aeromonas_hydrophila CGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCCAAAA
Escherichia_coli CGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAA
Enterobacter_cloacae CGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAA
Klebsiella_pneumoniae CGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAA
Acinetobacter_baumannii CGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAA
Pseudomonas_aeruginosa CGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAA
Burkholderia_cepacia CGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAA
Strenotrophomonas_maltophilia CGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCCCAGAAA
*** .***** . ***.***. * :** * ***** . .:*** . * ** **

Staphylococcus_epidermidis GTTGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTA
Staphylococcus_aureus GTTGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTA
Aeromonas_hydrophila GCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTA
Escherichia_coli GTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
Enterobacter_cloacae GTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
Klebsiella_pneumoniae GTATGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
Acinetobacter_baumannii GCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
Pseudomonas_aeruginosa ACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTA
Burkholderia_cepacia ACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
Strenotrophomonas_maltophilia CCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
** *** ***** * * ***** * * .***** *****

Staphylococcus_epidermidis ATCGTAGATCAGC-----
Staphylococcus_aureus ATCGTAGATCAGCATG-CTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCA
Aeromonas_hydrophila ATCGCAAATCAGAATG-TTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
Escherichia_coli ATCGTGGATCAGAATG-CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
Enterobacter_cloacae ATCGTAGATCAGAATG-CTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
Klebsiella_pneumoniae ATCGTAGATCAGAATG-CTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
Acinetobacter_baumannii ATCGCGGATCAGAATG-CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA

```

Pseudomonas_aeruginosa      ATCGTGAATCAGAATG-TCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
Burkholderia_cepacia        ATCGCGGATCAGCATG-CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCA
Strenotrophomonas_maltophilia ATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
**** ..*****.

```

```

Staphylococcus_epidermidis  -----
Staphylococcus_aureus      CACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCG
Aeromonas_hydrophila       CACCATGGGAGTGGGTTCACCAGAAGTAGATAGCTTAACNNTCGGGAGGGCG-TTTACC
Escherichia_coli           CACCATGGGAGTGGGTTCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCG-CTTACC
Enterobacter_cloacae       CACCATGGGAGTGGGTTCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCG-CTTACC
Klebsiella_pneumoniae      CACCATGGGAGTGGGTTCAAAAGAAGTAGGTA-----
Acinetobacter_baumannii    CACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGTAGCTAGCCTAACTGCAAAGAGGGCG-GTTACC
Pseudomonas_aeruginosa     CACCATGGGAGTGGGTTCCTCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACG-GTTACC
Burkholderia_cepacia       CACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACG-GTCACC
Strenotrophomonas_maltophilia CACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCG-CTTGCC

```

```

Staphylococcus_epidermidis  -----
Staphylococcus_aureus      AAGGTGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAGCT-----
Aeromonas_hydrophila       ACGGTGTGATTCANGACNNGG-----
Escherichia_coli           ACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGT
Enterobacter_cloacae       ACTTTGCGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGA-----
Klebsiella_pneumoniae      -----
Acinetobacter_baumannii    ACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGT
Pseudomonas_aeruginosa     ACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGC
Burkholderia_cepacia       ACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGC
Strenotrophomonas_maltophilia ACGGTGTNNNGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGC

```

```

Staphylococcus_epidermidis  -----
Staphylococcus_aureus      -----
Aeromonas_hydrophila       -----
Escherichia_coli           TGGATCACCTCCTTA----
Enterobacter_cloacae       -----
Klebsiella_pneumoniae      -----
Acinetobacter_baumannii    TGGATCACCTCC-----
Pseudomonas_aeruginosa     TGGATCACCTCCTTT----
Burkholderia_cepacia       TGGATCACCTCCTTCCAGA

```

C. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Cuadro 14. Enzimas de restricción que digieren dos sitios de restricción para las 10 bacterias utilizadas.

| <i>A. baumannii</i> | <i>A. hydrophila</i> | <i>B. cepacia</i> | <i>E. cloacae</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. maltophilia</i> |
|---------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-----------------|----------------------|----------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| <u>AccI</u> | <u>AlwI</u> | <u>AlwNI</u> | <u>AfIII</u> | <u>AccI</u> | <u>AfIII</u> | <u>AccI</u> | <u>AfIII</u> | <u>Avall</u> | <u>ApaLI</u> |
| <u>ApoI</u> | <u>AlwNI</u> | <u>ApoI</u> | <u>BanII</u> | <u>AfIII</u> | <u>BanII</u> | <u>Avall</u> | <u>Avall</u> | <u>Bccl</u> | <u>ApoI</u> |
| <u>AvaI</u> | <u>BanII</u> | <u>AseI</u> | <u>BmrI</u> | <u>AvaI</u> | <u>Bpml</u> | <u>AvrII</u> | <u>BaeGI</u> | <u>BseRI</u> | <u>BanI</u> |
| <u>Avall</u> | <u>Bccl</u> | <u>Avall</u> | <u>BsmFI</u> | <u>BanII</u> | <u>BsiEI</u> | <u>BaeGI</u> | <u>Bccl</u> | <u>BssKI</u> | <u>BanII</u> |
| <u>Bcgl</u> | <u>BcII</u> | <u>Bccl</u> | <u>BspEI</u> | <u>BmrI</u> | <u>BsmFI</u> | <u>BanII</u> | <u>Bcgl</u> | <u>BstNI</u> | <u>Bccl</u> |
| <u>Bpml</u> | <u>BmgBI</u> | <u>BcoDI</u> | <u>BsrFI</u> | <u>Bpml</u> | <u>BsmI</u> | <u>BcoDI</u> | <u>Bsp1286I</u> | <u>BtsCI</u> | <u>BciVI</u> |
| <u>Bpu10I</u> | <u>BmrI</u> | <u>BsiHKAI</u> | <u>BtgI</u> | <u>BpuEI</u> | <u>BspEI</u> | <u>BmrI</u> | <u>BsrFI</u> | <u>CviQI</u> | <u>BmrI</u> |
| <u>BsaWI</u> | <u>BpuEI</u> | <u>BsmAI</u> | <u>EaeI</u> | <u>BsmFI</u> | <u>BsrBI</u> | <u>Bpml</u> | <u>BssSI</u> | <u>FauI</u> | <u>BsiHKAI</u> |
| <u>BseRI</u> | <u>BsaXI</u> | <u>BspEI</u> | <u>EagI</u> | <u>BsoBI</u> | <u>BsrFI</u> | <u>BsmAI</u> | <u>BtsIMutI</u> | <u>FokI</u> | <u>BspEI</u> |
| <u>BsiEI</u> | <u>BsmFI</u> | <u>BtsI</u> | <u>EcoO109I</u> | <u>BspEI</u> | <u>BtgI</u> | <u>BsmFI</u> | <u>EcoNI</u> | <u>NspI</u> | <u>BsrGI</u> |
| <u>BsmI</u> | <u>Bsp1286I</u> | <u>EcoO109I</u> | <u>EcoP15I</u> | <u>BsrFI</u> | <u>CviQI</u> | <u>BspEI</u> | <u>EcoP15I</u> | <u>PmlI</u> | <u>BstXI</u> |
| <u>BsoBI</u> | <u>BspEI</u> | <u>HincII</u> | <u>HgaI</u> | <u>EaeI</u> | <u>EcoNI</u> | <u>BsrFI</u> | <u>FauI</u> | <u>PspGI</u> | <u>EaeI</u> |
| <u>BstYI</u> | <u>BsrBI</u> | <u>MmeI</u> | <u>MmeI</u> | <u>EagI</u> | <u>EcoO109I</u> | <u>EaeI</u> | <u>HindIII</u> | <u>RsaI</u> | <u>Ecil</u> |
| <u>EaeI</u> | <u>BtsCI</u> | <u>MspA1I</u> | <u>NspI</u> | <u>EcoO109I</u> | <u>EcoP15I</u> | <u>EcoP15I</u> | <u>NciI</u> | <u>Sau96I</u> | <u>EcoNI</u> |
| <u>Ecil</u> | <u>BtsIMutI</u> | <u>PpuMI</u> | <u>SfaNI</u> | <u>EcoP15I</u> | <u>Hpy99I</u> | <u>HincII</u> | <u>PmlI</u> | <u>ScrFI</u> | <u>EcoP15I</u> |
| <u>EcoO109I</u> | <u>DrallI</u> | <u>SacII</u> | <u>SmaI</u> | <u>HgaI</u> | <u>MmeI</u> | <u>MslI</u> | <u>Sau96I</u> | <u>SmlI</u> | <u>HincII</u> |
| <u>EcoP15I</u> | <u>EaeI</u> | <u>SfcI</u> | <u>StuI</u> | <u>HincII</u> | <u>NspI</u> | <u>MspA1I</u> | <u>SmlI</u> | <u>StyD4I</u> | <u>HpaI</u> |
| <u>Hpy99I</u> | <u>EcoNI</u> | <u>SmaI</u> | <u>StyI</u> | <u>HindIII</u> | <u>RsaI</u> | <u>Sall</u> | <u>TfiI</u> | <u>TaqI</u> | <u>MspA1I</u> |
| <u>HpyCH4III</u> | <u>EcoP15I</u> | <u>SphI</u> | <u>TfiI</u> | <u>MmeI</u> | <u>SfaNI</u> | <u>SmaI</u> | <u>TspRI</u> | <u>TfiI</u> | <u>NcoI</u> |
| <u>MspA1I</u> | <u>FokI</u> | <u>StuI</u> | <u>Tsp45I</u> | <u>NspI</u> | <u>SmaI</u> | <u>StuI</u> | <u>XmnI</u> | | <u>NspI</u> |
| <u>NciI</u> | <u>HgaI</u> | <u>TspMI</u> | <u>TspMI</u> | <u>Sall</u> | <u>StuI</u> | <u>TspMI</u> | | | <u>SfaNI</u> |
| <u>NspI</u> | <u>MspA1I</u> | <u>XmaI</u> | <u>XcmI</u> | <u>SmaI</u> | <u>StyI</u> | <u>XmaI</u> | | | <u>StuI</u> |

...CONTINUACIÓN

Cuadro 14. Enzimas de restricción que digieren dos sitios de restricción para las 10 bacterias utilizadas.

| | | | | | | |
|---------------|---------------|-------------|--------------|---------------|-------------|-------------|
| <u>SacII</u> | <u>NaeI</u> | <u>XmaI</u> | <u>SmaI</u> | <u>Tsp45I</u> | <u>XmnI</u> | <u>XmnI</u> |
| <u>StuI</u> | <u>NgoMIV</u> | <u>XmnI</u> | <u>StuI</u> | <u>TspMI</u> | | |
| <u>StyI</u> | <u>PpuMI</u> | | <u>StyI</u> | <u>XcmI</u> | | |
| <u>Tsp45I</u> | <u>SmaI</u> | | <u>TfiI</u> | <u>XmaI</u> | | |
| <u>XcmI</u> | <u>StuI</u> | | <u>TspMI</u> | <u>XmnI</u> | | |
| | <u>StyI</u> | | <u>XmaI</u> | | | |
| | <u>Tsp45I</u> | | <u>XmnI</u> | | | |
| | <u>TspRI</u> | | | | | |
| | <u>XmnI</u> | | | | | |

Se muestra el listado de todas las enzimas para cada una de las bacterias. Las enzimas comunes en al menos seis bacterias se encuentran marcadas a color, para su mejor visualización.

D. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Cuadro 15. Cuantificación de ADN extraído por el método de ebullición, a partir de la absorbancia a diferentes longitudes de onda

| Bacterias | Longitud de onda | | | Concentración ug/mL |
|-----------------------|------------------|-------|-------|------------------------|
| | 260nm | 280nm | 320nm | |
| <i>A. baumannii</i> | 0.381 | 0.312 | 0.213 | 19.050 |
| | 0.214 | 0.178 | 0.121 | 10.700 |
| <i>A. hydrophila</i> | 0.021 | 0.02 | 0.016 | 1.050 |
| | 0.467 | 0.378 | 0.251 | 23.350 |
| <i>B. cepacia</i> | 0.198 | 0.118 | 0.024 | 9.900 |
| | 0.083 | 0.055 | 0.018 | 4.150 |
| <i>E. cloacae</i> | 0.178 | 0.113 | 0.035 | 8.900 |
| | 0.031 | 0.021 | 0.012 | 1.550 |
| <i>E. coli</i> | 0.255 | 0.189 | 0.11 | 12.750 |
| | 0.027 | 0.019 | 0.01 | 1.350 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0.386 | 0.285 | 0.138 | 19.300 |
| | 0.17 | 0.108 | 0.039 | 8.500 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 0.477 | 0.289 | 0.094 | 23.850 |
| | 0.402 | 0.24 | 0.077 | 20.100 |
| <i>S. aureus</i> | 0.249 | 0.154 | 0.044 | 12.450 |
| | 0.031 | 0.021 | 0.011 | 1.550 |
| <i>S. epidermidis</i> | 0.038 | 0.034 | 0.026 | 1.900 |
| | 0.169 | 0.097 | 0.018 | 8.450 |
| <i>S. maltophilia</i> | 0.269 | 0.237 | 0.178 | 13.450 |
| | 1.011 | 0.854 | 0.633 | 50.550 |

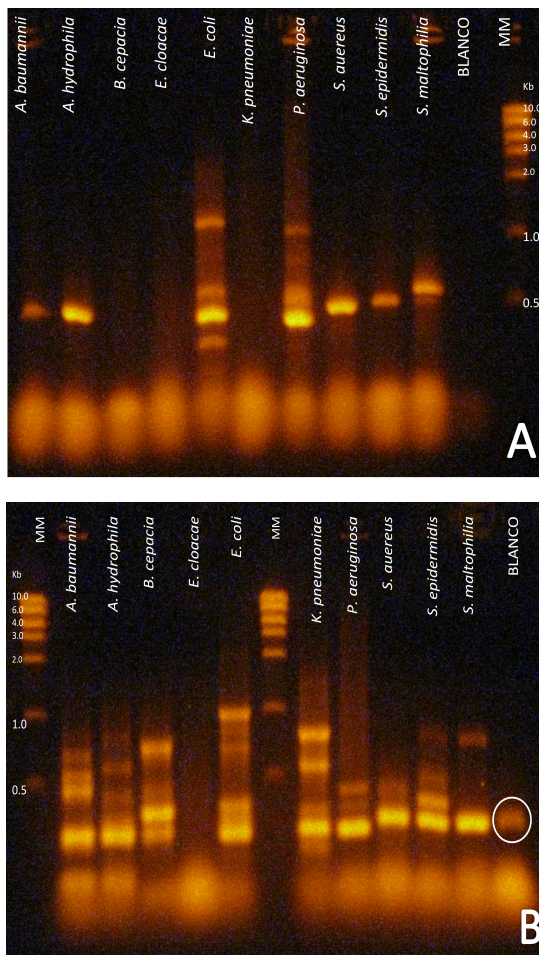
E. PCR *in silico*

Cuadro 16. PCR *in silico* de las 10 bacterias utilizadas en este estudio, con los tres sets de iniciadores seleccionados

| Bacteria | Com1 y Com 2 | | | | ER10 y ER11 | | | | P11P y P13P | | | |
|-------------------------------------|--------------|-------|------|----------|-------------|-------|------|----------|---------------|-------|------|----------|
| | Posición | Match | Tm | Amplicón | Posición | Match | Tm | Amplicón | Posición | Match | Tm | Amplicón |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 507 --> 524 | 100% | 56.6 | 408 | 91 --> 107 | 100% | 58.3 | 254 | 1360 <-- 1379 | 98% | 55.2 | - |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 897 <-- 915 | 97% | 41.4 | 407 | 329 <-- 345 | 100% | 56.9 | 254 | 1178 --> 1196 | 79% | 48.1 | 215 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 521 --> 538 | 100% | 56.6 | 406 | 106 --> 122 | 100% | 58.3 | 254 | 1374 <-- 1393 | 100% | 59.9 | 215 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 910 <-- 928 | 97% | 41.4 | 406 | 344 <-- 360 | 94% | 56.9 | 254 | 1240 --> 1258 | 83% | 48.1 | 215 |
| <i>Escherichia coli</i> | 589 --> 606 | 100% | 56.6 | 407 | 174 --> 190 | 97% | 51.9 | 254 | 1436 <-- 1455 | 95% | 55.2 | 215 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 977 <-- 995 | 100% | 50.2 | 407 | 412 <-- 428 | 100% | 56.9 | 254 | 1165 --> 1183 | 83% | 48.1 | 215 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 510 --> 527 | 100% | 56.6 | 408 | 95 --> 111 | 100% | 58.3 | 253 | 1361 <-- 1380 | 100% | 59.9 | 215 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 898 <-- 916 | 95% | 34.2 | 408 | 333 <-- 349 | 100% | 56.9 | 263 | 1174 --> 1192 | 83% | 48.1 | 215 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 518 --> 535 | 100% | 56.6 | 408 | 103 --> 119 | 100% | 58.3 | 263 | 1370 <-- 1389 | 100% | 59.9 | 215 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 907 <-- 925 | 97% | 41.4 | 408 | 341 <-- 357 | 100% | 56.9 | 254 | 1140 --> 1158 | 83% | 48.1 | 215 |
| | 484 --> 501 | 100% | 56.6 | 408 | 69 --> 85 | 100% | 58.3 | 254 | 1336 <-- 1355 | 100% | 59.9 | 215 |
| | 873 <-- 891 | 97% | 41.4 | 408 | 307 <-- 323 | 100% | 56.9 | 253 | 1157 --> 1175 | 83% | 48.1 | 215 |
| | 501 --> 518 | 100% | 56.6 | 408 | 87 --> 103 | 100% | 58.3 | 253 | 1353 <-- 1372 | 100% | 59.9 | 215 |
| | 890 <-- 908 | 97% | 41.4 | 408 | 324 <-- 340 | 100% | 56.9 | 253 | 1169 --> 1187 | 83% | 48.1 | 215 |
| | 511 --> 528 | 100% | 56.6 | 408 | 87 --> 103 | 100% | 58.3 | 253 | 1365 <-- 1384 | 95% | 55.2 | 215 |
| | 901 <-- 919 | 100% | 50.2 | 408 | 334 <-- 350 | 100% | 56.9 | 253 | 1113 --> 1131 | 83% | 48.1 | - |
| | 455 --> 472 | 100% | 56.6 | 408 | 31 --> 47 | 100% | 58.3 | 254 | 1156 --> 1174 | 83% | 48.1 | 216 |
| | 845 <-- 863 | 100% | 50.2 | 408 | 278 <-- 294 | 100% | 56.9 | 254 | 1353 <-- 1372 | 100% | 59.9 | 216 |
| | 498 --> 515 | 94% | 56.6 | 408 | 83 --> 99 | 94% | 56.2 | 254 | | | | |
| | 888 <-- 906 | 100% | 50.2 | 408 | 321 <-- 337 | 100% | 56.9 | 254 | | | | |

F. GELES DE AGAROSA CON DIFERENTES CONDICIONES

Figura 15. Amplificación con los tres sets de iniciadores a una concentración de 10 μ m y temperatura de anillamiento a 55°C



Geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X. Se utilizaron 3 μ L de GelRed 100X en cada muestra para el revelado y 5 μ L del producto de amplificación. Se cargaron 8 μ L en cada pozo. MM: marcador de masa molecular, se utilizó 5 μ L de DNA Mass Ladder de New England Biolabs, más 3 μ L de GelRed 100X. Los geles se corrieron a 90V por 30 min. La flecha indica la posición aproximada de la banda esperada. Los círculos indican una banda no esperada debido a contaminación. A: iniciadores ER10 y ER11. B: iniciadores Com1 y Com2. C: iniciadores P11P y P13P.

G.ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL GEN 16S ARNr DE LAS 10 BACTERIAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO AMPLIFICADAS CON LOS INICIADORES Com1 y Com2

```

A. baumannii      CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
A. hydrophila     CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
B. cepacia        CAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT
E. cloacae        CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT
E. coli           CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
K. pneumoniae     CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
P. aeruginosa     CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
S. aureus         CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
S. epidermidis   CAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGT
S. maltophilia    CAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
*****          ***  ** *****  ****  ** *****

A. baumannii      GCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG
A. hydrophila     GCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG
B. cepacia        GCGTAGGTGGTTATTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTG
E. cloacae        GCGCAGGCGGTTTGSTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTG
E. coli           ACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGNATTGCATTT
K. pneumoniae     ACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCT
P. aeruginosa     ACGCAGGCGGTTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTT
S. aureus         ACGCAGGCGGTTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTC
S. epidermidis   GCGTAGGCGGCTTATTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTGGGAATTGCATTC
S. maltophilia    GCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCC
**  **  **      ***  * *****  ***  **  **  **

A. baumannii      GAAACTGGAAAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG
A. hydrophila     GAAACTGGAAAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG
B. cepacia        GATACTGGATGACTAGAAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATG
E. cloacae        GTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAAATTCACGTGTAGCAGTGAAATG
E. coli           AAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATG

```

K. pneumoniae GATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATG
 P. aeruginosa GAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATG
 S. aureus GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATG
 S. epidermidis GATACTGGTGGAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATG
 S. maltophilia AAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATG
 *** ** ** * * ***** * ***** * ***** *****

A. baumannii CGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGA-AGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCT
 A. hydrophila CGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGA-AGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCT
 B. cepacia CGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGA-AGGCGACTACCTGGACCAACATGACACT
 E. cloacae CGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA-AGGCGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCT
 E. coli CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA-AGGCGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
 K. pneumoniae CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA-AGGCGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCT
 P. aeruginosa CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA-AGGCGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
 S. aureus CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA-AGGCGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
 S. epidermidis CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGGGAAGGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCT
 S. maltophilia CGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGA-AGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACT
 ** *** ** * ***** * * ** ** ** * ***** * * ***** **

A. baumannii GATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 A. hydrophila GATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 B. cepacia GAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 E. cloacae CATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 E. coli CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 K. pneumoniae CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 P. aeruginosa CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 S. aureus CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 S. epidermidis GAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA AAC
 S. maltophilia GAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 * * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

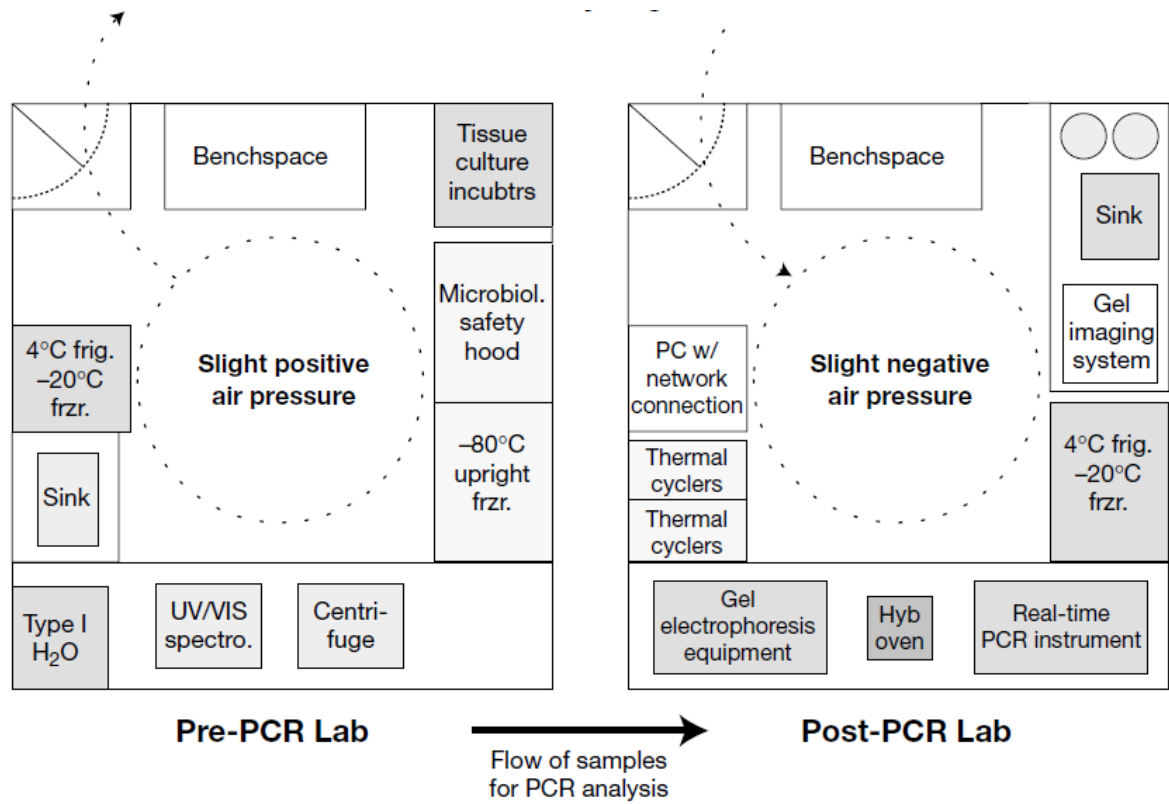
A. baumannii GATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
 A. hydrophila GATGAGTGCTAAGTGTTACGGGGTTTTCCGCCCTTANTGCTGCAGCTAACGCATTAANCA
 B. cepacia GATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAANNNTAACGCGTTAAGTT
 E. cloacae GATGTCAACTAGTTGTTGGGGAT-TC-ATTTCCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTT
 E. coli GATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCCTT-GAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATC
 K. pneumoniae GATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTT-GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTC
 P. aeruginosa GATGTCGATTTGGA-GTTGTGCCCTT-GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATC
 S. aureus GATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT-GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATC

S. epidermidis GATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTT-GAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTA
 S. maltophilia GATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTT-GAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTC
 **** * * * * * **

A. baumannii CTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 A. hydrophila CTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 B. cepacia CGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 E. cloacae GACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAAC TCAAAGGAATTGACGG
 E. coli GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGG
 K. pneumoniae GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGG
 P. aeruginosa GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGCATTGACGG
 S. aureus GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGG
 S. epidermidis GACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAAC TCAAATGAATTGACGG
 S. maltophilia GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGG
 ***** * ***** * ***** * *****

H. ACONDICIONAMIENTO DE INSTALACIONES

Figura 16. Organización para un laboratorio de biología molecular, con instalaciones separadas para la preparación de amplificaciones por PCR



(Mifflin 2008)