

Portada Externa de Tesis

“PRUEBA RÁPIDA PARA LA DETECCIÓN DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA”

Daniel Alejandro Ferrusca Bernal

2021



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Nombre de la tesis:

“PRUEBA RÁPIDA PARA LA DETECCIÓN DE *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA*”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Microbiología

Presenta

Daniel Alejandro Ferrusca Bernal

2021

Dirección General de Bibliotecas UAQ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA



Prueba rápida para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en

Microbiología

Presenta:

Daniel Alejandro Ferrusca Bernal

Dirigido por:

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Asesores:

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

M. en C. Miguel Ángel Mercado Uriostegui

Santiago de Querétaro, Qro., Enero,2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA



Prueba rápida para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en

Microbiología

Presenta:

Daniel Alejandro Ferrusca Bernal

Dirigido por:

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Asesores:

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Dr. Juan Joel Gualito Mosqueda

M. en C. Miguel Ángel Mercado Uriostegui

Campus Aeropuerto

Santiago de Querétaro, Qro., México

Enero 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Prueba rápida para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Microbiología

Presenta:

Daniel Alejandro Ferrusca Bernal

Dirigido por:

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez
Presidente


Firma

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Secretario


Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Vocal


Firma

M. en C. Miguel Ángel Mercado Uriostegui
Vocal


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero de 2021
México

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, el cual tiene importancia a nivel de salud pública, debido a ser el agente causante de infecciones severas en personas con condiciones médicas subyacentes; tales como en pacientes hospitalizados, pacientes quemados, inmunocomprometidos. Las estrategias efectivas de control de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* deben de incluir la detección temprana y específica de la infección, así como la determinación de la sensibilidad a antibióticos del patógeno; mediante técnicas de diagnóstico sensibles, específicas, económicas y rápidas. Los métodos tradicionales para la identificación son el análisis microbiano; que cubre el aislamiento, crecimiento y detección mediante pruebas bioquímicas, un procedimiento con una duración aproximada de al menos 72 horas. Por lo mencionado surge la necesidad de implementar una técnica de diagnóstico específica y reproducible, la cual tenga la ventaja de ser más sensible y rápida a los actuales métodos de diagnóstico clínico. La técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP) amplifica una secuencia blanco bajo condiciones isotérmicas en una hora, con una alta sensibilidad y especificidad; permitiendo de diversas maneras la detección del material genético amplificado. El objetivo del presente trabajo fue implementar y estandarizar la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP), acoplada a la técnica de Hibridación por Transferencia en Línea Reversa (RLBH) para el diagnóstico, mediante la hibridación de sondas de oligonucleótidos especie-específico con los productos de LAMP biotinilados, para la detección del patógeno. Para implementar la técnica, primero se diseñó una sonda de oligonucleótidos específica para el gen 16S rRNA de *P. aeruginosa*, para posteriormente hacer el envío para su síntesis. Posterior a la síntesis de las sondas, se obtuvieron 40 muestras de DNA de *P. aeruginosa*, gracias a la donación del Cepario del Laboratorio de Inmunología y Vacunas lugar donde se llevó a cabo la presente investigación. La concentración de DNA así como su integridad de las muestras se determinó mediante espectrofotometría y gel de integridad en agarosa, para posteriormente determinar la sensibilidad de las técnicas de PCR y LAMP por separado, utilizando una concentración conocida de 30 ng/ μ L de DNA de cada muestra de *P. aeruginosa*. A partir de la concentración conocida de 30 ng/ μ L de cada una de las muestras se evaluó el límite de detección y la reproducibilidad de los métodos de PCR y LAMP mediante diluciones en serie 10²-10⁹. La especificidad analítica de los cebadores para amplificar el gen 16S rRNA se evaluó mediante los métodos de LAMP y PCR, utilizando además del DNA de *P. aeruginosa*, el DNA genómico de seis especies diferentes de bacterias intrahospitalarias de importancia clínica. Además, se evaluó el tiempo mínimo requerido para la detección del patógeno, incubando las reacciones LAMP y PCR a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos, para determinar el tiempo mínimo requerido para la amplificación y detección del producto

amplificado mediante ambas técnicas. Finalmente se evaluó la técnica de RLBH acoplada a la técnica de LAMP con los productos amplificados de cada una de las muestras de DNA; para ello se realizó la hibridación de los productos de LAMP y la sonda especie específica antes mencionada en una membrana de nylon (Byodine C). La detección de *P. aeruginosa* mediante la presente prueba abarca un tiempo promedio de 2 horas con un costo aproximado de \$250.00 M.N. para la detección del patógeno así como para su posible determinación de sensibilidad a antibióticos; en cambio mediante las técnicas actuales de detección bioquímicas mediante el equipo automatizado Vitek II, se obtienen resultados en un tiempo promedio de 72 horas y con un costo aproximado de \$350.00 M.N. para solo la detección del patógeno implicado; lográndose obtener de esta manera una alternativa de diagnóstico más rápida y menos costosa en comparación a las técnicas actuales de diagnóstico, para la detección de *P. aeruginosa*. La sensibilidad del método LAMP-RLBH fue de 3×10^{-4} ng/ μ L, para LAMP fue de 3×10^{-3} ng/ μ L, mientras que en el método de PCR fue de 0.03 ng/ μ L; de igual manera se demostró que estas tres técnicas amplifican de forma específica el gen 16S rRNA de *P. aeruginosa*. El presente trabajo de investigación proporciona una técnica que puede llevarse a cabo de manera simple, por personal sin experiencia, logrando una alternativa viable más rápida y económica en comparación a los métodos de diagnóstico tradicionales para la detección de *P. aeruginosa*.

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, LAMP, RLBH.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen, which is important at the public health level, due to being the causative agent of severe infections in people with underlying medical conditions; such as in hospitalized patients, burned patients, immunocompromised (add more clinical importance). Effective strategies for controlling infections caused by *P. aeruginosa* must include early and specific detection of the infection, as well as the determination of the pathogen's sensitivity to antibiotics; using sensitive, specific, inexpensive and rapid diagnostic techniques. Traditional methods for identification are microbial analysis; It covers isolation, growth and detection by biochemical tests, a procedure that takes approximately 72 hours to complete. Therefore, the need arises to implement a specific and reproducible diagnostic technique, which has the advantage of being more sensitive and faster than current clinical diagnostic methods. The Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique amplifies a target sequence under isothermal conditions in one hour, with high sensitivity and specificity; allowing in various ways the detection of the amplified genetic material. The objective of the present work was to implement and standardize the Hairpin-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique, coupled to the Reverse Line Transfer Hybridization (RLBH) technique for diagnosis, by means of the hybridization of species-specific oligonucleotide probes with biotinylated LAMP products for the detection of the pathogen. To implement the technique, a specific oligonucleotide probe was first designed for the 16S rRNA gene of *P. aeruginosa*, to later be sent for synthesis. After the synthesis of the probes, 40 DNA samples of *P. aeruginosa* were obtained, thanks to the donation of the Cepario of the Immunology and Vaccines Laboratory, place where the present investigation was carried out. The DNA concentration as well as its integrity of the samples was determined by spectrophotometry and integrity gel in agarose, to later determine the sensitivity of the PCR and LAMP techniques separately, using a known concentration of 30 ng/ μ L of DNA from each sample of. From the known concentration of 30 ng/ μ L of each of the samples, the detection limit and the reproducibility of the PCR and LAMP methods were evaluated by serial dilutions 10^2 - 10^9 . The analytical specificity of the primers for amplifying the 16S rRNA gene was evaluated by the LAMP and PCR methods, using in addition to the DNA of *P. aeruginosa*, the genomic DNA of six different species of hospital-acquired bacteria of clinical importance. In addition, the minimum time required for the detection was evaluated, incubating the LAMP and PCR reactions at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes, to determine the minimum time required for the amplification and detection of the amplified product by both techniques. Finally, the RLBH technique coupled with the LAMP technique was evaluated with the amplified products of each of the *P. aeruginosa* DNA samples; For this, the LAMP products and the aforementioned species-specific probe were hybridized on a nylon membrane (Byodine C). The detection of *P. aeruginosa* by means of the present test covers an average time of 8 hours with an approximate cost of \$ 250.00 M.N. for

the detection of the pathogen as well as for its possible determination of sensitivity to antibiotics; On the other hand, using current biochemical detection techniques using the automated Vitek II equipment, results are obtained in an average time of 72 hours and with an approximate cost of \$ 350.00 M.N. for only the detection of the implicated pathogen; achieving in this way a faster and less expensive diagnostic alternative compared to current diagnostic techniques, for the detection of *P. aeruginosa*. The sensitivity of the LAMP-RLBH method was 3×10^{-4} ng/ μ L, for LAMP it was 3×10^{-3} ng / μ L, while in the PCR method it was 0.03 ng/ μ L; in the same way it was demonstrated by the three techniques specifically amplify the 16S rRNA gene of *P. aeruginosa* in a specific way. The present research work provides a technique that can be carried out simply, by inexperienced personnel, achieving a faster and cheaper viable alternative compared to traditional diagnostic methods for the detection of *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, LAMP, RLBH.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a quienes siempre han creido en mí, que me han apoyado en cada una de las ocasiones que he decidido emprender nuevos retos y metas que he trazado en mi vida; se lo dedico a mis padres; gracias por su amor y apoyo incondicional que me han dado toda su vida.

A mis padres, que son el cimiento de toda mi vida y mi crecimiento educativo.

A mi hermano, por estar a mi lado y apoyarme en los momentos difíciles que se nos han puesto en el camino, sin su apoyo nada de esto habría sido posible.

A Bertha Carvajal, por ser una excelente profesora, guía vocacional y ejemplo de ser humano.

A mi mejor amigo, mi amigo cuadrúpedo “Pambisito”, que me ha acompañado en gran parte de mi estancia en la universidad.

A Carina: por su sincera amistad y su apoyo incondicional en todos los aspectos posibles, en el cual tuvimos un aprendizaje y crecimiento mutuo durante todo este tiempo.

A Fernanda, por enseñarme el bello mundo de la microbiología.

A mis amigos, por crecer a mi lado, hacer que mi vida fuera más fácil, así como motivarme para mejorar día a día en cualquier ámbito de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo el apoyo que me dieron para poder continuar mis estudios.

A todos los profesores por compartirme su conocimiento, pasión y dedicación a la ciencia e investigación durante mi estancia universitaria.

A la Dra. Bertha Carvajal, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, ser tan paciente conmigo para enseñarme todo lo posible durante mi estancia en el laboratorio, muchas gracias.

A mi comité tutorial.

Dr. Juan Mosqueda, Dra. Angelina Rodríguez, Dr. José Olivares, y al M. Miguel Uriostegui; gracias por su tiempo y consejos.

Al laboratorio de Inmunología Y Vacunas, y al Laboratorio de Proteogenómica de la UAQ, y demás compañeros del laboratorio.

A todos mis amigos que fueron y serán un gran apoyo en cualquier aspecto de mi vida; especialmente a Carina, por ser una gran compañera de estudios.

Trabajo realizado con apoyo del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) 2019.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN.....	iv
SUMMARY	vi
DEDICATORIAS	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1. Descripción de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	3
2.1.1. Clasificación taxonómica.....	3
2.1.2. Presentación clínica de la enfermedad.....	4
2.1.3. Patogenia y factores de virulencia	5
2.1.4. Resistencia a antibióticos	6
2.2. Diagnóstico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	8
2.2.1. Diagnóstico convencional	8
2.2.2. Diagnóstico inmunológico.....	9
2.2.3. Diagnóstico molecular	9
2.3. Técnica de LAMP (Amplificación isotérmica mediada por horquillas)	10
2.3.1. Fundamento de la técnica.....	12
2.3.2. Procedimiento de la técnica.....	14
2.3.4. Ventajas del uso de la LAMP	15
2.4. Técnica de RLBH	16
2.4.1. Fundamento de la RLBH	16
2.4.2. Procedimiento de la técnica.....	17
2.4.3. Ventajas del uso de la RLBH.....	18

III.	JUSTIFICACIÓN.....	19
IV.	OBJETIVOS.....	20
V.	METODOLOGÍA.....	21
VI.	RESULTADOS	25
VII.	DISCUSIÓN.....	39
VIII.	CONCLUSIONES	44
IX.	ANEXOS.....	45
X.	LITERATURA CITADA	49

Dirección General de Bibliotecas UAG

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores y sondas de oligonucleótidos sintéticos utilizados durante la amplificación e hibridación del material genético 22

Cuadro 2. Cuantificación de DNA genómico, de muestras de DNA donadas por el Cepario del Laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS), UAQ. 25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del fundamento de LAMP durante la amplificación de la secuencia blanco.....	11
Figura 2. Representación esquemática de los cebadores utilizados en ensayos de LAMP, mostrando de igual manera la región de la secuencia blanco que reconocen cada uno de los cebadores.....	13
Figura 3. Representación esquemática de RLBH.....	17
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de muestras genómicas de <i>P. aeruginosa</i> para determinación de integridad	26
Figura 5. Esquema de la unión de las sondas de oligonucleótidos a la membrana de nylon.....	30
Figura 6. Ensayo de PCR para <i>P. aeruginosa</i> , amplificando el gen ecfX.....	30
Figura 7. Ensayo de PCR para <i>P. aeruginosa</i> , amplificando el gen 16S rRNA.....	31
Figura 8. Ensayo de LAMP por triplicado para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , amplificando el gen 16S rRNA.....	32
Figura 9. Sensibilidad del ensayo de LAMP para la amplificación del gen 16S rRNA de <i>P. aeruginosa</i>	33
Figura 10. Sensibilidad del ensayo de PCR, para la amplificación de los genes 16S rRNA y ecfX.....	34
Figura 11. Determinación de la especificidad del ensayo LAMP para la amplificación del gen 16S rRNA.....	35
Figura 12. Determinación de la especificidad del ensayo PCR para la amplificación del gen 16S rRNA y del gen ecfX.	35
Figura 13. Triplicado de ensayo RLBH para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37

I. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria metabólicamente versátil, la cual causa un amplio rango de infecciones de forma oportunista en pacientes que se encuentran inmunocomprometidos y/u hospitalizados. Su amplio rango de resistencia a antibióticos y adaptabilidad, le permite sobrevivir ante diversos entornos naturales y artificiales (Gellatly and Hancock, 2013; Wu et al., 2014). En la actualidad la detección de bacterias de importancia clínica, como *P. aeruginosa*, es llevado a cabo por el aislamiento de la bacteria patógena, y su posterior detección mediante pruebas bioquímicas, procesos llevados a cabo por equipos automatizados tal como el Vitek 2, el cual permite la identificación microbiana así como la detección de la resistencia antimicrobiana, a través de la microdilución en caldo de la colonia de microorganismo aislada (Joyanes et al., 2001; Quesada et al., 2010)(Washburn et al., 2010). Los procesos de detección bioquímica tienen como desventaja el necesitar un rango de tiempo prolongado para la entrega de resultados, de aproximadamente 72 horas, además de que se necesitan de equipos especializados para llevar a cabo las pruebas. En la actualidad, se busca el desarrollo de pruebas alternativas a las que se utilizan, que tenga la característica de ser rápida, específica, sensible, y menos costosa a las técnicas usadas de forma convencional.

Un ejemplo reciente de prueba alternativa de diagnóstico, es el uso de la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquilla (LAMP), para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar; para la cual la Organización Mundial de la Salud (OMS), realizó y publicó una guía para el diagnóstico oportuno, rápido y sin la necesidad de personal experimentado para llevar a cabo el diagnóstico mediante la técnica de LAMP (World Health Organization, 2016). La técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP), permite la amplificación de una secuencia blanco de material genético con una alta eficiencia para producir hasta 10^9 copias de la secuencia de interés, mediante una reacción llevada a cabo de forma isotérmica en menos de una hora. La técnica molecular de LAMP emplea la *Bst* DNA polimerasa, así como el uso de cuatro cebadores específicos, los cuales reconocen seis regiones distintas de la secuencia de interés; dichos cebadores se dividen en dos cebadores internos (FIP Y BIP), y dos cebadores externos (F3 Y B3) (Notomi et al., 2000). La desventaja metodológica que surge a partir de la técnica de LAMP, se encuentra en el proceso de detección del material genético amplificado; para ello se utiliza de forma común el análisis en gel de agarosa, detección visual por turbidez o fluorescencia, y monitoreo en tiempo real (Parida et al., 2008).

Como alternativa a la detección del material genético amplificado mediante técnicas como Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR), así como para genotipificar, se ha utilizado en diversos trabajos la técnica de Hibridación por Transferencia en Línea Reversa (RLBH); método basado en la inmovilización de sondas de oligonucleótidos en una membrana de nitrocelulosa y posterior hibridación de las mismas sondas con productos de PCR marcados con biotina (Ajbani et al., 2011).

La detección de dicha hibridación entre las sondas de oligonucleótidos con los productos de PCR, es visualizada mediante métodos quimioluminiscentes, radioactivos o colorimétrica.

Por lo mencionado anteriormente, se propuso en el presente trabajo como objetivo general el desarrollo y estandarización de un sistema de diagnóstico molecular para la detección de *P. aeruginosa* mediante el uso en conjunto entre la técnica de LAMP para la amplificación de una región-especie específica del gen 16S rRNA de *P. aeruginosa* en conjunto con una variante de RLBH con detección colorimétrica. La presente propuesta provee una prueba alternativa para la detección de *P. aeruginosa*, que podría llevarse a cabo en laboratorios de diagnóstico clínico, por personal inexperto; de una forma específica, con alta sensibilidad y más rápida, en comparación a las actuales pruebas de diagnóstico que se utilizan.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Descripción de *Pseudomonas aeruginosa*

Las especies del género *Pseudomonas* son bacilos aerobios, Gram negativos y monoflagelados, al momento de aislarse en medios de cultivo poseen una apariencia nacarada, además de un olor parecido a la tortilla. Las condiciones propicias para su crecimiento se dan en un rango de temperatura entre los 25°C y 37°C (Wu et al., 2014), se le considera como un microorganismo ubicuo, el cual habita de forma frecuente el suelo, agua, vegetación, piel y material inorgánico, tales como materiales quirúrgicos y catéteres, etc (Shaan L Gellatly and Hancock, 2013). *Pseudomonas aeruginosa* al ser un patógeno oportunista y resistente a diversos antibióticos, es una causa común de infecciones nosocomiales (Mendiratta et al., 2005), en pacientes quemados y en pacientes inmunocomprometidos (cáncer y fibrosis cística) (Wolf and Elsässer-Beile, 2009).

En diversas ocasiones, la bacteria *P. aeruginosa* es el agente causal responsable de que se alarguen las estancias intrahospitalarias, resultando en grandes pérdidas económicas, generando aumento en la resistencia a los antibióticos, lo cual en ocasiones tiene consecuencias fatales (Wu et al., 2014).

2.1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica para *P. aeruginosa* fue dada en primera instancia por Schroeter en 1872 llamándola *Bacterium aeruginosum*. Posteriormente Wallter Migula en 1894, clasificó a la bacteria en un nuevo género, denominado *Pseudomonas* a partir del griego pseudo ("falso") y monas ("unidad") para describir a un género de bacterias que describió como "Células con órganos polares de motilidad. La formación de esporas ocurre en algunas especies, pero es poco común". Dicha denominación de *Pseudomonas* como "Falsa unidad" fue empleada para describir la semejanza entre este nuevo género con el nanoflagelado denominado como "Monas" término acuñado por Otto Friedrich Müller en 1773, para describir un género de células como "gusano discreto, simple, transparente, diminuto" (Palleroni, 2010; Talon, 2012).

En años posteriores la determinación y clasificación de las diferentes especies de bacterias dentro del género de *Pseudomonas*, se llevó a cabo mediante la observación de la amplia versatilidad nutricional, gracias a la tesis de L.E. den Doorn de Jong (1926). Posteriormente en 1966 se sumaron las propiedades fenotípicas de las cepas de *Pseudomonas* para complementar las características nutricionales para la clasificación taxonómica del género (Stanier et al., 1966). En la actualidad la clasificación taxonómica de *P. aeruginosa* se encuentra de la siguiente manera, determinada mediante la filogenia de las secuencias de RNAr de las especies que comprenden el género:

Dominio: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Pseudomonadales
Familia Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas*
Especie: *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.2. Presentación clínica de la enfermedad

La bacteria *P. aeruginosa* es uno de los patógenos más comunes causantes de infecciones respiratorias (Shaan L Gellatly and Hancock, 2013), dichas infecciones respiratorias son clasificadas dentro de dos tipos; aguda y crónica (Arancibia et al., 2002). Otro tipo de infecciones comunes debido a *P. aeruginosa* se localizan en el tracto urinario, en el oído en la córnea, sangre; entre otros (Shaan L Gellatly and Hancock, 2013).

En cuanto a las infecciones respiratorias causadas por *P. aeruginosa*, estas se pueden dividir en dos, la primera es la infección aguda de los pulmones, se considera una consecuencia directa de la deteriorada salud de los pacientes hospitalizados; en pacientes inmunocomprometidos (adultos mayores, neutropenia, cáncer, infecciones nosocomiales), así como debido a traumas directos en el epitelio del aparato respiratorio (Shaan L Gellatly and Hancock, 2013), causados por la inserción de tubos endotraqueales los cuales sirven como reservorios para el crecimiento y desarrollo de biofilms de *P. aeruginosa* (Adair et al., 1999; Williams et al., 2010); aunado a lo mencionado, la alta incidencia de *P. aeruginosa* en hospitales y diversas instituciones de salud, es debido a la alta tasa de pacientes con cepas multirresistentes, además de un uso previo de antibióticos de amplio espectro, sin una correcta determinación de la sensibilidad a antibióticos del patógeno (Otter et al., 2011). En este tipo de infecciones se da una amplia y variada expresión de factores de virulencia, tales como la expresión del flagelo, pili, sistema de secreción tipo 3, entre muchos otros factores de virulencia sobreexpresados (Hogardt and Heesemann, 2010).

Estas nuevas infecciones por *P. aeruginosa*, recibe diversos nombres de acuerdo a los padecimientos a y a la forma de adquisición del patógeno; entre las cuales se destacan; la Neumonía asociada a ventilador (VAP), Neumonía adquirida de la comunidad (CAP), Neumonía asociada a la asistencia sanitaria (HCAP) y la Traqueobronquitis asociada al ventilador (Williams et al., 2010), estas infecciones por *P. aeruginosa* está asociada con una mayor tasa de mortalidad debido a la preferencia del patógeno por infectar a personas que presentan otras comorbilidades.

La segunda forma de infección de *P. aeruginosa*, se conoce como infecciones crónicas de pulmón, en la cual el patógeno logra adaptarse al ambiente colonizando a través de la formación de biofilms y disminuyendo su patogenicidad. Dichas infecciones crónicas, se encuentran asociadas a pacientes con fibrosis quística (Shaan L Gellatly and Hancock, 2013), condición en la cual se produce un ambiente adecuado para la colonización de *P. aeruginosa*. La fibrosis cística se considera como la enfermedad genética letal más común en la población caucásica (O'Sullivan and Freedman, 2009), debido a que los patógenos con el tiempo se vuelven residentes permanentes de las vías respiratorias. Dicha condición médica surge a partir de una mutación genética en el Regulador transmembrana de la fibrosis cística (CFTR), al ya no ser funcional, provoca que el Líquido de la superficie de las vías respiratorias (ASL) más espeso de lo normal el cual evita que las partículas y organismos que han sido inhalados sean transportados fuera de las vías respiratorias (O'Sullivan and Freedman, 2009). *P. aeruginosa* al no ser eliminado por mecanismos de defensa mecánicos tiene la posibilidad de desarrollar el biofilm para poder persistir en el ambiente de las vías respiratorias y evadir el sistema inmune innato y adaptativo (Williams et al., 2010; Shaan L. Gellatly and Hancock, 2013; Wu et al., 2014).

La evasión del sistema inmune, así como la falta de control en la inflamación causada por la bacteria en las vías respiratorias. A diferencia de la infección aguda, en donde la expresión de una gran variedad de factores de virulencia se ve disminuida o inhibida (Hogardt and Heesemann, 2010), esto para la sobrevivencia de la bacteria debido a la evasión de la respuesta inmune.

2.1.3. Patogenia y factores de virulencia

La patogénesis de *P. aeruginosa* está dada gracias a la versatilidad y adaptabilidad codificada por su genoma que posee entre 5.5 – 7 Mb (Wu et al., 2014), largo en comparación de otras bacterias patógenas; el cual le permite sintetizar una gran variedad de enzimas, confiriéndole de esta manera una gran plasticidad metabólica. De igual manera posee un amplio repertorio de genes de regulación para lograr alternar entre una infección aguda y crónica, mediando por la expresión diferencial de genes en distintos momentos y bajo ciertas condiciones.

Particularmente los genes que se ven expresados en la etapa aguda de las infecciones son genes que codifican para adhesinas; ejemplo de ellas son el pili de tipo IV, el flagelo y los lipopolisacáridos, los cuales median la unión a diversas células epiteliales a través de diversos receptores glucoesfingolípidos (GSL), asialo GM1, asialo GM2, receptores 5 tipo Toll (TLR5) y al receptor; mediando la internalización de del patógeno a través de las células epiteliales, además de activar el sistema inmune innato del hospedero (Sana et al., 2012; Wu et al., 2014). Además, durante la infección aguda se da la expresión y posterior secreción de toxinas a través de los sistemas de secreción (I, II, III, V, VI) y exoenzimas tales como la exotoxina A, elastanas, proteasas alcalinas y

ramnolípidos, entre otras (Glick et al., 2010; Butterworth et al., 2012; Sana et al., 2012), los cuales tiene como función general dañar el revestimientos de las células epiteliales y modular la respuesta inmune, para que *P. aeruginosa* forme un biofilm o atraviese la barrera epitelial y entrar al torrente sanguíneo (Wu et al., 2014).

Durante la fase crónica, se logra observar un fenotipo donde se favorece la sobreproducción de alginato, dando una conversión a colonias mucoides (Wu et al., 2014), y la formación de biofilms, los cuales se forman a partir de partículas de esputo purulento, que sirven como base para la estructura del biofilm (Williams et al., 2010). Los biofilms son estructuras altamente organizadas de bacterias unidas a otras, encapsuladas en sustancias poliméricas extracelulares, compuestas de forma primordial por polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Balasubramanian et al., 2011; Shaan L Gellatly and Hancock, 2013; Wu et al., 2014); protegiendo de esta manera a *P. aeruginosa* contra la respuesta inmune y al estrés ambiental.

La generación del biofilm le permite a *P. aeruginosa* sobrevivir y evadir la respuesta inmune; así como adaptarse al ambiente a su alrededor mediante la regulación negativa de diversos factores de virulencia asociadas con una infección aguda. De igual manera, se observa un aumento en la resistencia antimicrobiana, dada por mecanismos que se pueden clasificar en tres diversas clases, las cuales son resistencia intrínseca (bombas de eflujo e impermeabilidad de la membrana), adquirida (mutación, transferencia horizontal) y adaptativa (cambios en la membrana) (Shaan L Gellatly and Hancock, 2013).

2.1.4. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa*, lo hace un patógeno particularmente difícil de tratar y eliminar; lo anterior es debido en gran parte tanto a la resistencia intrínseca ante una amplia variedad de antibióticos, así como su resistencia adquirida y adaptativa (Shaan L. Gellatly and Hancock, 2013).

La resistencia intrínseca del patógeno es generada a partir del genoma del propio microrganismo; en este caso de *P. aeruginosa*. El primer mecanismo intrínseco de resistencia es la baja permeabilidad de su membrana externa, es este caso debido a un menor número de porinas, así como una longitud disminuida de los mismos; confiriendo resistencia carbapenémicos, aminoglicósidos y quinolonas; a través de los genes *oprD* y *oprF* de forma principal (Breidenstein et al., 2011; Li et al., 2012).

El segundo mecanismo de resistencia intrínseca son las bombas de eflujo dispuestas en la membrana externa, las cuales reducen la acumulación de antibióticos en el citoplasma del patógeno; estas bombas de eflujo pertenecen a la familia de la división de nodulación de resistencia (RND), codificando *P. aeruginosa* 12 sistemas RND (Shaan L. Gellatly and Hancock, 2013; Wu et al., 2014).

Dichas bombas de eflujo son capaces de expulsar una gran variedad de antibióticos, incluidos la tetraciclina, macrólidos fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprima, novobiocina, β-lactamasas y aminoglicósidos (Wu et al., 2014)

El tercer mecanismo de resistencia a antibióticos es la resistencia a β-Lactámicos mediada principalmente por la cefalosporinasa codificada por el gen *ampC*, con el conocimiento de otros 3 genes implicados. Por último la resistencia a aminoglicósidos mediada por enzimas modificadoras de aminoglucósidos provoca la inactivación de los antibióticos en cuestión (Islam et al., 2009) (Williams et al., 2010; Wu et al., 2014), siendo el último mecanismo de resistencia intrínseca conocido hasta el momento.

Los tipos de resistencia adaptativa y adquirida, se encuentran mediados por mecanismos genéticos, tales como la mutación de genes, transferencia horizontal de genes, así como cambios en la membrana mediadas por cambios postraduccionales, confiriendo de esta manera resistencia una gran variedad de antibióticos, como penicilina, quinolonas, aminoglicósidos, carbapenémicos, polimixinas, entre otros (Shaan L. Gellatly and Hancock, 2013).

2.1.5. Tratamiento y control

La resistencia de *P. aeruginosa* a una amplia gama de antibióticos, aunado al lento desarrollo de nuevos., tiene como consecuencia la necesidad buscar nuevas estrategias para el tratamiento de la infección, tales como bacteriófagos, y de enfoques dirigidos contra los factores de virulencia del patógeno. Algunos de los enfoques dirigidos contra factores de virulencia, son compuestos que tienen como objetivo el Quorum Sensing, particularmente aquellos compuestos que compiten contra los autoinductores para el reconocimiento de los receptores (Smyth et al., 2010). De igual manera, otros enfoques tiene como objetivo la prevención de la formación del biofilm y de la inhibición den la expresión y secreción de efectores del Sistema de secreción tipo 3 (Aiello et al., 2010; Zodrow et al., 2012).

En el área clínica, donde se da una gran parte de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* en pacientes hospitalizados, se considera un grupo de medidas de prevención contra la transmisión de microorganismos entre los pacientes hospitalizados, así como en el personal médico. Dichas medidas pueden agruparse en: medidas precautorias, medidas de aislamiento, medidas de limpieza y actividades de vigilancia (Lupión et al., 2014). En diversas ocasiones dichas medidas de prevención no son suficientes para prevenir la infección por *P. aeruginosa*, por lo cual en los últimos años diversas investigaciones están enfocadas en métodos alternativos para el diagnóstico y tratamiento por medio de la detección de sensibilidad a antibióticos de bacterias patógenas de interés, entre ellas *P. aeruginosa*.

2.2. Diagnóstico de *Pseudomonas aeruginosa*

La detección temprana de *P. aeruginosa* se llega a considerar crítica para el tratamiento oportuno de la infección; Actualmente, los métodos más utilizados para la detección son los métodos convencionales mayormente utilizados en laboratorios de diagnóstico clínico, tales como el aislamiento de los microorganismos gracias a medios de cultivos, con su subsecuente detección por pruebas bioquímicas (Tang et al., 2017).

Actualmente, en los laboratorios de diagnóstico, la detección de *P. aeruginosa* se lleva a cabo por el aislamiento con medios de cultivo y su subsecuente detección por pruebas bioquímicas con equipos automatizados, tales como el Viatek 2 (Joyanes et al., 2001), Phoenix 100 (Funke and Funke-Kissling, 2004), MicroScan WalkAway (Saiman et al., 2003), proveyendo de esta manera la detección del patógeno, así como su nivel de susceptibilidad antimicrobiana. En los últimos años se ha optado por la estandarización y utilización de métodos de diagnóstico alternativos, tales como ensayos inmunológicos (ELISAs (Xu et al., 2008), IBTs (Shand et al., 1988), inmunofluorescencia (Tang et al., 2017)), ensayos biológicos moleculares (PCR convencionales (Deschaght et al., 2011), cuantitativas (Qin et al., 2003), técnicas de amplificación isotérmica (Goto et al., 2010), hibridación in situ fluorescente (Søgaard et al., 2005); ensayos MALDI-TOF MS (Imperi et al., 2009).

2.2.1. Diagnóstico convencional

El diagnóstico actualmente utilizado es el aislamiento por medio de cultivos microbiológicos para su posterior detección por pruebas bioquímicas, para que de esta manera se vean favorecidas ciertas características metabólicas de *P. aeruginosa*, bajo condiciones específicas impuestas por los medios de cultivo utilizados. Metabólicamente se considera que *P. aeruginosa* no posee requerimientos nutricionales muy exigentes, por lo cual puede crecer en la mayoría de medios cultivo. El primer reporte que se tiene de medio de cultivo específico, es de Lowbury en 1955 que desarrolló un medio de cultivo selectivo, el cual se encontraba suplementado por 0.03% de cetrimida para el aislamiento de *P. aeruginosa*. Actualmente, en los laboratorios de diagnóstico se utilizan los siguientes: medio de cultivo base agar con Soya-Trypticaseina, agar cetrimida y medio de cultivo base agar con sangre, para su posterior detección por medio de pruebas bioquímicas (Xu et al., 2004).

Las pruebas bioquímicas actualmente utilizadas en la mayoría de laboratorios de diagnóstico son llevadas a cabo por equipos automatizados (Tang et al., 2017). Con el uso de dichos equipos, se disminuyeron los tiempos de detección, aunque en ocasiones se necesita más de 72 horas para la obtención de resultados, considerándose de esta manera diagnósticos de largo tiempo. De igual manera en estudios pasados se ha comprobado la baja tasa de precisión de los tres sistemas

automatizados más usados (Quesada et al., 2010; Tang et al., 2017) además de que se necesitan de un tiempo prolongado para la obtención de resultados, los laboratorios clínicos se han visto en la necesidad de buscar alternativas de detección que no posean dichas desventajas. Otra desventaja que se suma a la detección convencional mediante equipos automatizados, es el costo por tarjeta de identificación utilizadas, dichos costos dependiendo de diversos factores como costo de adquisición del equipo, mantenimiento del mismo, número de tarjetas de identificación y sensibilidad adquiridas al año, tiempo requerido, porcentaje de repetición de pruebas, costo por aislamiento, etc; el costo puede rondar entre \$110.00 y \$280.00 moneda nacional mexicana, dependiendo del laboratorio clínico, para la detección y sensibilidad del patógeno (Kerremans, 2009).

2.2.2. Diagnóstico inmunológico

Las diversas técnicas inmunológicas poseen como principio general la unión altamente específica entre anticuerpos y antígenos para una posterior detección de dicha unión, dichas técnicas inmunológicas han alcanzado un alto nivel de sensibilidad (Tang et al., 2017). Las técnicas inmunológicas más utilizadas actualmente son el Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), método en el cual se utilizan enzimas para marcar moléculas de interés, en este caso al antígeno o anticuerpo, donde la detección se lleva a cabo por sustratos catalizados por las enzimas dando de esta manera luminiscencia para su detección (Aydin, 2015); aunque se considera a las ELISAs como métodos de alta sensibilidad, se puede producir falsos positivos por la alta homología que posee las proteínas de *P. aeruginosa* con otras bacterias patógenas. De igual manera, como se mencionó con anterioridad, las personas que se infectan con *P. aeruginosa* frecuentemente se encuentran inmunocomprometidas, evitando de esta manera una respuesta inmune activa, y la falta de producción de anticuerpos al principio de la infección, dificultando el diagnóstico al principio de una nueva infección por *P. aeruginosa* (Hemachandra et al., 2001) y su posterior tratamiento.

2.2.3. Diagnóstico molecular

A pesar de su gran utilidad en laboratorios de investigación, epidemiológicos y de genotipificación de patógenos, las técnicas moleculares siguen sin ser ampliamente utilizadas en el área de diagnóstico a pesar de su alta sensibilidad y especificidad. La técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se considera la técnica molecular mayormente utilizada, en la cual el principio de la técnica recae en la amplificación de un gen de interés mediante el diseño de cebadores que hibriden de forma específica con el gen de interés para la posterior elongación por la polimerasa y detección por electroforesis en gel (Mullis, 1990); Investigaciones pasadas han reportado la identificación de *P. aeruginosa* mediante la detección de diversos genes, tales como 16S rRNA, *ecfX*, *gyrB*, *algD* GDP manolasa, *oprL* y *fliC* (Tang et al., 2017).. Dichos ensayos poseen la ventaja de tener una alta sensibilidad y especificidad; aunque en contraparte poseen como

desventaja que el diseño de los cebadores tiene que ser específico al gen de interés para que pueda hibridar con la secuencia de interés; además, para la detección del gen amplificado es necesario un análisis electroforético en gel de agarosa (Goto et al., 2010), así como el requerimiento de instrumentos de alta precisión como el termociclador, para la amplificación de la secuencia blanco de interés (Parida et al., 2008)

La PCR cuantitativa basada en fluorescencia, es una técnica que permite una detección en tiempo real de forma cuantitativa de los productos de PCR amplificados, gracias a la introducción de moléculas fluorescentes que permiten la detección del gen(es) blanco(s) (Arya et al., 2005). El fundamento de la técnica provee un ensayo con mayor sensibilidad, capaz de cuantificar los productos de la reacción en cada ciclo de amplificación, en cambio una PCR convencional presenta resultados cualitativos basado en la detección en gel de agarosa; ya sea en una PCR única en tiempo real o una PCR múltiple en tiempo real. Como desventaja para realizar estos ensayos, se requiere de un instrumento de alta precisión para la amplificación y detección de la secuencia blanco amplificada (Parida et al., 2008).

A partir del inicio del presente siglo, se han estandarizado diversas técnicas de amplificación, que en comparación a PCR convencionales, tienen las ventajas en la reducción de tiempos para la obtención de resultados, esto debido a que la reacción de amplificación de lleva a cabo a una temperatura constante, inclusive en un Baño María, por lo cual la utilización del termociclador llega a omitirse. Particularmente, Goto y colaboradores en el 2010 estandarizaron la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP) para la detección del gen *oprL* de *P. aeruginosa* gracias a un ensayo colorimétrico con la utilización de azul de hidroxinaftol (HNB) (Goto et al., 2010), ensayo en el cual lograron un 100% de especificidad y una mayor sensibilidad (10 fold) en comparación a una PCR convencional, ensayo en el cual utilizaron heces de ratón como muestras.

2.3. Técnica de LAMP (Amplificación isotérmica mediada por horquillas)

La técnica molecular de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP), logra la amplificación de la secuencia blanco, con una alta sensibilidad, especificidad, eficiencia y rapidez a una temperatura constante (Notomi et al., 2000). De forma general el método de LAMP comprende múltiples etapas de autociclamiento y síntesis de DNA por medio del desplazamiento de la cadena complementaria (Figura 1); en la cual se amplifica la secuencia blanco de una forma específica, eficiente y con una mayor rapidez bajo condición isotermal, en comparación a una PCR convencional, lo anterior mencionado debido a las características y fundamento de la propia técnica (Goto et al., 2010).

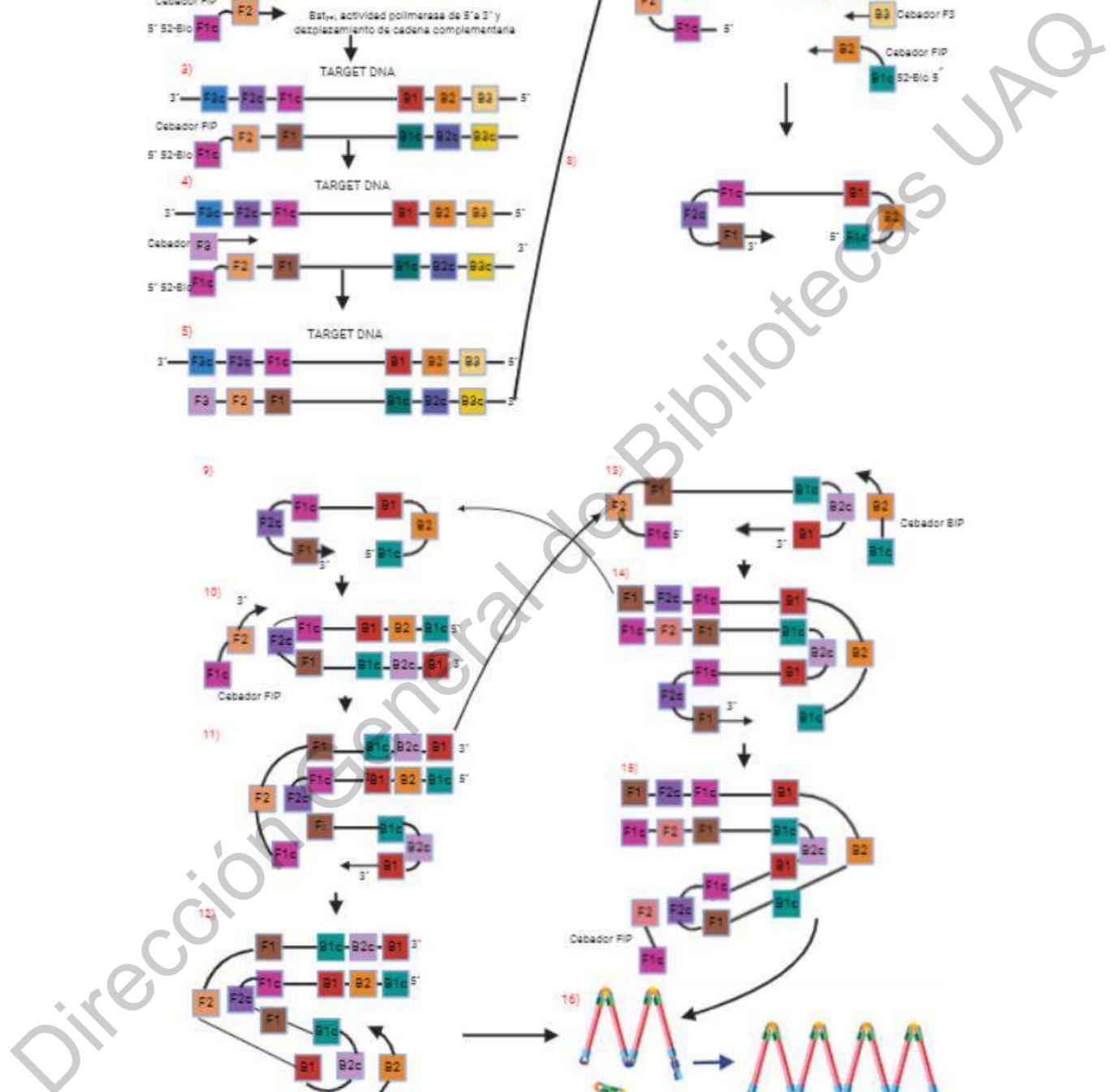


Figura 1. Representación esquemática del fundamento de LAMP durante la amplificación de la secuencia blanco.

La representación se dividió en dos partes, representando la producción del material de partida genético, durante la cual participan tanto los cebadores externos (B3/F3) y los cebadores internos (BIP/FIP), para la producción final de una estructura de DNA en forma tallo bucle en cada uno de sus extremos (Inciso 8). En la segunda parte de la representación se da la síntesis de la cadena complementaria por desplazamiento, así como la síntesis por autocebado; etapa en la cual participan los cebadores internos, así como la estructura de DNA en forma de tallo-bucle sintetizada en la etapa anterior; como producto final se obtiene una estructura de DNA en forma de “Coliflor” (Inciso 16).

2.3.1. Fundamento de la técnica

Como se muestra en figura 2, el gen de interés posee seis regiones distintas en cada una de las hebras, las cuales son reconocidas por los cebadores utilizados, cada una de estas secuencias posee típicamente de 17 a 24 nucleótidos de extensión La reacción de LAMP se lleva a cabo con 4 cebadores, dos de los cuales se conocen como cebadores internos (FIP y BIP), que reconocen e hibridan cada uno con dos regiones diferentes de la secuencia blanco (una región sentido y otra antisentido), los cuales participa para el cebado en la primera etapa y el otro para el auto- cebado en etapas posteriores. Particularmente el cebador BIP, posee la secuencia complementaria de la región B1, un espaciador de TTTT, además de la región B2 de la secuencia blanco. FIP posee la secuencia complementaria de la región F1, un espaciador de TTTT, además de región B2 de la secuencia blanco. En contraparte, los dos cebadores externos (B3 y F3), reconocen una única secuencia cada uno, particularmente las regiones complementarias a B3 y F3. Mediante el uso de cuatro cebadores se logra el reconocimiento de seis distintas regiones diferentes del gen de interés (Figura 2), aumentando de esta manera la especificidad de la técnica; llevándose a cabo la reacción a una temperatura constante entre 60-65°C (Notomi et al., 2000), temperatura a la cual la *Bst* polimerasa (New England BioLabs) extraída de la bacteria *Bacillus stearothermophilus* presenta una actividad de polimerasa de 5'-> 3', así como de desplazamiento de la hebra al mismo tiempo. Nagamine y colaboradores en el 2002 reportaron el uso de dos cebadores complementarios (cebadores de bucle) que aceleraban la reacción, así como aumentan la especificidad de la misma (Nagamine et al., 2002).

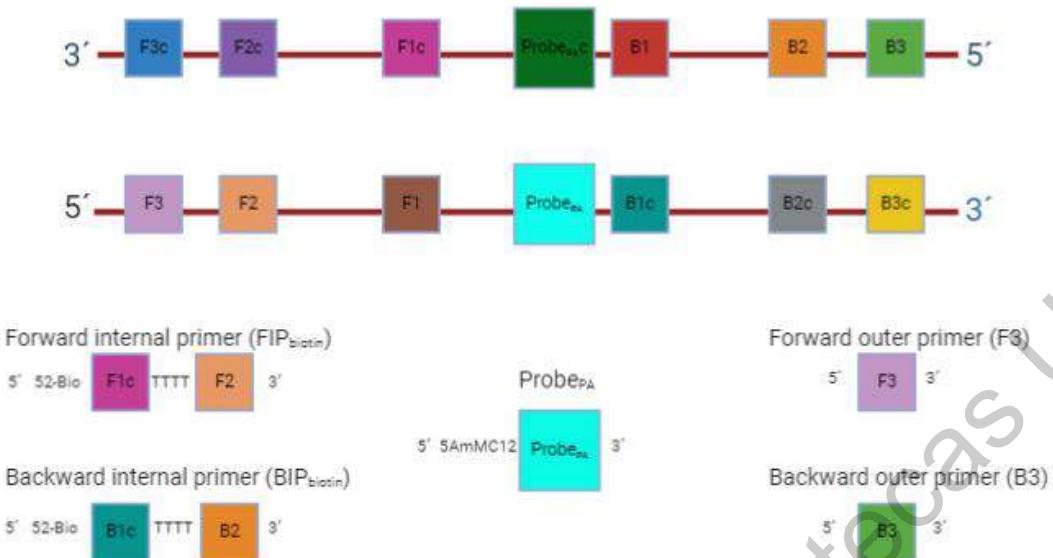


Figura 1. Representación esquemática de los cebadores utilizados en ensayos de LAMP, mostrando de igual manera la región de la secuencia blanco que reconocen cada uno de los cebadores.

La reacción de amplificación se divide en forma general en dos etapas; la primera se conoce como “producción de material de partida”, y la segunda como “amplificación por ciclamiento y elongación”, tal y como se observa en la figura 1. En la primera etapa el cebador interno (FIP), reconoce su secuencia complementarias (F2c) e inician la síntesis de DNA por medio del desplazamiento de la cadena complementaria; posteriormente el cebador externo (F3) reconocen su secuencia complementaria (F3c) en la cadena original y realizan la síntesis por medio del desplazamiento de la cadena previamente sintetizada por el cebador interno FIP, produciéndose de esta manera una cadena con estructura en forma de tallo-bucle al final de uno de sus extremos. Posteriormente, esta cadena con una estructura en forma de tallo-bucle en uno de sus extremos es usada para la síntesis de la cadena complementaria por el cebador interno (BIP) y posteriormente por cebador externo (B3), con lo cual se produce una estructura de DNA en forma de tallo-bucle en cada uno de sus extremos (Fig. 1, inciso 8).

Durante la siguiente etapa participan únicamente los cebadores internos (FIP/BIP) debido a que se encuentran estos en mayor concentración que los cebadores externos; así como la estructura de DNA en forma tallo-bucle en cada uno de sus extremos, sintetizada en la etapa anterior (Fig. 1, inciso 8), durante esta etapa se dan reacciones de desplazamiento de la hebra, así como síntesis por autocebado, donde un cebador interno hibrida con uno de los bucles de la estructura “tallos-bucle” e inicia la síntesis de DNA por desplazamiento de la cadena produciendo una estructura tallo-bucle

y una nueva estructura tallo-bucle donde el tallo es del doble de largo; generándose de esta manera copias adicionales invertidas de la secuencia blanco, así como nuevos bucles. Al final de la reacción se consigue una estructura parecida a una “coliflor”, compuesta por una mezcla de múltiples estructuras tallo-bucle, así como múltiples copias de la secuencia blanco en la misma hebra (Fig 2, inciso 16) (Notomi et al., 2000).

Para la etapa de autociclado de LAMP, como se mencionó en el párrafo anterior, uno de los cebadores internos (FIP), reconoce un bucle de la estructura tallo-bucle, para de esta manera se genere una nueva estructura de DNA con un tallo-bucle, además de una copia invertida adicional de la secuencia blanco, intermediada por un hueco (Fig. 1, inciso 11). La síntesis y el desplazamiento de la cadena auto-cebada del paso anterior, produce una nueva estructura complementaria en su secuencia a la estructura del DNA tallo-bucle original; así como un DNA tallo-bucle con un tallo doblemente de largo y un bucle en el extremo opuesto (Fig. 1, inciso 12 y 16 respectivamente).

Los productos sintetizados en el inciso 12 y 16 de la figura 1, sirven como base para las subsecuentes etapas, donde el cebador BIP hibrida en las siguientes etapas. El producto final de la reacción, es una estructura de DNA con múltiple tallos y horquillas formadas por copias invertidas alternadas de la misma secuencia blanco , generando una estructura denominada “coliflor” (Notomi et al., 2000).

2.3.2. Procedimiento de la técnica

Para llevar a cabo la técnica de LAMP primero se realiza la extracción de DNA a partir de muestras clínicas, así como de colonias de bacterias aisladas; el material genético es sometido a una reacción de LAMP con los cebadores internos y los cebadores externos diseñados o tomados del GenBank, para la amplificación de una secuencia blanco, particularmente la de un gen que sea específico del patógeno de interés. Dicha reacción al utilizar la enzima *Bst* pol puede llevarse a cabo a una sola temperatura entre 60-65°C en un termociclador o en Baño María dependiendo de los equipos con los que cuente el laboratorio (Parida et al., 2008).

Para la detección de los productos amplificados por la técnica de LAMP, se han reportado el análisis electroforético en gel de agarosa, técnica en la cual se observa la aparición de un “barrido” en el carril de los productos obtenidos, característico de la técnica de LAMP (Notomi et al., 2000); Barrido producido debido a la estructura de coliflor con múltiples secuencias sentido y antisentido de la secuencia blanco, generada durante la reacción. De igual manera, se ha reportado la detección del material genético amplificado mediante reacciones colorimétricas, el ejemplo más estudiado de ellas es la detección por medio del azul de hidroxinaftol (HNB) (Goto et al., 2009), método en el cual se aprovecha la gran cantidad de pirofosfato de magnesio liberado, el cual reacciona con el HNB; una reacción positiva, es considerada por el cambio de color de azul a violeta. La detección colorimétrica

por turbidez y/o cambio de color a simple vista, posee como ventaja la disminución en costos al omitirse el uso de equipo especializado para la detección del material genético, de vital importancia para países en desarrollo; pero en contraparte, la detección depende del criterio de cada persona, y de igual manera existe un aumento en de riesgo de contaminación.

2.3.3. Condiciones óptimas para la reacción de LAMP

De los aspectos a tomar en cuenta en la reacción de LAMP, la T_m (temperatura de fusión) posee un papel importante para la hibridación de los cebadores con la secuencia de interés. En las secuencias internas de FIP y BIP (F2 y B2 respectivamente), los valores de T_m tienen que ser elegidos para que se encuentren en un rango de 60 a 65°C. En cambio, las secuencias externas de los cebadores FIP y BIP (F1c y B1c respectivamente), se escogen preferentemente superior a las secuencias F2 y B2, para que de esta manera se genera la estructura de bucle posterior a la liberación de hebra de DNA recién sintetizada. La T_m de los cebadores externos (F3 y B3) se escoge con un valor menor que las secuencias F2 y B2 de los cebadores internos; lo anterior para asegurar que en la reacción se utilicen primeramente los cebadores internos que los externos (Eiken Chemical Co; Notomi et al., 2000); de igual manera la concentración de los cebadores externos en comparación a los internos varía de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{10}$.

Otros aspectos a tomar en cuenta es el contenido de GC en los cebadores, los cuales deben de estar en un rango entre el 60 a 65%. El tamaño de la secuencia blanco a amplificar debe de estar un rango de 130 a 200 pb. Por último el uso de desestabilizantes de la hélice tales como la betaína o la L-prolina elevan la eficiencia de la reacción (Notomi et al., 2000).

2.3.4. Ventajas del uso de la LAMP

Dentro de las ventajas del uso de la técnica de LAMP, se encuentra la disminución en costos para llevar a cabo la técnica, esto debido a dos aspectos a considerar: 1) la reacción puede llevarse a cabo sin la necesidad de la utilización de un termociclador, esto debido a que la reacción se lleva cabo a una sola temperatura en el rango entre 60°C a 65°C; 2) el método de detección de la secuencia blanco amplificada no requiere necesariamente la utilización de un análisis electroforético en gel de agarosa, ya que puede realizarse mediante análisis de la turbidez de la reacción así como por detección colorimétrica (Goto et al., 2009).

En comparación a técnicas de diagnóstico convencionales de detección, la técnica de LAMP posee la ventaja de que el tiempo necesario para la obtención de resultados, puede llevarse a cabo en un menor tiempo; esto debido a que solo se requiere el tiempo para realizar la extracción de DNA (máximo 2 horas), la técnica de LAMP (30-60 minutos), y posteriormente el método de detección escogido (máximo 2 horas); de igual manera llega a ser práctica, ya que existe la posibilidad de

utilizar diversos cebadores para detectar diversas secuencias blancos de distintos microorganismos patógenos, así como la posibilidad de analizar múltiples muestras en una sola corrida. De igual manera la técnica puede llevarse a cabo sin la necesidad de personal experimentado, solo requiere seguir las indicaciones del manual y/o protocolo estandarizado. Como desventajas que puede llegar a presentar el ensayo de LAMP, es el complicado diseño de los cebadores, el nivel de pureza durante la síntesis de los mismo mediante HPLC (Parida et al., 2008).

2.4. Técnica de RLBH

La técnica de RLBH (Hibridación por transferencia en línea reversa) integrada con técnicas de amplificación de secuencias blanco por medio de PCR multiplex permite la detección de hasta 43 blancos provenientes de muestras distintas. La técnica fue desarrollada y estandarizada por primera vez para el diagnóstico de la anemia de células falciformes (Saiki et al., 1988) y por Kaufhold y colaboradores en 1994 (Kaufhold et al., 1994) para la para la detección de serotipos de un organismo patógeno, en este caso de *Streptococcus*.

En los últimos años, la técnica ha sido utilizada para la detección, caracterización y tipificación de bacterias, virus, parásitos y hongos (Kamerbeek et al., 1997; Van den Brule et al., 2002; Oura et al., 2004), con los cual supone ser una excelente alternativa de detección acoplada a técnicas de amplificación de una secuencia blanco para el diagnóstico microbiológico y estudios epidemiológicos (Kamerbeek et al., 1997); tal como el manual de diagnóstico de tuberculosis pulmonar realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016).

2.4.1. Fundamento de la RLBH

El método de RLBH se encuentra integrado junto con una técnica de amplificación múltiple de secuencias blancos, particularmente de una PCR múltiple. La técnica de RLBH está basada principalmente en la hibridación de los productos obtenidos de la reacción de amplificación, con sondas de oligonucleótidos que poseen un grupo amino en su extremo 5', el cual le permite unirse y quedar inmovilizadas en una membrana de nylon; con lo cual se logra la detección de una gran cantidad de distintas secuencias blanco previamente amplificadas (Van den Brule et al., 2002), ya que las membranas de nylon utilizadas, así como el miniblotter, permiten la unión de 43 sondas de oligonucleótidos, así como 43 diferentes productos amplificados (Kong and Gilbert, 2006). Para que la detección del material genético amplificado sea exitosa, es necesario una detección quimioluminiscente o colorimétrica; para ello la secuencia blanco amplificada debe de encontrarse biotinilada, y posteriormente unirse de forma específica a una sonda de oligonucleótidos complementaria; tanto la sonda como el producto amplificado se incuban con streptavidina conjugada con otra enzima para la reacción de detección. El ejemplo más estudiado es la detección mediante streptavidina conjugada a la enzima peroxidasa, para de esta manera degradar el sustrato

de peróxido de hidrógeno y luminol, con lo cual se da la oxidación del luminol y posterior liberación de luz (Kong and Gilbert, 2006).

2.4.2. Procedimiento de la técnica

La técnica de RLBH comprende primeramente la extracción de DNA a partir de distintos individuos, posteriormente el material genético es amplificado con cebadores biotinilados en el extremo 5' y/o desoxirribonucleótidos biotinilados específicos diseñados o tomados del GenBank. Posteriormente las sondas que poseen secuencias complementarias a las secuencias amplificadas se unen a la membrana de nylon o nitrocelulosa mediante el grupo de amino en el extremo 5' de las sondas de forma lineal sobre la membrana usando un miniblotter. Los productos de amplificación son agregados en dirección perpendicular a las sondas, dándose de esta manera la hibridación entre los productos de la amplificación y las sondas (Sparagano et al., 2006). Dicha hibridación puede ser detectada por medio de reacciones colorimétricas o de quimioluminiscencia (Fig. 3) (Gubbels et al., 1999; Kong and Gilbert, 2006).

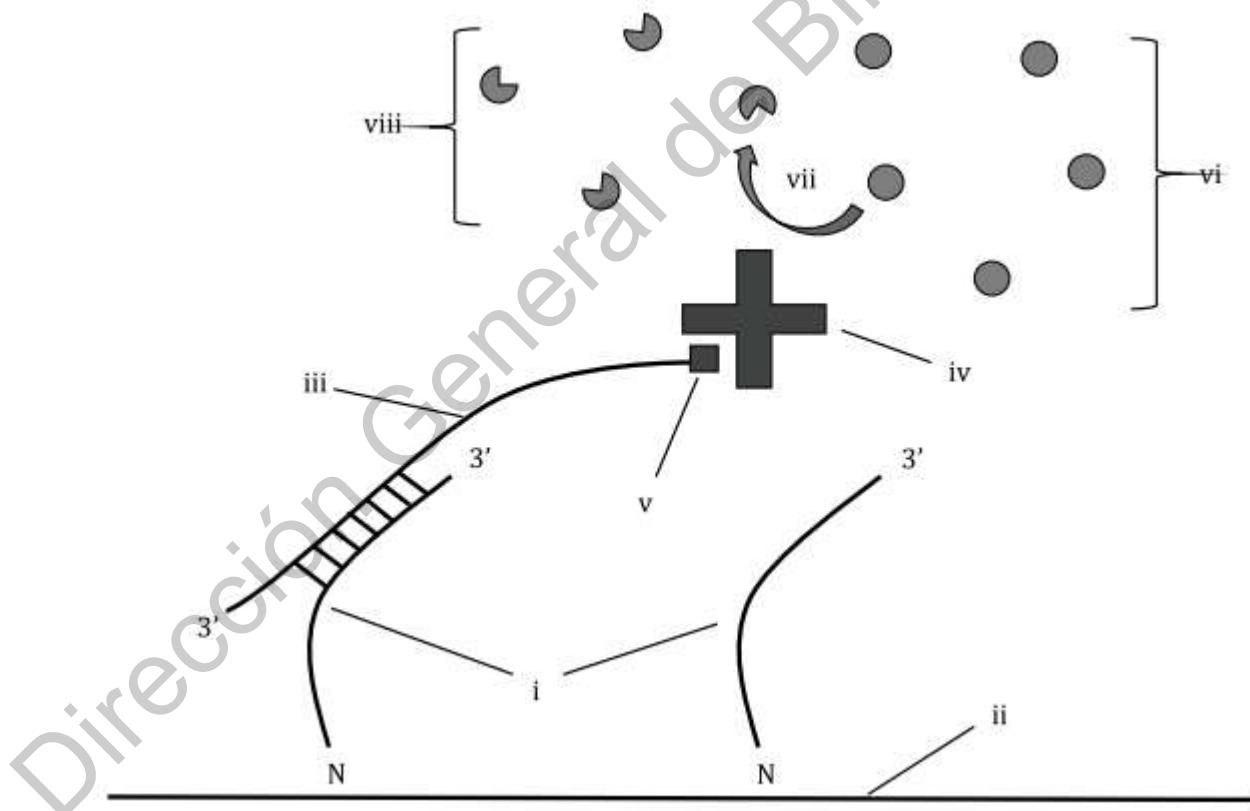


Figura 2. Representación esquemática de RLBH.

Las sondas de oligonucleótidos con un grupo amino (i) son fijadas en la membrana de nylon (ii). El producto amplificado biotinilado (iii) de una secuencia de interés se hibrida a la sonda de

oligonucleótidos a través de la complementariedad de sus secuencias, y posteriormente se añade la streptavidina peroxidasa (iv). La streptavidina añadida se une a la biotina del producto amplificado (v), y escinde la tetrametilbencidina (TMB) (vi y vii), produciendo un precipitado coloreado (viii)

2.4.3. Ventajas del uso de la RLBH

Con el uso de la técnica de RLBH, la principal ventaja es la detección simultánea de múltiples especies de patógenos, a través de la examinación de 43 muestras diferentes de material genético amplificado, para la búsqueda de 43 diferentes secuencias específicas de genes, usando una única membrana, de esta manera se da la reducción en los costos, ya que a partir de una misma prueba se puede dar la detección simultánea de múltiples patógenos (Gubbels et al., 1999). De igual manera la técnica puede ser utilizada para la detección simultánea de múltiples genes de una misma especie de microorganismo, esto con el fin de confirmar la especificidad de la prueba, así como detectar la presencia de genes asociados a la resistencia antimicrobiana; con lo cual a partir de una sola prueba se puede dar la detección del microorganismo patógeno, así como su nivel de resistencia antimicrobiana a través de dada por genes de resistencia. A partir de lo mencionado la combinación entre la técnica de LAMP y RLBH supone una alternativa viable para el diagnóstico microbiológico de rutina, esto debido a que la combinación de dichas técnicas logra una detección rápida, con mayor sensibilidad, y disminución de costos en comparación a las técnicas actuales de diagnóstico.

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades intrahospitalarias en la actualidad representan un alto riesgo de mortalidad en los pacientes, dada por los diversos factores de virulencia sintetizadas por los patógenos; así como su amplio espectro de resistencia antimicrobiana que llegan a presentar, asimismo se suma el tiempo prolongado para la detección del patógeno y posterior tratamiento; por los cual, dichas bacterias patógenas se encuentran como prioridad de diversas organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el desarrollo de métodos de diagnóstico alternativos. La búsqueda de dichas alternativas, es generada por las limitantes de las técnicas convencionales de diagnóstico, tal como equipo sofisticado y costosos, necesidad de personal capacitado para llevar a cabo las pruebas, largos períodos de tiempo para la obtención de resultados, etc. La detección temprana de *Pseudomonas aeruginosa* se torna como una necesidad debido a las características que llega a presentar el patógeno en alguno de sus etapas de infección; entre dichas características se encuentran; alargar la estancia de los pacientes en los hospitales, presentar resistencia a antibióticos, ser una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis cística. A partir de lo mencionado, se parte de la necesidad de buscar una alternativa de diagnóstico rápido, preciso y eficiente para detectar a *Pseudomonas aeruginosa* utilizando alguna técnica que sea sensible y específica. La detección temprana de un patógeno específico es fundamental para enfrentar y controlar una posible amenaza emergente y tomar las medidas de control adecuadas para mitigar las infecciones del patógeno.

Con el desarrollo y estandarización de la Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP), conjugadas a tiras reactivas, se logrará un diagnóstico temprano de infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en comparación a técnicas tradicionales y comunes de detección. El presente conjunto de técnicas se basa en el principio de la hibridación entre el producto de LAMP con una sonda de oligonucleótidos que se encuentra covalentemente unida a una membrana, con una posterior detección colorimétrica o enzimática; lo cual permite la detección de múltiples secuencias blanco amplificadas, ya sea para detectar múltiples organismos muestrados o a un solo organismo. Dicha detección temprana, permitirá a los laboratorios clínicos un tratamiento temprano de la infección, evitando el progreso de esta, y de igual manera evitando su transmisión; además, disminuirá los costos debido al fundamento de las técnicas utilizadas, y poder realizarse por personal sin mano experta, al seguir únicamente las indicaciones de los manuales utilizados.

A la fecha no se ha realizado ningún estudio en México que use de forma conjunta la técnica de LAMP con RLBH para la investigación y detección de microorganismos patógenos, la cual sugiere una técnica de bajo costo y rápida, con una alta sensibilidad y especificidad

IV. OBJETIVOS

- Objetivo general

Desarrollar un método de diagnóstico LAMP conjugado a tiras reactivas, compuestas de una membrana de nylon acoplada a sondas de oligonucleótidos específicos y nanopartículas de oro.

- Objetivos específicos

1. Diseño de una sonda de oligonucleótidos específica para hibridar un gen blanco de *P. aeruginosa*.
2. Diseño de una tira reactiva para la detección de *P. aeruginosa*
3. Desarrollar el método de LAMP acoplada a tiras reactivas para el diagnóstico de *P. aeruginosa* utilizando diferentes muestras de DNA.

V. METODOLOGÍA

1. Material Biológico

Del cepario del Laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la UAQ, se tomaron 35 muestras de DNA provenientes de muestras clínicas y evaluadas por técnicas microbiológicas como el Viatek 2 y PCR. Las muestras de DNA se utilizaron para estandarizar las técnicas moleculares de la Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR) y Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP).

2. Cuantificación de DNA

Para determinar la concentración de DNA de las muestras, se procedió a la utilización del espectrofotómetro para la lectura de absorbancia, utilizando la relación en la longitud de onda de 260 y 280 nm. El valor de lectura arrojado en la relación de absorbancia de 260 y 280 nm permite estimar la pureza de DNA en las muestras previamente obtenidas. Para considerar una muestra pura, se tomó un cociente entre 1.6 y 2.0, de igual manera a partir de la concentración inicial de material genético de las muestras, se llevó a una concentración conocida de 30 ng/ μ L.

3. Determinación de la integridad de DNA

La integridad de DNA de las muestras obtenidas se verificó mediante la técnica de electroforesis con un gel de integridad de agarosa al 1%. Para ello la agarosa se mezcló en con TAE 1X en una proporción de 1:100 para posteriormente ser homogenizada con pulsos de 30 segundos en un horno de microondas.

El gel de agarosa fue sumergido completamente en TAE 1X dentro de la cámara de electroforesis. 10 μ l de DNA de cada muestra, se mezclaron con 1 μ l de buffer de carga 10 x con GelRed así como 1 μ l de H₂O libre de nucleasas, utilizándose de igual manera un marcador de talla molecular de 1000 pb (Bioline, HyperLadder 100pb). El gel fue sometido a una corrida con 50V durante 35 minutos, para que el material genético migrara hacia polo positivo de la cámara de electroforesis. Para la visualización del material genético en el gel de agarosa se utilizó el fotodocumentador para la detección del GelRed.

4. Diseño de cebadores y sondas

El diseño de los cebadores y las sondas se realizó generando una lista de cebadores y sondas previamente reportadas, así como la búsqueda de secuencias génicas específicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Posterior a la búsqueda de cebadores previamente publicados, se escogió al gen ecfX para la estandarización de la PCR (Goto *et al.*, 2010). De igual manera se realizó una búsqueda de

la secuencia del 16S rRNA de *Pseudomonas aeruginosa* en el GenBank para encontrar una región dentro del mismo que fuera específica de la especie mediante la herramienta de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A partir de la secuencia específica de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, se realizó el diseño de cebadores de oligonucleótidos y sondas que serían utilizadas para amplificar el gen 16S rRNA e hibridizar con el amplificado del mismo sobre la membrana respectivamente, cumpliendo con los requerimientos y características físicas necesarias, tales como longitud entre 18 a 20 pb Tm= 58-65°C, sin formación de dímeros, etc (Kong y Gilbert, 2006).

5. Estandarización de PCR y LAMP

Los cebadores empleados fueron sintetizados comercialmente por la empresa oligoT4. Las secuencias de los cebadores para las técnicas de PCR y LAMP, las sondas de oligonucleótidos y la región del gen blanco se muestran en el cuadro 1. Los cebadores internos utilizados en la técnica de LAMP fueron marcados en su extremo 5' con un grupo biotina, para la posterior unión del producto amplificado con la streptavidina; de igual manera la sonda de oligonucleótidos se encuentra modificada en su extremo 5' por un grupo amino para de esta manera mediar la unión entre la sonda y la membrana, dicha secuencia de la sonda es complementaria a la región abarcada donde hibridan los cebadores internos en la secuencia blanco.

Cuadro 1. Cebadores y sondas de oligonucleótidos sintéticos utilizados durante la amplificación e hibridació material genético.

Patógeno	Cebador	PCR amplicon	Gen	Longitud	%GC	Tm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F3	216 bp	16S rRNA	25bp	52%	60.3°C
	B3			23bp	56.50%	60.3°C
	FIPbiotin			51bp	54.90%	71.5°C
	BIPbiotin			54bp	53.70%	70.6°C
	ProbePAamine			23bp	47.80%	57.4°C
	ECF1	528 bp	ECFx	19bp	57.90%	58°C
	ECF2			18bp	61.10%	56.8°C
<i>Anaplasma/ Erlichia</i>	Probe CA A/E			20	45%	51.8°C

Para la optimización de las técnicas de PCR y LAMP se probaron varias condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos, además de diferentes concentraciones de los reactivos utilizados; de esta manera determinar el máximo rendimiento de cada una de las técnicas. Las temperaturas y tiempos finales son los mostrados a continuación:

- PCR:
94°C 5 min

94°C 20 seg
58°C 30 seg 30 ciclos
72°C 1 min
72°C 5 min

- LAMP

63°C 1 hr
80°C 3 min

La sensibilidad diagnóstica de ambas técnicas moleculares para la detección de *P. aeruginosa*, se determinará utilizando una concentración de 30 ng/μL de DNA de las muestras clínicas obtenidas. A partir de las concentraciones conocidas de 30 ng/μL se realizaron diluciones seriadas de 10⁻² – 10⁻⁹, para determinar el límite de detección y reproducibilidad. La especificidad diagnóstica se realizó con reacciones de DNA genómico de *P. aeruginosa*, así como con especies diferentes de bacterias de importancia clínica.

6. Hibridación de las sondas a la membrana de nylon

Para realizar la hibridación de la sonda de oligonucleótidos sobre la membrana de nylon (Biodyne C), primeramente se realizó la activación de la membrana de mediante la utilización de EDAC (1-etil-3-3 [dimetilaminopropil] carbodiimida) al 16%, en un patrón de líneas utilizando un Miniblotter 45 (Immunetics, Cambridge, EUA); mediante lo cual permitió la unión covalente entre las sondas de oligonucleótidos y la membrana a través del grupo amino en el extremo 5' de la sonda. Las sonda fueron diluidas a una concentración de 100 y 200 pM utilizando una solución de NaHCO₃ con un pH 8.4 y con ellas se llenaron de forma lineal los slots del Miniblotter. Posteriormente, la membrana fue lavada con SSPE 2x y 0.1 % de SDS e incubada a 60 °C durante 5 min, y colocadas de nuevo en el miniblotter con las líneas de los oligonucleótidos perpendiculares a las ranuras de este, para el posterior llenado de los slots perpendiculares con los productos amplificados obtenidos de la reacción de LAMP.

7. Estandarización de la prueba de RLBH

Los productos amplificados obtenidos de la reacción de LAMP fueron mezclados con 2x SSPE/ 0.1% SDS, posteriormente estos productos amplificados fueron desnaturizados a 90°C durante 10 minutos. Antes del llenado de los slots de perpendiculares a la sonda, la membrana fue incubada de igual manera con 2X SSPE / 0.1 % SDS a 60 °C por 5 minutos. Posterior al llenado de los slots la membrana fue incubada a 58°C por 60 minutos para la hibridación de las sondas con los productos amplificados.. La membrana fue lavada con 2X SSPE/0.5% SDS. En cada membrana se incluyeron

dos controles positivos de *Pseudomonas aeruginosa*, así como un control negativo y un control sin DNA.

8. Detección de hibridación entre sondas de oligonucleótido y productos amplificados

Posterior a la hibridación con los productos de LAMP, se utilizó TMB ((3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) a temperatura ambiente. Se añadió 20 mL de la solución Sustratos TMB Pierce a la membrana de RLBH. Posteriormente se incubó la membrana a temperatura ambiente durante 15-30 minutos o hasta que se desarrolle el color deseado (Azul, como resultado de los radicales de oxígeno producidos por la hidrólisis del peróxido de hidrógeno por HRP), la reacción se detuvo agregando 10mL de H₂O_d a cada pocillo a la membrana.

VI. RESULTADOS

Las muestras utilizadas en este estudio fueron analizadas para determinar la concentración y la calidad de estas. El cuadro 2 muestra la relación 260/280 y 260/230 de las 35 muestras de DNA de *P. aeruginosa*.

Cuadro 2. Cuantificación de DNA genómico, de muestras de DNA donadas por el Cepario del Laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS), UAQ.

Muestra	[Inicial ng/ μ L]	260/280	260/230	[Final 30 ng/ μ L]
1	1244 ng	1.86	1.41	30 ng
2	1416.8 ng	1.79	1.21	30 ng
3	2637.3 ng	1.77	1.15	30 ng
4	2183 ng	1.86	1.61	30 ng
5	2637.3 ng	1.77	1.15	30 ng
6	8045 ng	1.83	1.46	30 ng
7	3783.6 ng	1.85	1.42	30 ng
8	3995.1 ng	1.80	1.28	30 ng
9	136.8 ng	1.69	1.34	30 ng
10	974.4 ng	1.87	1.35	30 ng
11	436.3 ng	1.84	1.28	30 ng
12	2037.6 ng	1.09	0.97	30 ng
13	1933.5 ng	1.91	1.73	30 ng
14	2541.6 ng	1.77	1.20	30 ng
15	1395.7 ng	1.65	0.95	30 ng
16	40.9 ng	1.56	1.19	30 ng
17	1461 ng	1.85	1.54	30 ng
18	4295.9 ng	1.77	1.44	30 ng
19	8520 ng	1.78	1.65	30 ng
20	845 ng	1.82	1.76	30 ng
21	82 ng	1.87	1.05	30 ng
22	54.9 ng	1.73	0.72	30 ng
23	31.3 ng	1.79	0.5	30 ng
24	11.1 ng	1.92	0.28	30 ng
25	124.8 ng	1.95	1.13	30 ng
26	9.9 ng	2.27	0.30	30 ng

27	146.5 ng	1.56	0.96	30 ng
28	694.1 ng	1.59	0.96	30 ng
29	12.1 ng	1.86	1.65	30 ng
30	1.8 ng	1.92	1.56	30 ng
31	20.9 ng	1.82	1.75	30 ng
32	208.9 ng	1.92	1.54	30 ng
33	448.9 ng	1.88	1.74	30 ng
34	0 ng	0.41	0.39	30 ng
35	445.4 ng	1.83	1.93	30 ng

Las muestras de DNA, fueron analizadas en geles de agarosa y teñidas con red gel. El análisis en gel mostró que las muestras de DNA están integras para ser utilizadas en la técnica de diagnóstico (figura 4).



Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de muestras genómicas de *P. aeruginosa* para determinación de integridad.

Gel de agarosa al 1% teñido con GelRed, representativo de las 35 muestras analizadas para determinar la integridad del DNA genómico extraído de las muestras donadas por Cepario del LINVAS, UAQ. Carril 1. Marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2-8; DNA genómico de muestras clínicas numeradas de la 1 a la 14. Las flechas en color rojo indican el DNA genómico íntegro.

CUADRO 1. Cebadores y sondas de oligonucleótidos sintéticos utilizados durante la amplificación e hibridación del material genético

Patógeno	Cebador	PCR amplicon	Gen	Longitud	%GC	Tm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F3	216 bp	16S rRNA	25bp	52%	60.3°C
	B3			23bp	56.50%	60.3°C
	FIPbiotin			51bp	54.90%	71.5°C
	BIPbiotin			54bp	53.70%	70.6°C
	ProbePAamine			23bp	47.80%	57.4°C
	ECF1	528 bp	ECFx	19bp	57.90%	58°C
	ECF2			18bp	61.10%	56.8°C
<i>Anaplasma/Erlichia</i>	Probe CA A/E			20	45%	51.8°C

Los oligonucleótidos utilizados en la prueba de LAMP, así como la sonda especie-específica de *P. aeruginosa* fueron diseñados a partir de la secuencia del gen 16S rRNA de *P. aeruginosa*. El gen 16S rRNA es un gen ribosomal bacteriano, el cual es parte de la subunidad 30S, ampliamente utilizado para la identificación, caracterización y clasificación bacteriana (Chakravorty et al., 2007). Aunque llega a considerarse de forma general como un gen conservado en todas las especies bacterianas, el gen 16S rRNA posee diferentes regiones hipervariables dependiendo de cada especie bacteriana. Estas regiones hipervariables proporcionan una gran diversidad a las bacterias, dependiendo de las alteraciones que lleguen a presentar las cuales hacen que cada bacteria sea diferente.

Con respecto al desarrollo de la técnica de LAMP para el diagnóstico de *P. aeruginosa*, en ninguna investigación reportada previamente se utilizó el gen 16S rRNA, como blanco a amplificar mediante el diseño de cebadores de diagnóstico específicos contra este gen. Por lo cual el presente trabajo se posiciona como la primera investigación que utiliza una región del gen para el diagnóstico molecular mediante LAMP. Para determinar la región más conservada se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de 10 diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Durante nuestro análisis bioinformático observamos que algunas secuencias nucleotídicas de las cepas de *P. aeruginosa* en la base de datos en el GenBank se encuentran parciales, por lo que en estas secuencias no se pudo analizar el grado de conservación del gen 16S rRNA. El tamaño del gen ribosomal es de 1526 pb, las secuencias parciales tienen una talla molecular de 868 pb. El análisis del alineamiento múltiple muestra regiones conservadas, en estas secuencias se realizó el diseño de los cebadores; dicha

región tiene un tamaño de 251 pb desde el extremo 5' del cebador F3 hasta el extremo 3' de cebador B3. Los análisis de secuencia de datos en el GenBank así como la secuencia de los cebadores fueron omitidos en el presente escrito, debido a un proceso de patente en el que se encuentran estos últimos.

Los cebadores de oligonucleótidos, así como la sonda oligonucleótidos especie-específicas que se utilizaron, fueron diseñados manualmente con el OligoAnalyzer de IDT (Integrated DNA Technologies), esto debido a experiencias previas en el laboratorio. Durante el diseño de los oligonucleótidos se cuidó cumplir con las condiciones óptimas y necesarias para la reacción de LAMP, entre las que se destacan; la longitud, el contenido de GC, la T_m , formación de estructuras secundarias, autodímeros, etc. Posteriormente al diseño se enviaron a sintetizar con Oligo T4, y se realizaron los posteriores ensayos.

Para comparar la eficiencia, sensibilidad y especificidad de las técnicas de PCR y LAMP se utilizaron los cebadores del gen *ecfX*., el cual codifica un factor sigma de función extracitoplasmática , el cual es restringido de forma específica a la especie de *P. aeruginosa* (Lavenir et al., 2007) . La sonda de oligonucleótidos CA A/E (Catch all *Anaplasma/Ehrlichia*) fueron reportados por Jiménez y colaboradores en 2016, como sonda género específica para los géneros de *Anaplasma* y *Ehrlichia*, fue utilizada como control negativo de sondas, en la técnica de RLBH.

La figura 5, muestra el diseño de la membrana y la organización de las sondas utilizadas en entre trabajo. Las sondas de oligonucleótidos se indican en el eje y, y los los productos amplificados de los microorganismos utilizados se indican en el eje x. En el eje y, la disposición es la siguiente; en el primer carril se utilizó agua destilada en lugar de la sonda Probe PA como control negativo, en cambio sobre los carriles del 2 al 4 se utilizó por triplicado la sonda Probe PA; y en el último carril se utilizó la sonda Catch-All *Anaplasma/Ehrlichia* (Probe CA A/E) como otro control negativo. En el eje de las x, se utilizó DNA de *P. aeruginosa*, así como de otras bacterias de interés hospitalario, para de esta manera confirmar la especificidad de la prueba. De igual manera, se utilizó diluciones del material amplificado tanto de *P. aeruginosa*, así como DNA de otra bacteria de interés hospitalario para la determinación de la sensibilidad de la prueba.

Figura 4. Esquema de la unión de las sondas de oligonucleótidos a la membrana de nylon.

La disposición de los productos amplificados por LAMP es la siguiente; el carril 1 y 2 pertenecen al Control negativo y Control positivo de *P. aeruginosa* (Agua destilada y cepa ATCC ..), del carril 3 al 22 son productos de LAMP de *P. aeruginosa*, del carril 23 al 26 son bacterias de interés hospitalaria (*Klebsiella*, *S. aureus*, *E.coli* y *Proteus* respectivamente); de los carriles 27 al 31 son diluciones de productos de LAMP de *P. aeruginosa* (30ng, 3ng, 0.3ng, 0.03ng y 0.003 ng respectivamente), y por último de los carriles 32 al 36 son diluciones de productos de LAMP de *E. coli* (30ng, 3ng, 0.3ng, 0.03ng y 0.003 ng respectivamente).

Para realizar la comparación entre la técnica de PCR y LAMP, se hizo la técnica de PCR mediante una reacción de 30 ciclos, los productos fueron analizados en un gel de agarosa teñido con red gel. La figura 6 muestra la amplificación del gen *ecfX*, utilizando los cebadores *ecfX1* y *ecfX2*, con una talla de 528pb(Lavenir et al., 2007).

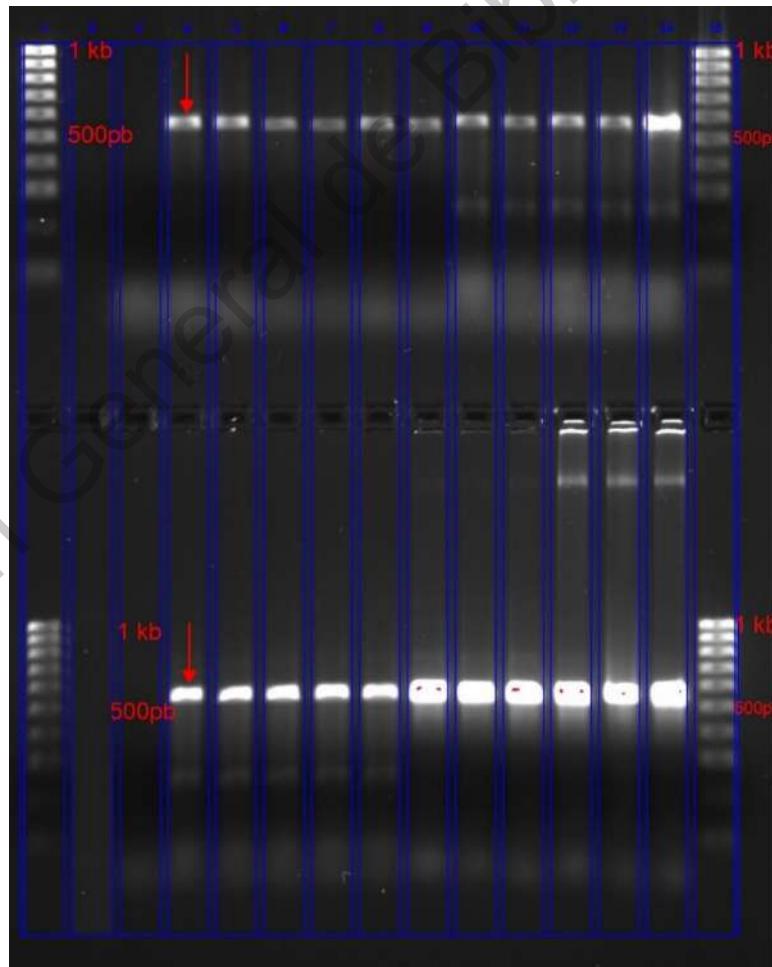


Figura 5. Ensayo de PCR para *P. aeruginosa*, amplificando el gen *ecfX*.

Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5%, de 20 diferentes muestras de DNA de *P. aeruginosa*. Carril 1, Marcador de peso molecular de 1kb; carril 3, control negativo; carril 4-13, amplicones de *Pseudomonas aeruginosa* de las muestras genómicas, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 ,15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 32, 33, 35 respectivamente. El carril 14 es el control positivo de *Pseudomonas aeruginosa*. Las flechas en color rojo indican producto amplificado ~528 pb.

La figura 7, muestra la amplificación del gen RNA ribosomal 16s, en la talla esperada de 216 pb, en las 20 muestras de *P. aeruginosa*.

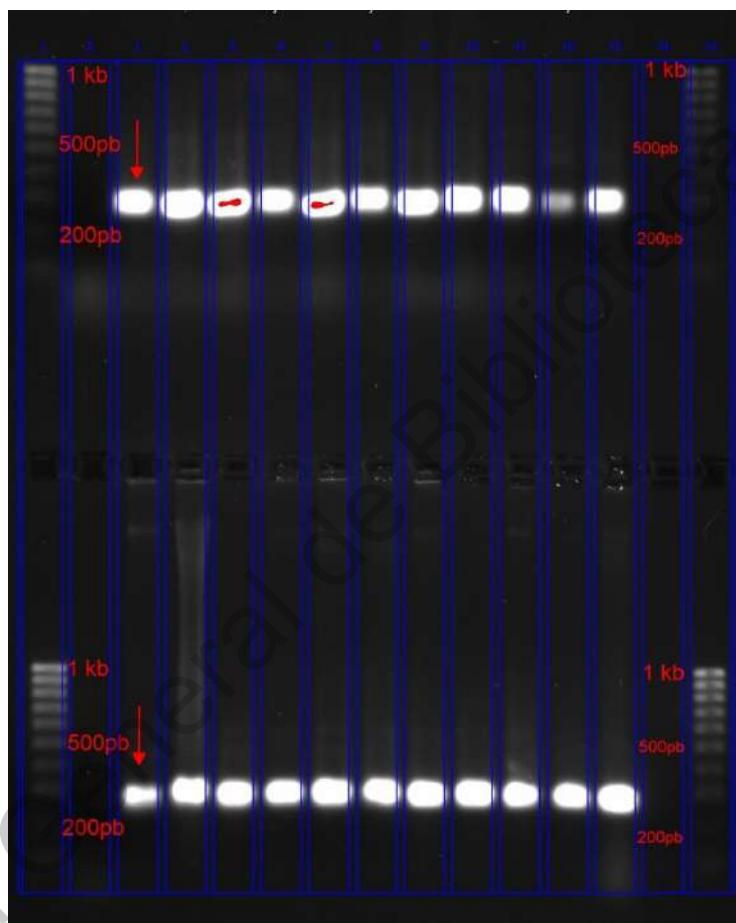


Figura 6. Ensayo de PCR para *P. aeruginosa*, amplificando el gen 16S rRNA.

Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5%, de 20 diferentes muestras de DNA de *P. aeruginosa*. Los productos de PCR se obtuvieron después de una reacción con 30 ciclos de amplificación, el tamaño esperado del gen amplificado es de 216pb (Gen 16s rRNA, cebadores F3 y B3). Carril 1, Marcador de peso molecular de 1kb; carril 3, control negativo; carril 4-13, amplicones de *P. aeruginosa* de las muestras genómicas, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 ,15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 32, 33, 35 respectivamente. El carril 14 es el control positivo de *P. aeruginosa*. Las flechas en color rojo indican producto amplificado.

En ambos ensayos de PCR, utilizando tanto los cebadores externos de LAMP (F3 y B3), así como los reportados por Lavenir en 2007 para amplificar el gen de *ecfX* (*ecfX1* y *ecfX2*); se obtuvieron los amplicones en las tallas esperadas.

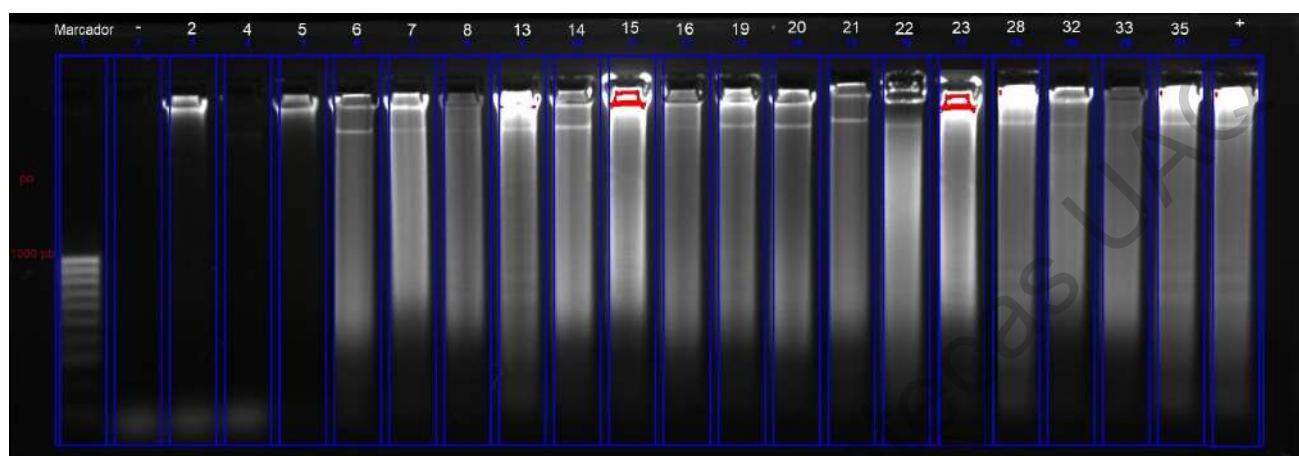


Figura 7. Ensayo de LAMP por triplicado para *Pseudomonas aeruginosa*, amplificando el gen 16S rRNA.

Análisis electroforético en gel de agarosa al 1%, de 19 productos de LAMP del gen 16S rRNA, de diferentes muestras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, por triplicado. Carril 1, Marcador de peso molecular de 1kb; carril 2, control negativo; carriles 3-21, amplicones de *P. aeruginosa*, carril 22 control positivo de *P. aeruginosa*.

La figura 8 muestra los 19 productos amplificados de LAMP para la detección de *P. aeruginosa*, en el gel se observa el barrido característico producido por la amplificación isotérmica de la secuencia blanco; dicho barrido es producido por la estructura en forma de “coliflor” generada por la reacción. Los carrioles negativos corresponden a DNA de *E. coli* amplificado con los cebadores para el 16S rRNA, el control positivo para *P. aeruginosa* corresponde a la cepa de referencia ATCC 47085. El experimento se realizó por triplicado, obteniendo los mismos resultados.

La sensibilidad de la técnica de LAMP (Figura 9) para la detección de *P. aeruginosa* se determinó utilizando diluciones seriadas del DNA de *P. aeruginosa* ATCC 47085, la concentración inicial fue de 0.03 ng/µL y las diluciones tenían las siguientes concentraciones de DNA: 3×10^{-3} ng/µL, 3×10^{-4} ng/µL, 3×10^{-5} ng/µL, 3×10^{-6} ng/µL, 3×10^{-7} ng/µL. La sensibilidad de la técnica de LAMP fue de 3×10^{-3} ng/µL.

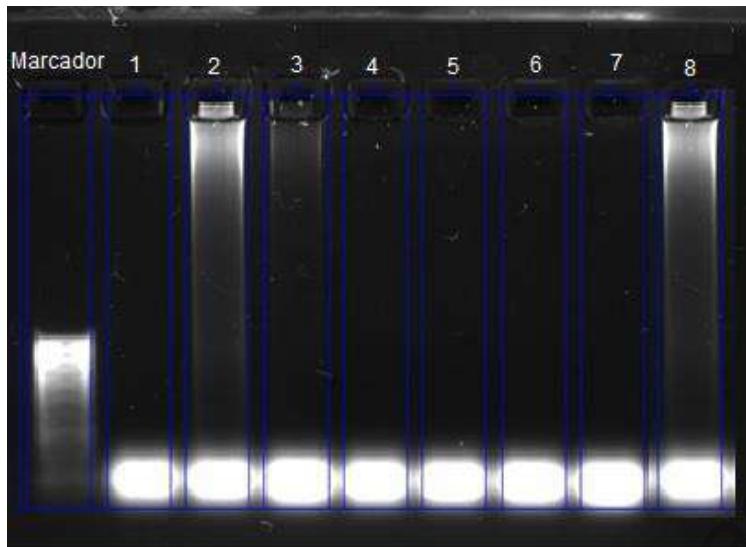


Figura 8. Sensibilidad del ensayo de LAMP para la amplificación del gen 16S rRNA de *P. aeruginosa*.

Sensibilidad de amplificación de LAMP. Carril denominado Marcador, denota el marcador de peso molecular 1000pb, carril 1 control negativo sin DNA y con H₂O_d, carril 2 a 7, diluciones seriadas del amplificado de DNA de la cepa de referencia ATCC 47085 de *P. aeruginosa*, 0.03 ng/μL, 3x10⁻³ ng/μL, 3x10⁻⁴ ng/μL, 3x10⁻⁵ ng/μL, 3x10⁻⁶ ng/μL, 3x10⁻⁷ ng/μL respectivamente, carril 8 control positivo de 30 ng/μL de la cepa de referencia ATCC 47085.

Adicionalmente, se evaluó la sensibilidad de la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos F3 y B3 (Figura 10). El resultado mostró que la sensibilidad de detección fue de 0.03 ng/μL de la cepa de referencia ATCC 47085. De manera comparativa se realizó la PCR para la amplificación del gen ecfX de *P. aeruginosa*, el resultado mostró un límite de detección de 0.03 ng/μL.

La reacción de LAMP seguida por detección en un gel de agarosa al 1% se puede completar en 75 minutos (45 minutos de amplificación, y 30 minutos de análisis electroforético) y de la técnica de PCR es de 130 minutos (70 minutos de amplificación y 60 minutos de análisis electroforético).

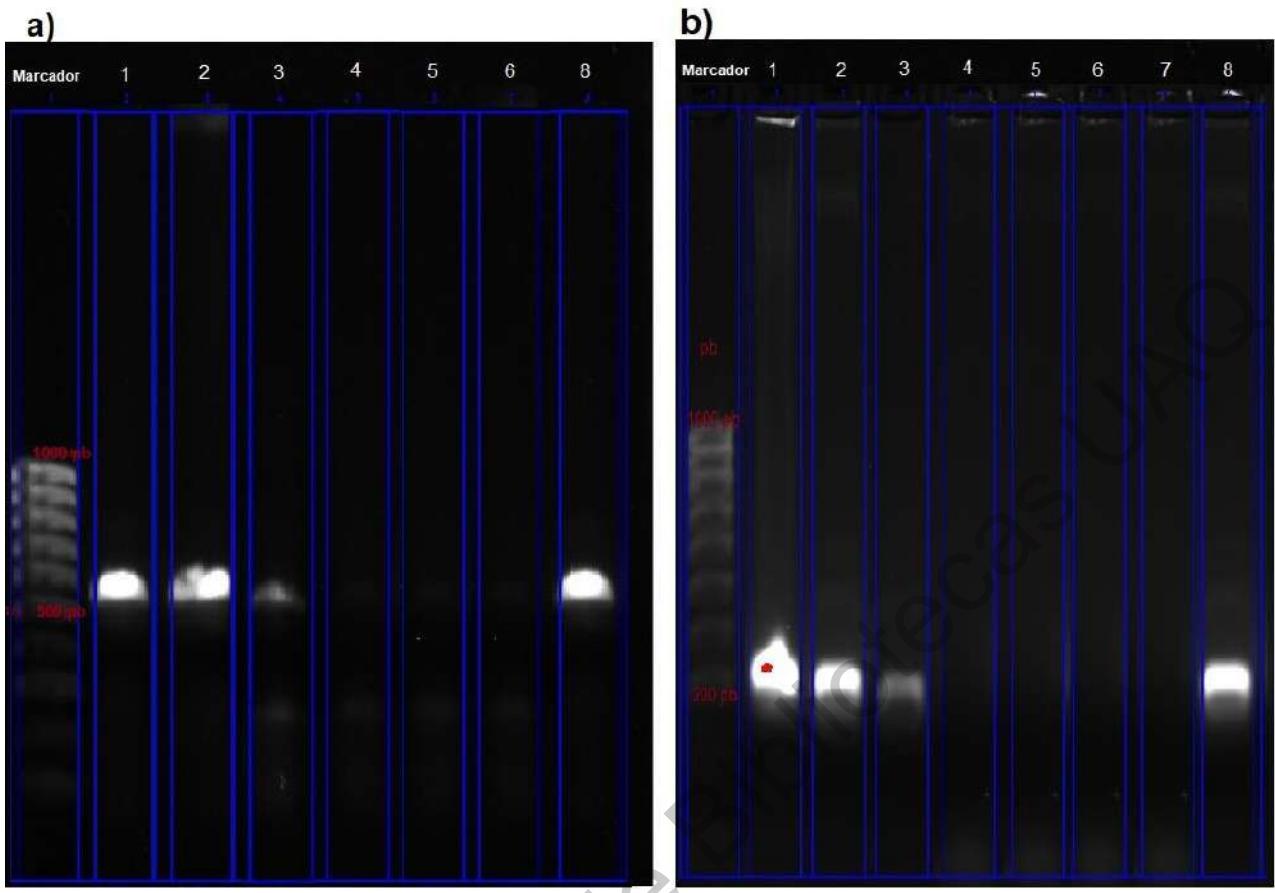


Figura 9. Sensibilidad del ensayo de PCR, para la amplificación de los genes 16S rRNA y ecfX.

Para la disposición de los carriles en la figura 10, tanto el inciso a) como el inciso b), fue la siguiente; Carril denominado Marcador, denota el marcador de peso molecular de 1000pb; carril 1 al 6, son diluciones seriadas del amplificado de DNA de la cepa de referencia ATCC 47085; 3 ng/μL, 0.3 ng/μL, 0.03 ng/μL, 3×10^{-3} ng/μL, 3×10^{-4} ng/μL, y 3×10^{-5} ng/μL respectivamente; carril 7 control negativo sin DNA y con H₂O; carril 8 control positivo de 30 ng/μL de la cepa de referencia ATCC 47085.

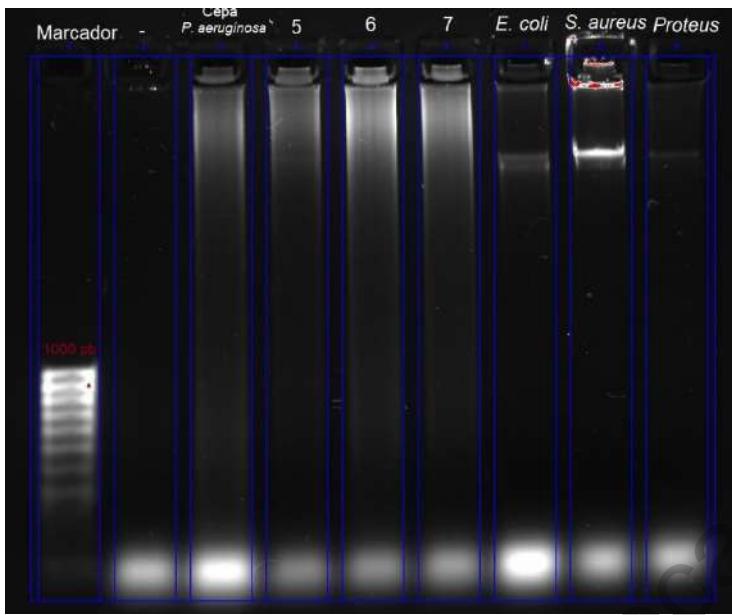


Figura 10. Determinación de la especificidad del ensayo LAMP para la amplificación del gen 16S rRNA.

Ánálisis electroforético en gel de agarosa al 1%, de los productos de LAMP. Carril 1, Marcador de peso molecular de 1000 pb; carril 2, control negativo sin DNA y con H₂Od; carril 3; cepa de referencia de *P. aeruginosa* ATCC 47085.; carril 4-7, muestras amplificadas de *Pseudomonas aeruginosa*; 8, 9 y 10 muestra el DNA amplificado de *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus*, respectivamente.

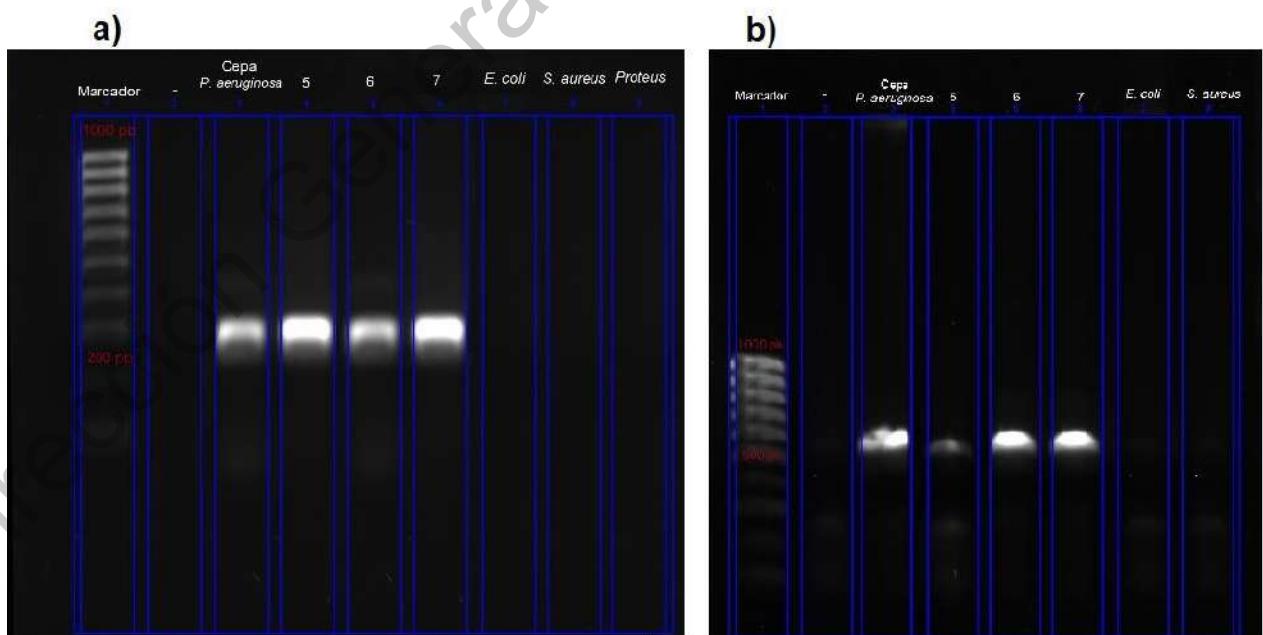
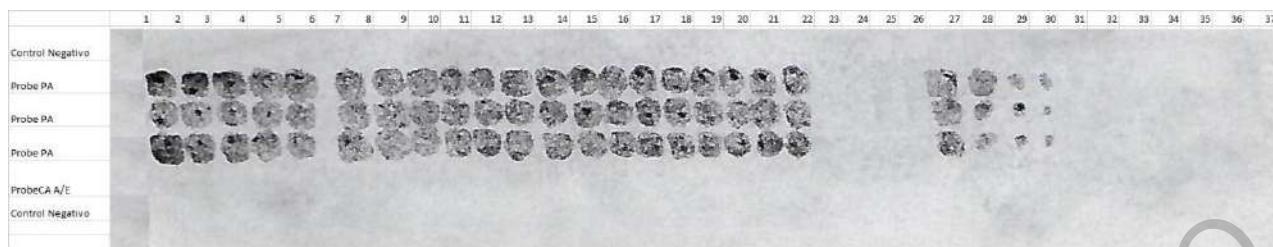


Figura 11. Determinación de la especificidad del ensayo PCR para la amplificación del gen 16S rRNA y del gen ecfX.

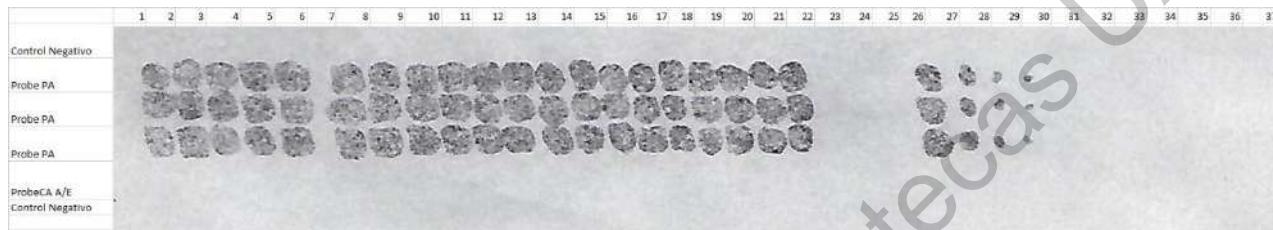
Para la disposición de los carriles en la figura 12, tanto el inciso a) como el inciso b), fue la siguiente; Carril denominado Marcador, denota el marcador de peso molecular de 1000pb; carril 2, control negativo sin DNA y con H₂O; carril 3; cepa de referencia de *P. aeruginosa* ATCC 47085.; carril 4-7, muestras amplificadas de *Pseudomonas aeruginosa*; 8, 9 y 10 muestra el DNA amplificado de *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus*, respectivamente

La especificidad de los ensayos de PCR y LAMP fue examinado con DNA genómico de varias especies de bacterias patógenas. Los resultados de los ensayo de LAMP, así como los de PCR fueron positivos para la cepa de referencia ATCC 47085, así como para las 3 muestras de *P. aeruginosa* analizadas (5, 6 y 7). En cambio, la reacción fue negativa para las 3 muestras de DNA de otras bacterias No *P. aeruginosa* (*E. coli*, *S. aureus* y *Proteus*). Se obtuvieron los mismos resultados al utilizar los cebadores externos del gen 16S rRNA (F3y B3), así como para los cebadores del gen ecfX, al hacer el ensayo de PCR.

A.



B.



C.

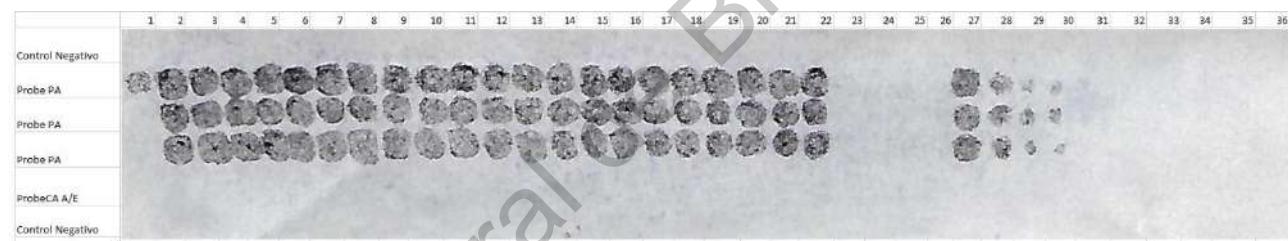


Figura 12. Triplicado de ensayo RLBH para *Pseudomonas aeruginosa*.

Membrana de nylon Byodine C, revelada con Streptavidina HRP, con la siguiente disposición; carril 1 y 37: Control negativo, amplificado de LAMP sin DNA; carril 2: Amplificado de la cepa de *P. aeruginosa* referencia ATCC 47085. Carril 3 al 22, amplificados de 19 muestras de *P. aeruginosa*, las cuales son las muestras 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 32, 33, y la 35 dos veces. Carril 23 al 26., *E. coli*, *Klebsiella*, *S. aureus* y *Proteus*. Carriles 27-31., diluciones seriadas desde los 0.3 ng/ μ L hasta 3×10^{-5} ng/ μ L de concentración de DNA de la cepa de referencia ATCC 47085. Carril 32-36 con la muestra de *E. coli* en diluciones seriadas desde los 0.3 ng/ μ L hasta 3×10^{-5} ng/ μ L.

Se utilizó una sonda de oligonucleótidos especie-específica para *P. aeruginosa* (Probe PA), así como una sonda cacth all, o sonda general para para *Anaplasma/Erlichia* (CA A/E), las cuales fueron covalentemente unidas a la membra de nylon Byodine C.

Las sondas de oligonucleótidos se sembraron de forma horizontal; el primer y sexto carril horizontal se utilizó como control negativo: NaHCO₃ sin ninguna sonda de oligonucleótidos. Del carril 2 al 4 se

utilizó por triplicado la sonda Probe PA especie-específica de *P. aeruginosa*; y por último en el quinto carril horizontal se sembró la sonda de oligonucleótidos CA A/E como otro control negativo. Los productos biotinilados de LAMP se hibridaron de forma perpendicular a las sondas de oligonucleótidos, con la siguiente disposición; carril 1 y 37: Control negativo, amplificado de LAMP sin DNA; carril 2: Amplificado de la cepa de referencia ATCC 47085. Carril 3 al 22, amplificados de 19 muestras de *P. aeruginosa*, las cuales son las muestras 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 32, 33, y la 35 dos veces. Para comprobar la especificidad de la técnica, del carril 23 al 26 se utilizaron como controles negativos bacterias de interés hospitalaria; *E. coli*, *Klebsiella*, *S. aureus* y *Proteus* respectivamente. Para determinar la sensibilidad de la técnica se utilizaron diluciones seriadas desde los 0.3 ng/ μ L hasta 3×10^{-5} ng/ μ L de concentración de DNA de la cepa de referencia ATCC 47085 (Carril 27 al 31), y de igual manera con la muestra de *E. coli* (Carril 32 al 36).

En dos de las tres membranas; las 19 muestras, así como la cepa, amplificados ambos por LAMP hibridaron de forma específica con la sonda de oligonucleótidos especie-específica Probe PA. En la tercera membrana; el amplificado de la muestra número 7 ubicada en el sexto carril no presentó hibridación con ninguna de las 3 sondas Probe PA. Asimismo, en la tercera membrana, el control negativo sin DNA del carril 1, presente hibridación con una de las 3 sondas Probe PA, debido posiblemente a que el tubo de la reacción se contaminó antes de la reacción de LAMP, o al momento de realizar la hibridación en la membrana de RLBH.

Los productos de LAMP de *P. aeruginosa* no mostraron reactividad cruzada con la sonda CA A/E. De igual manera, los amplificados de las bacterias no relacionadas *E. coli*, *Klebsiella*, *S. aureus*, y *Proteus* no mostraron reactividad con la sonda especie-específica Probe PA. El límite de detección de reactividad es de 3×10^{-4} ng/ μ L.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados de la extracción de DNA genómico en más del 70% de las muestras donadas por el Cepario del Laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la UAQ, se ajusta a las características óptimas para su uso posterior en las técnicas de amplificación de material genético mediante la técnica de PCR y/o LAMP (cuadro 2); según lo reportado, la característica óptima del material genético, en el valor de absorbancia de la relación 260/280, debe de caer dentro del rango entre 1.6 a 2.0, indicando de esta manera una pureza en un rango del aceptable al óptimo de la muestra. Los valores obtenidos que se encontraran arriba o debajo del rango anteriormente mencionado se consideraron como muestras contaminadas, ya sea por RNA, o por proteína; a través de compuestos aromáticos, fenólicos; respectivamente. De igual manera la integridad del DNA de cada una de las muestras se determinó mediante un análisis electroforético en gel de agarosa (Fig. 1), en el cual se tomó como integró los carriles que presentaran una única banda por encima del marcador de peso molecular como referencia.

La concentración de DNA sugerida para las reacciones de amplificación mediante PCR y LAMP, se consideró de aproximadamente entre 50 -150 ng/ μ L (MyTaqMix 2x, *Bst* pol; reacción de 25 μ L) esto de acuerdo a cada uno de los procedimientos, enzimas y protocolos utilizados. Dicha concentración de DNA se ajustó para las diferentes reacciones de amplificación realizadas, de acuerdo con los valores de cada muestra, por lo cual, para muestras con valores menores a 10 ng/ μ L, se llegó a utilizar más de 5 μ L de material genético, para obtener un volumen final de 25 μ L por reacción de amplificación, demostrándose de esta manera que esta concentración mínima fue necesaria para la amplificación por PCR y LAMP.

Para demostrar la eficiencia, especificidad, sensibilidad y facilidad de la técnica de LAMP, se seleccionó el gen 16s rRNA como región objetivo a amplificar, lo anterior debido a que presenta tanto regiones conservadas, así como regiones variables. Para lo anterior en estudios anteriores, se diseñaron cuatro cebadores específicos, los cuales reconocen a una región específica del gen 16s rRNA de *P. aeruginosa* entre los nucleótidos 537 al 786 de la secuencia de nucleótidos del gen 16s rRNA con número de acceso NR_026078.1 de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), posteriormente mediante la herramienta de BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se confirmó la especificidad a nivel de especie de la región del gen 16s rRNA amplificada, con respecto a la base de datos del NCBI. Un aspecto para tomar en cuenta durante el diseño de los cebadores fue la secuencia de los mismos, su tamaño, así como su temperatura de hibridación (T_m); cuyo valor tenía que estar en un rango de temperatura entre 60 a 65°C para las secuencias de B2 y F2 de los cebadores BIP y FIP respectivamente; rango de temperatura en la cual la *Bst* pol se encuentra activa. En cambio, el valor de T_m de los cebadores externos (B3 y F3) fueron puestos más bajos que el valor usado para B2 y F2, para de esta manera

asegurarse que se utilizaran primeramente los cebadores internos para la amplificación del gen de interés y posteriormente los cebadores externos; de igual manera la concentración de los cebadores externos fue menor en comparación de los cebadores internos (1/4 - 1/10 respectivamente) (Notomi et al., 2000; Nagamine et al., 2002; Goto et al., 2010).

La región de interés seleccionada del gen 16s rRNA fue utilizada para aumentar la eficiencia de la técnica, lo anterior debido a que dicha región se encuentra conservada en la especie de *P. aeruginosa*, pero no se comparte con otras especies del mismo género, ni con otras especies bacterianas no relacionadas a *P. aeruginosa*: además de que el tamaño del objetivo de la región de interés al ser menor a 300pb aumenta la eficiencia de amplificación, así como el desplazamiento de la hebra sintetizada.

La reacción de amplificación de LAMP fue llevada a cabo a 64°C durante una hora, para en primera instancia realizar la detección mediante un análisis electroforético en gel de agarosa, en el cual la aparición de un barrido en el gel denotaba la amplificación del gen de interés mediante el uso de los cebadores internos, que permiten la generación de horquillas, así como la amplificación de la secuencia blanco en dirección sentido y antisentido de la misma secuencia de interés (Notomi et al., 2000), este barrido característico en el análisis electroforético en el gel de agarosa denota, la estructura en forma de coliflor compuesta de una mezcla de estructuras de DNA tallo-bucle con múltiples copias de las secuencias sentido y antisentido de la secuencia blanco; estructura que explica la lenta migración del DNA amplificado en el gel de agarosa.

Una forma alternativa para confirmar que los productos amplificados por LAMP sean específicos del gen de interés, los productos amplificados pueden ser cortados por diferentes endonucleasas de restricción, para posteriormente ser analizados. Al utilizar una o varias enzimas de restricción, se obtendrían fragmentos de diversos tamaños conocidos dependiendo de la enzima utilizada (Notomi et al., 2000). Otra manera de confirmar la estructura de los productos amplificados, es de igual manera utilizar enzimas de restricción, para la posterior clonación y secuenciación de las bandas obtenidas. En cambio, en este trabajo, se optó por utilizar un ensayo de PCR con los cebadores externos (F3 y B3), para comprobar la especificidad de los mismo, al obtener la banda esperada con un peso molecular de 216 pb, el cual es la talla molecular esperada para el producto amplificado del gen 16s rRNA de *P. aeruginosa*. De igual manera se utilizaron los cebadores para amplificar el gen ecfX mediante PCR como técnica comparativa, dichos cebadores que tienen como blanco el gen ecfX, dichos cebadores demostraron ser específicos para *P. aeruginosa* por Lavenir y colaboradores en 2007.

La especificidad de los ensayos de PCR, LAMP y LAMP/PCR fueron realizados con DNA genómico de varias especies de bacterias. Los resultados obtenidos en los ensayos de LAMP fueron positivos

para la cepa de referencia de *P. aeruginosa*, así como muestras de DNA de *P. aeruginosa*; en cambio los resultados fueron negativos al utilizar DNA genómico de todas las bacterias diferentes a *P. aeruginosa*. Los resultados para los ensayos de PCR utilizando los cebadores de ecfX (1, 2); así como con los cebadores F3 y B3 fueron los mismos a los resultados obtenidos en los ensayos de LAMP. El ensayo de LAMP mostró una especificidad del 100% para *P. aeruginosa* (Fig. 9 a 9.2), para ello se utilizó tanto DNA de las muestras donadas por el Cepario del LINVAS, UAQ; así como material genético de bacterias patógenas de importancia clínica (*E. coli*, *Klebsiella*, *S. aureus* y *Proteus*), ensayo en el que únicamente existió amplificación en las muestras que contenían material genético de *P. aeruginosa*, así como el control positivo para el mismo. Dicha especificidad está dada a que los cebadores utilizados para la técnica de LAMP reconocen una región específica del gen 16s rRNA, la cual posee una baja homología con otras especies del género *Pseudomonas*, así como con otras bacterias patógenas no relacionadas. La especificidad del ensayo de LAMP/RLBH de igual manera mostró el 100% de especificidad, sin presentar reacción cruzada entre las sondas de oligonucleótidos ni en las muestras de DNA.

La solución stock del DNA genómico de los diferentes aislados clínicos, fue diluido en serie en incrementos en base a número 10, y cada una de las diluciones fue puesta a prueba en los ensayos de LAMP y PCR . En comparación; los ensayos de LAMP poseen una sensibilidad 10 veces mayor que la presentada en los ensayos de PCR (utilizando los oligonucleótidos ecfX y B3/B3) para la detección de *P. aeruginosa* (Figura 10) para la técnica de PCR el límite de detección fue de 0.03 ng/µL, mientras que para la técnica de LAMP, el límite de detección fue de 0.003 ng/µL. En cambio, en el ensayo de LAMP/RLBH mostró una sensibilidad 10 veces mayor a la técnica de LAMP acoplada a visualización en gel de agarosa, y 100 veces mayor que la técnica de PCR; con un límite de detección de 3×10^{-4} . Este aumento de sensibilidad así como su alta especificidad en los dos ensayos donde se utiliza la técnica de LAMP, se debe a los cuatro cebadores que reconocen seis secuencias distintas del gen de interés; con lo cual se asegura una alta especificidad de la reacción, así como múltiples lugares de elongación del producto amplificado (Notomi et al., 2000). Para hacer más específica la reacción, se pueden utilizar cebadores en bucle (primers loop), con el propósito de hacer la técnica más sensible y lograr tiempos de reacción más cortos de hasta 15 minutos en comparación a un ensayo de LAMP, sin cebadores en bucle (Nagamine et al., 2002). En el presente ensayo, se logró detectar el producto amplificado por LAMP a los 45 minutos reacción en un gel de agarosa, sin utilizar los cebadores en bucle. Para lograr una prueba point o care, para un uso rápido en hospital, es recomendable que las pruebas utilizadas tengan un tiempo de respuesta de menos de 30 minutos (Price, 2001); tiempo que podría lograrse en un ensayo de LAMP con cebadores en bucle y detección mediante un análisis electroforético en gel de agarosa.

Las técnicas de mPCR/RLBH y/o LAMP/RLBH tienen el potencial de aplicarse como pruebas de diagnóstico , y para estudios epidemiológicos (McKechnie et al., 2009). A pesar de que en este ensayo de LAMP/RLBH solo se ocuparon dos sondas de oligonucleótidos y únicamente, y aproximadamente 30 productos amplificados por LAMP; estos números pueden aumentar al poder evaluar hasta a 43 diferentes microorganismos con sus reséctivas sondas de oligonucleótidos, así como 43 diferentes muestras amplificadas (Kong and Gilbert, 2006), mediante lo cual se logra de manera simultánea una identificación múltiple de diversas secuencias blanco, ya sea para detectar diversos tipos de microorganismos o diferentes genes de interés en un mismo microorganismo de interés (Kong et al., 2005; Zhao et al., 2006; Zeng et al., 2007; Wang et al., 2008; McKechnie et al., 2009; Ajbani et al., 2011).

En ensayo de LAMP/RLBH presentó el 100% de especificidad (Figura 13), y de igual manera no presentó hibridación cruzada entre sondas de oligonucleótidos y productos amplificados, y como ya se mencionó, el ensayo de LAMP/RLBH mostró una sensibilidad 10 veces mayor a la técnica de LAMP acoplada a visualización en gel de agarosa, y 100 veces mayor que la técnica de PCR; con un límite de detección de 3×10^{-4} .

El único resultado que se mostró con discrepancia fue en la tercera membrana, en la cual el carril 7 (Muestra de DNA 8 de *P. aeruginosa*), no presentó reactividad con ninguna de las tres sondas oligonucleótidos especie-específica Probe PA. Este resultado falso negativo puede ser resultado de un almacenamiento prolongado de las muestras de DNA (más de 12 meses almacenado a $>-20^{\circ}\text{C}$), así como su uso repetitivo (descongelación en múltiples ocasiones diferentes), o por diversos inhibidores de LAMP (Chong et al., 2003; Kong and Gilbert, 2006). El otro resultado discrepante se presentó de igual manera en la tercera membrana, en la cual en el carril 1 del control negativo del amplificado sin DNA, se presentó reactividad con una de las sondas Probe PA; posiblemente por contaminación al momento de hacer la amplificación por LAMP, o al momento de la hibridación en la membrana. Ambas discrepancias presentadas en la tercera membrana pueden corroborarse repitiendo el ensayo de LAMP-RLBH.

La técnica en conjunto de LAMP/RLBH tiene una duración de 1 hora con 55 minutos (45 minutos para completar el ensayo de LAMP, y 75 minutos para la incubación de los productos de LAMP con las sondas de oligonucleótidos acopladas a la membrana), por lo cual no puede considerarse point of care; aun así es una alternativa de diagnóstico viable; debido su menor duración en la obtención de resultados en comparación a las técnicas actuales de diagnóstico, adicionalmente este tiempo puede reducirse al estandarizar la técnica con tiempos de desarrollo e incubación reducidos (Saiman et al., 2003; Funke and Funke-Kissling, 2004; Quesada et al., 2010); a su mayor sensibilidad y especificidad que la técnica de PCR. A lo anterior se suma un bajo costo en los insumos y equipos requeridos; ya que mientras para la identificación y determinación de sensibilidad de un solo

microorganismo aislado mediante el equipo automatizado Vitek II, tiene un costo aproximado de \$700.00 M.N.,(Kerremans, 2009), el costo estimado de un ensayo de LAMP/RLBH se calcula de aproximadamente \$250.00 M.N., sin utilizar un termociclador.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VIII. CONCLUSIONES

El ensayo de LAMP-RLBH es una metodología alternativa para una rápida, sensible y específica prueba, que permitió la detección de una región específica del gen 16s rRNA de *Pseudomonas aeruginosa*.

El ensayo de LAMP-RLBH tiene el potencial de ser implementado en el diagnóstico clínico, como alternativa a las pruebas bioquímicas utilizadas actualmente; para la identificación y determinación de la sensibilidad a antibióticos de *P. aeruginosa* o de cualquier patógeno de interés clínico.

IX. ANEXOS

Amplificación por PCR

Para *Pseudomonas aeruginosa* se realizó una PCR convencional, preparando la mezcla de la reacción de amplificación de la siguiente manera:

Componente	Volumen	Concentración Final
GoTaq Green Master Mix	12.5 µl	1X
Cebador forward	0.5 µl	0.1-1.0 µM
Cebador reverse	0.5 µl	0.1-1.0 µM
DNA template	3 µl	30 ng/µL
Agua libre de nucleasas	8.5 µl	Hasta Vf de 25 µl

Con el siguiente programa de amplificación:

94°C 5 min

94°C 20 seg

58°C 30 seg

72°C 1 min

72°C 5 min

} 30 ciclos

Amplificación por LAMP

Para *Pseudomonas aeruginosa* se realizó una reacción de LAMP, preparando la mezcla de la reacción de amplificación de la siguiente manera:

Componente	Volumen	Concentración final
Cebadores internos (FIP/BIP)	0.5 µl	1.6 µM
Cebadores externos (F3/B3)	1 µl	0.2 µM
Mezcla dNTP's	3.5 µl	1.4 µM cada uno
Betaína	2 µl	
10X ThermoPol Buffer	2.5 µl	1X (Contiene 2 Mm MgSO ₄)
MgSO ₄ (100mM)	1.5 µl	6 mM (8mM en total)
<i>Bst</i> DNA polimerasa	1 µl	320 U/ml
Templado de DNA	1 µl	30 ng/µL
Agua libre de nucleasas	11 µl	N.A.

Con el siguiente programa de amplificación:

63°C 1 hr

80°C 3 min

Armado de la membrana

1. Cortar la membrana Byodine C (14x14cm)
2. Colocar en 10 ml de EDAC 16% (w/v) por 10 minutos. Preparar el EDAC en el momento. (1.6g en 10 ml).
3. 2 lavados con H₂O_{bd}
4. Colocar la membrana en el miniblotter
5. Sembrar sondas en concentración conocida (200 a 1600 pmol en 150 ul de NaHCO₃ 500 mM pH 8.4. Marcar los límites de los slots con tinta diluida.
6. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Aspirar cuidadosamente exceso de sondas
8. Sacar membrana del miniblotter e inactivarla con 100mL de NaOH durante máximo 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavar con 125 ml de SSPE 2X / 0.1% SDS, 5 minutos a 60°C, con agitación.
10. Antes de usar la membrana, hacer un lavado a 42°C con SSPE 2X 0.1% SDS, durante 5 minutos.

Hibridación con productos de LAMP

1. Agregar 40ul del producto de LAMP a 150 ul de SSPE 2X 0.1% SDS
2. Calentar a 100°C durante 10 minutos para desnaturalizar los productos de LAMP. Pasar a hielo inmediatamente. Dar un spin antes de usar.
3. Incubar la membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación con 125 ml de SSPE 2X 0.1% SDS.
4. Colocar la membrana en miniblotter, de manera que las ranuras queden perpendiculares a las sondas.
5. Eliminar el exceso de líquido mediante aspiración.
6. Sembrar los productos de PCR en las ranuras, evitando las burbujas de aire. Hibridar durante 1 hora en una superficie horizontal, a 42°C. Los slots vacíos serán llenados con SSPE 2X 0.1% SDS para evitar que se reseque la membrana.
7. Retirar las muestras mediante aspiración
8. Sacar la membrana del miniblotter
9. Lavar 2 veces con SSPE 2X 0.1% SDS durante 10 minutos una vez a 52°C y la segunda a 42°C, en movimiento.

Detección

Posterior a la hibridación con los productos de LAMP, se utilizó TMB ((3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) a temperatura ambiente. Se añadió 20 mL de la solución Sustratos TMB Pierce a la membrana de RLBH. Posteriormente se incubó la membrana a temperatura ambiente durante 15-30 minutos o hasta que se desarrolle el color deseado (Azul, como resultado de los radicales de oxígeno producidos por la hidrólisis del peróxido de hidrógeno por HRP), la reacción se detuvo agregando 10mL de H_2O_d a cada pocillo a la membrana.

X. LITERATURA CITADA

- Adair, C. G., S. P. Gorman, B. M. Feron, L. M. Byers, D. S. Jones, C. E. Goldsmith, J. E. Moore, J. R. Kerr, M. D. Curran, G. Hogg, C. H. Webb, G. J. McCarthy, and K. R. Milligan. 1999. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 25:1072–1076. doi:10.1007/s001340051014. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s001340051014>
- Aiello, D., J. D. Williams, H. Majgier-Baranowska, I. Patel, N. P. Peet, J. Huang, S. Lory, T. L. Bowlin, and D. T. Moir. 2010. Discovery and Characterization of Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1988–1999. doi:10.1128/AAC.01598-09. Available from: <https://aac.asm.org/content/54/5/1988>
- Ajbani, K., A. Shetty, A. Mehta, and C. Rodrigues. 2011. Rapid diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis by use of a reverse line blot hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* 49:2546–2551. doi:10.1128/JCM.02511-10.
- Arancibia, F., T. T. Bauer, S. Ewig, J. Mensa, J. Gonzalez, M. S. Niederman, and A. Torres. 2002. Community-Acquired Pneumonia Due to Gram-Negative Bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Intern. Med.* 162:1849. doi:10.1001/archinte.162.16.1849. Available from:
<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.162.16.1849>
- Arya, M., I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. R. H. Patel. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5:209–219. doi:10.1586/14737159.5.2.209. Available from:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.5.2.209>
- Aydin, S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.* 72:4–15. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Balasubramanian, D., K.-F. Kong, S. R. Jayawardena, S. M. Leal, R. T. Sautter, and K. Mathee. 2011. Co-regulation of -lactam resistance, alginate production and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 60:147–156. doi:10.1099/jmm.0.021600-0. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.021600-0>
- Breidenstein, E. B. M., C. de la Fuente-Núñez, and R. E. W. Hancock. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 19:419–426. doi:10.1016/j.tim.2011.04.005. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X11000862>

- Van den Brule, A. J. C., R. Pol, N. Fransen-Daalmeijer, L. M. Schouls, C. J. L. M. Meijer, and P. J. F. Snijders. 2002. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 40:779–787. doi:10.1128/JCM.40.3.779-787.2002.
- Butterworth, M. B., L. Zhang, E. M. Heidrich, M. M. Myerburg, and P. H. Thibodeau. 2012. Activation of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) by the Alkaline Protease from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 287:32556–32565. doi:10.1074/jbc.M112.369520. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.369520>
- Chakravorty, S., D. Helb, M. Burday, N. Connell, and D. Alland. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 69:330–339. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701207000565>
- Chong, S., D. Jang, X. Song, J. Mahony, A. Petrich, P. Barriga, and M. Chernesky. 2003. Specimen Processing and Concentration of *Chlamydia trachomatis* Added Can Influence False-Negative Rates in the LCx Assay but Not in the APTIMA Combo 2 Assay When Testing for Inhibitors. *J. Clin. Microbiol.* 41:778–782. doi:10.1128/JCM.41.2.778-782.2003. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.41.2.778-782.2003>
- Co, E. C. A Guide to LAMP primer designing.
- Deschaght, P., S. Van daele, F. De Baets, and M. Vaneechoutte. 2011. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *J. Cyst. Fibros.* 10:293–297. doi:10.1016/j.jcf.2011.05.004. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2011.05.004>
- Funke, G., and P. Funke-Kissling. 2004. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for Direct Identification and Susceptibility Testing of Gram-Negative Rods from Positive Blood Cultures in a Three-Phase Trial. *J. Clin. Microbiol.* 42:1466–1470. doi:10.1128/JCM.42.4.1466-1470.2004. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.4.1466-1470.2004>
- Gellatly, Shaan L., and R. E. W. Hancock. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* 67:159–173. doi:10.1111/2049-632X.12033.
- Gellatly, Shaan L., and R. E. W. Hancock. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* 67:159–173. doi:10.1111/2049-632X.12033. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/2049-632X.12033>
- Glick, R., C. Gilmour, J. Tremblay, S. Satanower, O. Avidan, E. Déziel, E. P. Greenberg, K. Poole,

- and E. Banin. 2010. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 192:2973–2980. doi:10.1128/JB.01601-09. Available from: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01601-09>
- Goto, M., E. Honda, A. Ogura, A. Nomoto, and K. I. Hanaki. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 46:167–172. doi:10.2144/000113072.
- Goto, M., K. Shimada, A. Sato, E. Takahashi, T. Fukasawa, T. Takahashi, S. Ohka, T. Taniguchi, E. Honda, A. Nomoto, A. Ogura, T. Kirikae, and K. I. Hanaki. 2010. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse feces by colorimetric loop-mediated isothermal amplification. *J. Microbiol. Methods*. 81:247–252. doi:10.1016/j.mimet.2010.03.008. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.008>
- Gubbels, J. M., A. P. De Vos, M. Van Der Weide, J. Viseras, L. M. Schouls, E. De Vries, and F. Jongejan. 1999. Simultaneous detection of bovine Theileria and Babesia species by reverse line blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 37:1782–1789. doi:10.1128/jcm.37.6.1782-1789.1999.
- Hemachandra, S., K. Kamboj, J. Copfer, G. Pier, L. L. Green, and J. R. Schreiber. 2001. Human monoclonal antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide derived from transgenic mice containing megabase human immunoglobulin loci are opsonic and protective against fatal *Pseudomonas* sepsis. *Infect. Immun.* 69:2223–2229. doi:10.1128/IAI.69.4.2223-2229.2001.
- Hogardt, M., and J. Heesemann. 2010. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:557–562. doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.008. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.008>
- Imperi, F., F. Ciccossanti, A. B. Perdomo, F. Tiburzi, C. Mancone, T. Alonzi, P. Ascenzi, M. Piacentini, P. Visca, and G. M. Fimia. 2009. Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics*. 9:1901–1915. doi:10.1002/pmic.200800618. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200800618>
- Islam, S., H. Oh, S. Jalal, F. Karpati, O. Ciofu, N. Høiby, and B. Wretlind. 2009. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:60–66. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02097.x. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14606005>
- Joyanes, P., M. D. C. Conejo, L. Martínez-Martínez, and E. J. Perea. 2001. Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 39:3247–3253.

doi:10.1128/JCM.39.9.3247-3253.2001.

- Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. Van Agterveld, D. Van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. Van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907–914. doi:10.1128/jcm.35.4.907-914.1997.
- Kaufhold, A., A. Podbielski, G. Baumgarten, M. Blokpoel, J. Top, and L. Schouls. 1994. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Lett.* 119:19–25. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06861.x. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06861.x>
- Kerremans, J. J. 2009. Rapid Bacterial Diagnostics and Their Effect on Patient Treatment and Outcome. Erasmus University Rotterdam. Available from: hdl.handle.net/1765/17461
- Kong, F., and G. L. Gilbert. 2006. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)—a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nat. Protoc.* 1:2668–2680. doi:10.1038/nprot.2006.404. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.404>
- Kong, F., L. Ma, and G. L. Gilbert. 2005. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization. *J. Med. Microbiol.* 54:1133–1138. doi:10.1099/jmm.0.46244-0.
- Lavent, R., D. Jocktane, F. Laurent, S. Nazaret, and B. Cournoyer. 2007. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J. Microbiol. Methods.* 70:20–29. doi:10.1016/j.mimet.2007.03.008.
- Li, H., Y.-F. Luo, B. J. Williams, T. S. Blackwell, and C.-M. Xie. 2012. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *Int. J. Med. Microbiol.* 302:63–68. doi:10.1016/j.ijmm.2011.10.001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>
- McKechnie, M. L., R. Hillman, D. Couldwell, F. Kong, E. Freedman, H. Wang, and G. L. Gilbert. 2009. Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay. *J. Clin. Microbiol.* 47:1871–1877. doi:10.1128/JCM.00120-09.
- Mendiratta, D. K., V. Deotale, and P. Narang. 2005. Metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital from a rural area. *Indian J. Med. Res.* 121:701–703.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262:56–65. doi:10.1038/scientificamerican0490-56.

- Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes.* 16:223–229. doi:10.1006/mcpr.2002.0415.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63. Available from:
https://watermark.silverchair.com/2800e63.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAmYwggJiBqkqhkiG9w0BBwagggJTMIICTwIBADCCAkgGCSqGSib3DQEHTAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMy3AQPdcwVpshAVuIAgEQgIICGSfU5ehJRqbly2A_4pd12_oNbrQem7FM_kTE9ZYQL40XC4I
- O'Sullivan, B. P., and S. D. Freedman. 2009. Cystic fibrosis. *Lancet.* 373:1891–1904. doi:10.1016/S0140-6736(09)60327-5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60327-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60327-5)
- Otter, J. A., S. Yezli, and G. L. French. 2011. The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 32:687–699. doi:10.1086/660363. Available from:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0195941700040558/type/journal_article
- Oura, C. A. L., R. P. Bishop, E. M. Wampande, G. W. Lubega, and A. Tait. 2004. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. *Int. J. Parasitol.* 34:603–613. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.012. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751904000098>
- Palleroni, N. J. 2010. The pseudomonas story. *Environ. Microbiol.* 12:1377–1383. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x.
- Parida, M. M., S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. V. L. Rao, and K. Morita. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 18:407–421. doi:10.1002/rmv.593. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.593>
- Price, C. P. 2001. Regular review: Point of care testing. A. Klein, A. Vuylsteke, and S. A. M. Nashef, editors. *BMJ.* 322:1285–1288. doi:10.1136/bmj.322.7297.1285. Available from:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781139062381A028/type/book_part
- Qin, X., J. Emerson, J. Stapp, L. Stapp, P. Abe, and J. L. Burns. 2003. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 41:4312–4317. doi:10.1128/JCM.41.9.4312-4317.2003.

Quesada, M. D., M. Giménez, S. Molinos, G. Fernández, M. D. Sánchez, R. Rivelo, A. Ramírez, G. Banqué, and V. Ausina. 2010. Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:137–140. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02907.x.

Saiki, R. K., C.-A. Chang, C. H. Levenson, T. C. Warren, C. D. Boehm, H. H. Kazazian, and H. A. Erlich. 1988. Diagnosis of Sickle Cell Anemia and β-Thalassemia with Enzymatically Amplified DNA and Nonradioactive Allele-Specific Oligonucleotide Probes. *N. Engl. J. Med.* 319:537–541. doi:10.1056/NEJM198809013190903. Available from:

<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198809013190903>

Saiman, L., J. L. Burns, D. Larone, Y. Chen, E. Garber, and S. Whittier. 2003. Evaluation of MicroScan Autoscanner for identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 41:492–494. doi:10.1128/JCM.41.1.492-494.2003.

Sana, T. G., A. Hachani, I. Bucior, C. Soscia, S. Garvis, E. Termine, J. Engel, A. Filloux, and S. Bleves. 2012. The Second Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 Is Regulated by Quorum Sensing and Fur and Modulates Internalization in Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 287:27095–27105. doi:10.1074/jbc.M112.376368. Available from:

<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.376368>

Shand, G. H., S. S. Pedersen, R. Tilling, M. R. W. Brown, and N. Hoiby. 1988. Use of immunoblot detection of serum antibodies in the diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* 27:169–177. doi:10.1099/00222615-27-3-169. Available from:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-27-3-169>

Smyth, A. R., P. M. Cifelli, C. A. Ortori, K. Righetti, S. Lewis, P. Erskine, E. D. Holland, M. Givskov, P. Williams, M. Cámara, D. A. Barrett, and A. Knox. 2010. Garlic as an inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in cystic fibrosis-a pilot randomized controlled trial. *Pediatr. Pulmonol.* 45:356–362. doi:10.1002/ppul.21193. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppul.21193>

Søgaard, M., H. Stender, and H. C. Schønheyder. 2005. Direct identification of major blood culture pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, by a panel of fluorescence in situ hybridization assays using peptide nucleic acid probes. *J. Clin. Microbiol.* 43:1947–1949. doi:10.1128/JCM.43.4.1947-1949.2005.

SPARAGANO, O., G. R. LORIA, M.-J. GUBBELS, A. P. VOS, S. CARACAPPA, and F. JONGEJAN. 2006. Integrated Molecular Diagnosis of *Theileria* and *Babesia* Species of Cattle in Italy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916:533–539. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05332.x. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05332.x>

- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43:159–271. doi:10.1099/00221287-43-2-159. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-43-2-159>
- Talon, D. 2012. Etymologia: *Pseudomonas*. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1241–1241. doi:10.3201/eid1808.ET1808. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/8/ET-1808_article.htm
- Tang, Y., Z. Ali, J. Zou, G. Jin, J. Zhu, J. Yang, and J. Dai. 2017. Detection methods for *Pseudomonas aeruginosa*: History and future perspective. *RSC Adv.* 7:51789–51800. doi:10.1039/c7ra09064a. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA09064A>
- Wang, Y., F. Kong, G. L. Gilbert, M. Brown, W. Gao, S. Yu, and Y. Yang. 2008. Use of a multiplex PCR-based reverse line blot (mPCR/RLB) hybridisation assay for the rapid identification of bacterial pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:155–160. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01890.x. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14633401>
- Washburn, B. K., A. E. Levin, K. Hennessy, and M. R. Miller. 2010. Identification of bacteria in scuba divers' rinse tanks. *Undersea Hyperb. Med.* 37:233–240.
- Williams, B. J., J. Dehnboestel, and T. S. Blackwell. 2010. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology*. 15:1037–1056. doi:10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x>
- Wolf, P., and U. Elsässer-Beile. 2009. *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. *Int. J. Med. Microbiol.* 299:161–176. doi:10.1016/j.ijmm.2008.08.003. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422108001343>
- World Health Organization. 2016. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance. WHO Libr. Cat. Data. 1–40. Available from: <https://www.who.int/tb/publications/lamp-diagnosis-molecular/en/>
- Wu, W., Y. Jin, F. Bai, and S. Jin. 2014. *Pseudomonas aeruginosa*. Elsevier Ltd. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>
- Xu, J., J. E. Moore, P. G. Murphy, B. C. Millar, and J. S. Elborn. 2004. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa* - Comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 3:1–5. doi:10.1186/1476-0711-3-21.

- Xu, Y., V. Theobald, C. Sung, K. DePalma, L. Atwater, K. Seiger, M. A. Perricone, and S. M. Richards. 2008. Validation of a HLA-A2 tetramer flow cytometric method, IFNgamma real time RT-PCR, and IFNgamma ELISPOT for detection of immunologic response to gp100 and MelanA/MART-1 in melanoma patients. *J. Transl. Med.* 6:61. doi:10.1186/1479-5876-6-61. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-6-61>
- Zeng, X., F. Kong, C. Halliday, S. Chen, A. Lau, G. Playford, and T. C. Sorrell. 2007. Reverse Line Blot Hybridization Assay for Identification of Medically Important Fungi from Culture and Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 45:2872–2880. doi:10.1128/JCM.00687-07. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00687-07>
- Zhao, Z., F. Kong, and G. L. Gilbert. 2006. Reverse line blot assay for direct identification of seven *Streptococcus agalactiae* major surface protein antigen genes. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:145–149. doi:10.1128/CVI.13.1.145-149.2006.
- Zodrow, K. R., J. D. Schiffman, and M. Elimelech. 2012. Biodegradable Polymer (PLGA) Coatings Featuring Cinnamaldehyde and Carvacrol Mitigate Biofilm Formation. *Langmuir*. 28:13993–13999. doi:10.1021/la303286v. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la303286v>