



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Identificación precoz de gérmenes fúngicos y bacterianos mediante el uso de Multiplex PCR en pacientes con Neutropenia Febril.

Memoria para optar al título de Bioquímico

Sebastián Alejandro Salinas Campusano

Profesor Patrocinante

Dr. Sergio Lobos Camus
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director de Memoria

Dr. Sergio Lobos Camus
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile
Noviembre, 2010

“Saber y saberlo demostrar es valer dos veces.”

Baltasar Gracián

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mis profesores Sergio y Daniela, los cuales me han apoyado durante toda la realización de esta memoria, sin su apoyo y consejos no hubiese sido posible llegar a buen término.

Matías Gutierrez, Ana Morán y Cristobal Lyon han sido parte fundamental de la motivación para lograr concretar los proyectos y objetivos planteados.

El apoyo con muestras por parte de la Doctora Christine Rojas, fue el paso final para terminar exitosamente.

Mi Padre, Madre, Hermano y especialmente mi Abuelo fueron aquellos que siempre estaban en mi mente día a día para concretar y avanzar.

Rosario(Rosarito) y Santi están minuto a minuto dentro de mi corazón alentándome a ser mejor e intentar alcanzar los sueños, los adoro.

Muchas gracias a todos.

FINANCIAMIENTO

Esta memoria fue realizada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Sergio Lobos Camus.

El financiamiento para realizar esta investigación provino de BioRigg.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ii
FINANCIAMIENTO.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Hipótesis.....	7
1.2 Objetivos.....	7
1.2.1 Objetivo General.....	7
1.2.2 Objetivos Específicos.....	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.1 Pacientes.....	8
2.2 Material Biológico.....	8
2.2.1 Cepas Bacterianas.....	8
2.2.2 Cepas Fúngicas.....	8
2.2.3 Reactivos.....	9
2.3 Métodos.....	10
2.3.1 Condiciones de Cultivo.....	10
2.3.2 Extracción de DNA.....	10
2.3.3 Amplificación mediante PCR.....	11
2.3.4 Diseño de partidores.....	12
2.3.5 Amplificación por PCR <i>in Silico</i>	13
2.3.6 Fortificación de sangre con bacterias.....	13

3. RESULTADOS.....	15
3.1 Cultivo de Microorganismos.....	15
3.1.1 Curvas de crecimiento.....	15
3.1.2 Curvas de dilución.....	16
3.2 Ensayos realizados en sangre enriquecida.....	17
3.2.1 Importancia de la centrifugación en la extracción de DNA.....	17
3.2.1.1 Buffy Coat.....	17
3.2.2 Análisis del desempeño del protocolo de extracción de DNA desarrollado previamente.....	18
3.2.2.1 Extracción basada en Tiocianato de Guanidina y Columnas Axygen.....	18
3.3 PCR <i>in silico</i> para establecer la sensibilidad del ensayo.....	19
3.4 Análisis de sensibilidad.....	19
3.4.1 Curvas de dilución en sangre y amplificación por PCR para determinar sensibilidad de ensayo.....	21
3.5 Análisis en muestras clínicas del hospital Dr. Gustavo Fricke en Viña del Mar.....	23
3.5.2 Amplificación por PCR.....	24
3.6 Ensayos de especificidad.....	26
3.6.1 PCR <i>in vitro</i> para establecer especificidad de ensayo.....	26
3.6.2. Templados de <i>Salmonella</i> sp. y <i>Shigella</i> sp.....	26
4. DISCUSION.....	28
5. CONCLUSIONES	33
6. PROYECCIONES.....	34
7. BIBLIOGRAFÍA.....	35
8. ANEXOS.....	37
Anexo 1 : Consentimiento Informado Pacientes.....	37
Anexo 2: Consentimiento Informado Controles Sanos.....	39

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Cepas utilizadas en el estudio.....	9
TABLA 2: Perfiles térmicos de los diferentes programas de PCR utilizados.....	11
TABLA 3: Partidores diseñados y utilizados en el presente estudio.....	13
TABLA 4: Diluciones seriadas de patógenos en sangre.....	14
TABLA 5: Recuento de colonias respecto de la centrifugación diferencial y recuperación.....	17
TABLA 6: Resultados positivos de PCR <i>in silico</i>	19
TABLA 7: Muestras Clínicas analizadas.....	24

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organización de los genes ribosomales en especies procarióticas y eucarióticas.....	5
Figura 2: Alineamiento múltiple de las secuencias del gen rRNA 16S.....	12
Figura 3: Curvas de crecimiento para <i>Candida albicans</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
Figura 4: Curvas de dilución para <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Candida albicans</i>	16
Figura 5: Prueba de protocolos de extracción de DNA.....	19
Figura 6: Amplificación de PCR <i>In silico</i>	21
Figura 7: Sensibilidad del ensayo en sangre fortificada con <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
Figura 8: Sensibilidad del ensayo en sangre fortificada con <i>Candida albicans</i>	23
Figura 9: Muestra Clínica 11.....	25
Figura 10: Muestra Clínica 9 y 10.....	25
Figura 11: Ensayo de Especificidad.....	27

ABREVIATURAS

BC:	“ <u>Buffy Coat</u> ” (Placa Lueco-plaquetaria)
BHI:	“ <u>Brain Heart Infusion</u> ” (Medio de Cultivo)
Blastn:	“ <u>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide</u> ” (Herramienta de básica de búsqueda de alineamiento local)
CHCA:	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
CoNS:	“ <u>Coagulase Negative Staphylococcus</u> ” (Staphylococcus coagulasa negativo)
DHB:	ácido dihidroxibenzoico
DNA:	“ <u>Deoxyribonucleic acid</u> ” (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP:	“ <u>Deoxyribonucleotide triphosphate</u> ” (Desoxirribonucleótido trifosfato)
DTT:	<u>D</u> itiot <u>r</u> eit <u>o</u> l
EDTA:	<u>Á</u> cido <u>E</u> tilend <u>a</u> minot <u>e</u> t <u>r</u> aacético
Fw:	“ <u>Forward</u> ” (Partidores en sentido 5` - 3`)
ICBM:	<u>I</u> nstituto de <u>C</u> iencias <u>B</u> iomédicas
IDT:	“ <u>Integrated DNA Technologies</u> ”
ITS:	“ <u>Internal Transcribed Spacer</u> ”
LB:	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani (Medio de Cultivo)
mecA:	Gen que codifica para las proteínas PBP2a y PBP2à
MRS:	“ <u>Methicillin Resistant Saphylococcus</u> ” (Saphylococcus resistente a meticilina)
NCBI:	“ <u>National Center for Biotechnology Information</u> ”
OD:	“ <u>Optical Density</u> ” (Densidad óptica)
Pb:	<u>P</u> ares de <u>B</u> ases
PBPs:	“ <u>Penicillin Binding Proteins</u> ” (Proteínas de unión a Penicilina)

PCR:	<i>“Polymerase Chain Reaction”</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PDA:	<i>“Potato Dextrose Agar”</i> (Agar Papa Dextrosa)
rRNA 16S:	Gen subunidad menor ribosomal procarionte
rRNA 18S:	Gen subunidad menor ribosomal eucarionte
Rv:	<i>“Reverse”</i> (Partidores antisentido 3` - 5`)
S:	Sobrenadante
SA:	Ácido Sinapínico
Taq:	DNA Polimerasa del organismo <i>thermus aquaticus</i>
TBE:	<i>“Tris/Borate/EDTA”</i> (Tampón Tris/Ácido Bórico/ EDTA)
Tris:	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UV:	Ultra Violeta

RESUMEN

La incidencia de infecciones nosocomiales en pacientes oncológicos inmunodeprimidos es entre 2 y 10 veces superior al de otros grupos de pacientes. Entre las infecciones nosocomiales, las bacterias y hongos oportunistas son de particular interés debido a su influencia en la morbilidad, mortalidad y costos terapéuticos asociados a este grupo de pacientes. El tiempo que demora el laboratorio en determinar el agente que causa el cuadro infeccioso es crítico dado que permite un tratamiento específico, y por ende una mayor tasa de éxito.

Usando técnicas microbiológicas tradicionales, se detecta el agente infeccioso sólo en el 20-40% de los casos con procedimientos que requieren de al menos 3 días. Esta memoria propone utilizar la técnica de biología molecular Múltiplex PCR para obtener un diagnóstico concluyente en 5 horas.

Nuestro sistema de diagnóstico permite la detección *in vitro* simultánea y rápida de los patógenos oportunistas que frecuentemente causan estados de neutropenia febril en pacientes oncológicos, por lo que esta memoria evaluará la capacidad del sistema montado para detectar estos patógenos en muestras clínicas.

De resultar exitoso este estudio, impactaremos beneficiosamente la rapidez con la que se podrá tomar una decisión terapéutica informada y mejoraremos la expectativa de vida de pacientes inmunodeprimidos.

SUMMARY

“Early identification of fungal and bacterial germs by multiplex PCR in patients with febrile neutropenia.”

The incidence of nosocomial infections in immunocompromised cancer patients is between 2 and 10 times higher than other groups of patients. Among the nosocomial infections, opportunistic bacteria and fungi are of particular interest because of their impact on morbidity, mortality and treatment costs associated with this group of patients. The time taken for the laboratory to determine the agent causing the infection is critical because it allows a specific treatment and therefore a higher rate of success.

Using traditional microbiological techniques, the infectious agent is detected only in 20-40% of patients with procedures that require at least three days. This thesis proposes to use the technique of molecular biology technique of Multiplex PCR to obtain a conclusive diagnosis in 5 hours.

Our diagnostic system allows simultaneous detection and rapid *in vitro* detection of opportunistic pathogens that frequently cause states of febrile neutropenia in cancer patients. In this work will evaluate the ability of our Multiplex PCR system to detect these pathogens in clinical samples.

If this results successful, we will produce a positive impact on the speed with which physicians may take informed treatment decisions and improve the life expectancy of immunosuppressed patients.

1. INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano presenta un conjunto de microorganismos que viven de forma habitual en el cuerpo sano, llamada flora normal. Los lugares donde se encuentran son muy variados, tales como la piel, cavidad bucal, gastro-intestinal y vaginal entre otros. En ellos desarrollan tareas beneficiosas para el ecosistema general del cuerpo. No obstante, la interacción de los microorganismos con el hombre no es siempre inocua sino que también puede desarrollar una relación patogénica. Esto se puede deber a la actividad de microorganismos intrínsecamente patógenos u oportunistas. Estos últimos son capaces de colonizar el organismo sólo cuando fallan las defensas y cambian sus condiciones ecológicas. En general las condiciones alteradas del huésped son el factor determinante de las enfermedades infecciosas producidas por patógenos oportunistas. Más aún en muchos casos el mal manejo de material clínico y/o la deficiente higiene del personal intrahospitalario, hace que la barrera de los pacientes inmunodeprimidos sea aún más vulnerable. Como consecuencia de esto existe un variado número de patógenos nosocomiales, es decir, patógenos que se adquieren típicamente en el hospital, los cuales son la base para nuestro estudio.

La incidencia de infecciones nosocomiales en pacientes críticos es entre 2 y 10 veces superior al de otros grupos de pacientes. Entre las infecciones nosocomiales, las bacterias y hongos oportunistas que aparecen en estos casos tienen particular interés debido a su influencia en la morbilidad, mortalidad y los costos que ello conlleva. El diagnóstico rápido y confiable en etapas tempranas de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias y hongos permite tener un mayor éxito en el tratamiento y evitar la posible aparición de resistencias, tanto a las drogas antibióticas y antifúngicas[1]. En pacientes con tratamientos antineoplásicos destacan las infecciones producidas por los patógenos bacterianos *Klebsiella* sp, *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp. ; *Pseudomonas* sp, *Escherichia coli*, y por los patógenos fúngicos *Candida* sp y *Aspergillus* sp[2].

La neutropenia está definida como un recuento absoluto de neutrófilos $< 1000/\text{ml}$, siendo $<500/\text{mL}$ de alto riesgo para el desarrollo de infecciones. La neutropenia febril (FN), que se presenta en un 30-60% de los pacientes muchas veces con eventos recurrentes y se define como la aparición de fiebre y/o infección en pacientes neutropénicos[3]. La mayor probabilidad de infección se presenta en aquellos pacientes con neutropenia severa o profunda, definida como el conteo absoluto

de neutrófilos $<100/\text{ml}$ [4]. En la década recién pasada, la gran mayoría de los niños con cáncer que presentaban cuadros de neutropenia febril fueron hospitalizados y manejados con antibióticos de amplio espectro sin importar su condición clínica[5]. En la actualidad, la tasa de sobrevida o curación definitiva de niños leucémicos ha aumentado hasta cerca del 65 a 70%. Sin embargo, actualmente las infecciones oportunistas de origen bacteriano y fúngico son la principal causa de muerte en este grupo de pacientes[6].

El diagnóstico en etapas tempranas de las enfermedades producidas por hongos y bacterias es especialmente crítico en estos casos, ya que permite un mayor éxito en el tratamiento y evita la aparición de resistencias, lo cual también determina una baja en los costos de salud. Usando técnicas microbiológicas tradicionales, se detecta el agente infeccioso sólo en el 19-40% de los casos de bacteremias con procedimientos en el laboratorio que requieren de al menos 3 días[7]. Las técnicas de biología molecular permiten obtener un diagnóstico en menos tiempo, por lo cual han tenido gran impacto en el manejo de estas enfermedades, en la sobrevida, calidad de vida de los pacientes y en los costos asociados. Por el conjunto de estos factores, la implementación de técnicas de diagnóstico basadas en biología molecular se vuelven necesarias en países en vías de desarrollo[8]. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (“*Polymerase Chain Reaction*”, PCR) que permite amplificar y detectar una secuencia única de DNA utilizando partidores específicos, ha tenido un impacto significativo en la detección y el manejo de agentes infecciosos, debido a su alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad. El PCR es el método más sensible y rápido para la detección de patógenos en muestras clínicas, sobre todo en aquellos patógenos que son difíciles de cultivar en medios tradicionales. La técnica de PCR permite mejorar el resultado gracias a que se manejan múltiples variables, algunas de ellas analizadas en esta tesis. Por ejemplo, la sensibilidad y especificidad dependen de los genes blanco, las secuencias de los partidores, como también de los procedimientos de extracción de DNA, técnicas específicas de PCR y los métodos de detección de los productos de amplificación[9], todos ellos estudiados en este trabajo.

Entre los patógenos bacterianos se encuentran los del género *Staphylococcus*, el que incluye 38 especies, los que pueden producir una gran variedad de enfermedades, desde infecciones menores a la piel hasta endocarditis y sepsis[10]. *Staphylococcus aureus* es un patógeno facultativo Gram positivo y es la especie más virulenta y el patógeno más importante dentro del género. Este último es el principal agente causal de bacteremias en pacientes con catéteres venosos centrales o periféri-

cos, prótesis valvulares, válvulas artificiales en el corazón, marca-pasos y prótesis ortopédicas y otras infecciones donde existe la formación de biopelículas sobre biomateriales implantados[11]. Estos y otros *Staphylococcus* son parte de la flora normal de la piel y de las membranas mucosas. Además son contaminantes comunes de cultivos, especialmente de derivados de sangre, por lo cual se han convertido en uno de los causantes principales de las infecciones intrahospitalarias en pacientes inmunodeprimidos.

Uno de los principales patógenos causantes de las neumonías nosocomiales es la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, la cual puede ser muy difícil de tratar, debido a que presenta, como muchos patógenos bacterianos, resistencia a los antibióticos de amplio espectro como lo son las cefalosporinas y los aminoglicósidos. Los microorganismos aislados de los pacientes presentan diferentes susceptibilidades a los antibióticos y el éxito del tratamiento depende de la pronta administración del antibiótico adecuado[12].

Otro de los mayores causantes de bacteremias, tanto en niños como en adultos, es el patógeno *Streptococcus pneumoniae*, cuyo diagnóstico definitivo, usando los métodos convencionales de microbiología, es muy difícil de establecer. El aislamiento de *S. pneumoniae* desde sangre o fluidos pleurales, sólo se logra en 15-40% de los casos[13]. Su crecimiento depende un aislamiento exitoso, crecimiento e identificación a partir de hemocultivos, lo que puede llevar desde 24 a 72 horas. Además requieren de una atmósfera de CO₂ al 5-7% y se produce su autólisis a las 48 horas del cultivo por lo cual su cultivo en el laboratorio es relativamente complejo[14].

Las bacteremias son la causa principal de infecciones en pacientes inmunodeprimidos, pero las infecciones fúngicas invasivas son cada vez más reconocidas como una causa importante de morbilidad y mortalidad, sobre todo en los pacientes inmunodeprimidos. La incidencia de candidiasis nosocomial se ha visto incrementada 10 veces estos últimos años, siendo la especie *Candida albicans* la causa más frecuente de esta enfermedad, aunque es posible encontrar otras especies tales como *C. glabrata* y *C. tropicalis*[15]. La prevalencia de candidiasis y el aumento de *Candida* resistente a drogas antifúngicas hace imperioso mejorar los sistemas de detección y seguimiento de estas infecciones en los pacientes inmunocomprometidos, los cuales constituyen uno de los factores más importantes en el tratamiento de la enfermedad, ya que en muchos casos el diagnóstico se confunde con el bacteriano.

No ha sido menos llamativo el incremento de aspergilosis, causada principalmente por *Aspergillus fumigatus*, seguida por *A. flavus* y *A. terreus*[15]. Estas infecciones presentan una alta mortalidad y si el paciente logra sobrevivir, causan una gran morbilidad, que limita aún más el éxito de la quimioterapia en los pacientes con cáncer. Los malos pronósticos de la enfermedad causados por el diagnóstico y terapia tardía, en conjunto con la toxicidad y poca fidelidad de los antifúngicos como lo es la Anfotericina B, hacen que la pronta confirmación de la infección sea la mejor terapia antifúngica. Debido a que las técnicas microbiológicas han demostrado ser poco específicas y/o sensibles, se han buscado nuevos instrumentos de diagnóstico basadas en los métodos moleculares[16].

Por las razones expuestas se hace necesario el montaje de una técnica de diagnóstico rápido basada en el uso de PCR para patógenos oportunistas bacterianos y fúngicos. Un trabajo previo desarrollado en este laboratorio, permitió detectar simultáneamente *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Candida*, sp y *Aspergillus* sp, en sangre utilizando PCR Multiplex[17]. Esta técnica consiste en usar la PCR, pero en vez de amplificar una sola región de un DNA templado, se incluyen varias parejas de partidores en la misma reacción, lo que permite amplificar y por tanto detectar diversas secuencias de origen bacterianos y/o fúngicos de una sola vez, lo cual resulta sumamente conveniente desde un punto de vista económico y de salud como primera aproximación a un paciente con NF.

La búsqueda de nuevas herramientas de diagnóstico genético molecular, se centran en el análisis de secuencias específicas. Los genes de las subunidades ribosomales y los espaciadores que existen entre estos genes son muy conservados entre las especies, tanto en procariontes como en eucariontes. Aún así, estas regiones también incluyen zonas con cierta variabilidad genética que los hacen secuencias blanco para estudios filogenéticos. La secuencia que codifica para la subunidad ribosomal menor de las especies procariontes corresponde al gen rRNA 16S. Esta secuencia se utiliza ampliamente para estudios filogenéticos y taxonómicos en bacterias, debido a que es el marcador genético más común gracias a que en la mayoría de las bacterias se encuentra como una familia multigénica u operones, los cuales se encuentran reiterados hasta quince veces en el genoma (Figura 1.A). Otro de los potenciales más atractivos del uso de la secuencia de rRNA 16S es que provee información sobre el género y la especie de aislados bacterianos que son difíciles de identificar mediante perfiles bioquímicos[18].

Los genes ribosomales eucariontes presentan estructuras similares al de las especies procarióticas y los cuales también son utilizados para estudios filogenéticos. Las regiones intergénicas que existen entre los genes ribosomales en eucariontes se denominan “Internal Transcribed Spacer” (ITS). Existen dos zonas espaciadoras, la primera se encuentra entre la subunidad menor 18S y 5.8S y se denomina ITS1, y el segundo espaciador se ubica entre el gen 5.8S y la subunidad mayor 25-28S (Figura 1.B). Al igual que el gen rRNA 16S, los ITS son ampliamente utilizados para estudios filogenéticos. Además, éstos se encuentran repetidos una o más veces en bloques en diferentes loci cromosomales, por complemento haploide. Debido a que se encuentran repetidos cientos y miles de veces en el genoma, son más fáciles de aislar que aquellos que se encuentran en bajas copias, por lo que se necesita poca muestra de estos genes para lograr una amplificación exitosa[19].

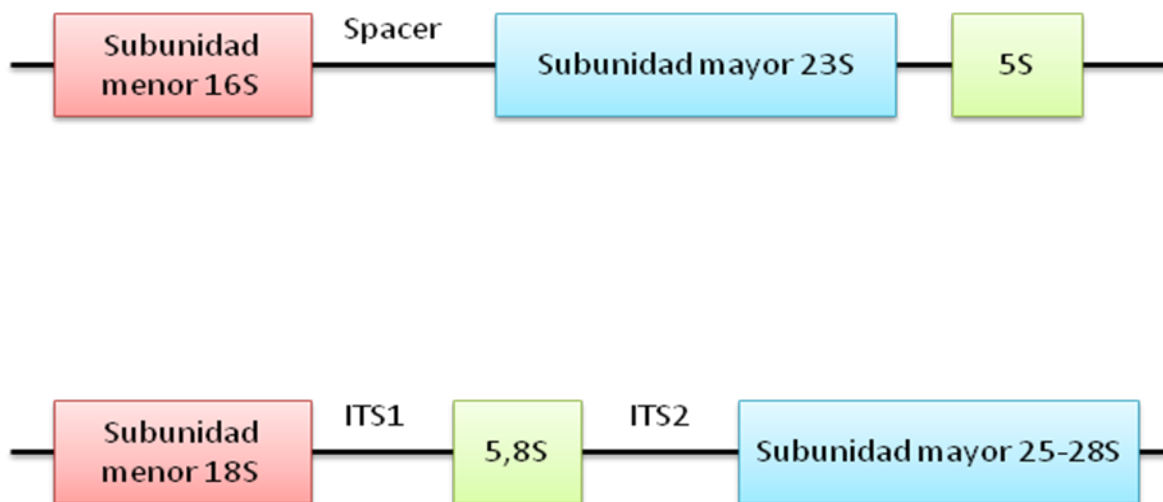


Figura 1: Organización de los genes ribosomales en especies procarióticas y eucarióticas.

- A. Familia multigénica procarionte de genes ribosomales. (Figura adaptada de [4])
- B. Familia multigénica eucariontes de genes ribosomales (Figura adaptada de [4])

Como se mencionó anteriormente, los métodos actuales de diagnóstico se basan en la detección de los patógenos mediante las técnicas microbiológicas convencionales, que pueden tardar cerca de 24 a 72 horas para dar un diagnóstico poco certero, ya que se necesita que estos microorga-

nismos crezcan y luego se realicen las diferentes pruebas bioquímicas. Esta tardanza puede generar resistencias a antibióticos, debido a que durante el período de espera del diagnóstico se trata a los pacientes con antibióticos de amplio espectro y errores de diagnóstico, poniendo en riesgo la vida del paciente. En corto plazo estas circunstancias hacen que los microorganismos nosocomiales sean aún más difíciles de tratar y en el largo plazo incrementan el problema del aumento de cepas resistentes a un número cada vez mayor de antibióticos. Por esta razón los métodos moleculares de detección de DNA bacteriano o fúngico han tomado gran fuerza este último tiempo, dado que éstos son mucho más rápidos y poseen gran sensibilidad y especificidad. Así se han desarrollado diferentes métodos para la detección de diferentes patógenos mediante técnicas de biología molecular, especialmente mediante PCR [11, 12, 20].

En una primera etapa en nuestro laboratorio se logró montar un sistema específico y selectivo de PCR multiplex para patógenos bacterianos y fúngicos oportunistas. La etapa desarrollada en este trabajo consistió en validar y optimizar el método en cuanto a su reproducibilidad, sensibilidad y aplicabilidad sobre muestras clínicas reales [5], sin embargo en ese trabajo no se alcanzó una sensibilidad comparable a la de los métodos microbiológicos tradicionales.

En esta tesis se continuó el trabajo iniciado con el fin de validar la técnica de diagnóstico montada, definir la sensibilidad alcanzada y lograr aplicar la técnica en fluidos biológicos de muestras clínicas reales provenientes de pacientes oncológicos adultos del Hospital Dr. Gustavo Fricke en Viña del Mar.

La aplicación de este sistema de diagnóstico en nuestro país tendría un fuerte impacto en el diagnóstico precoz y tratamiento adecuado de pacientes neutropénicos inmunodeprimidos debido a que es una técnica rápida, sensible, robusta, reproducible, de fácil implementación y de bajo costo comparada con las disponibles comercialmente. Es por ello que son una oportunidad para países en vías de desarrollo como Chile.

1.1. Hipótesis

“El sistema de diagnóstico de patógenos nosocomiales oportunistas bacterianos y fúngicos mediante PCR múltiplex es una herramienta que presenta una sensibilidad y reproducibilidad equivalentes a las técnicas microbiológicas tradicionales y es capaz de determinar el/los agentes infecciosos en muestras clínicas reales en un tiempo significativamente menor.”

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad diagnóstica del sistema de PCR múltiplex desarrollado “in vitro” en la identificación precoz de los gérmenes fúngicos y bacterianos presentes en la sangre de pacientes oncológicos neutropénicos febriles.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Montar una técnica de cultivo microbiológico de las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* y de las especies fúngicas *Candida albicans*,

1.2.2.2 Validar la técnica de PCR montada para la detección precoz de microorganismos oportunistas.

1.2.2.3 Implementar el mejor protocolo de extracción de DNA en cuanto a sensibilidad.

1.2.2.4 Determinar la especificidad de los partidores diseñados respecto de otras cepas bacterianas y fúngicas típicas intrahospitalarias.

1.2.2.5 Mejorar y determinar la sensibilidad de la técnica en sangre fortalecida con patógenos.

1.2.2.6 Determinar si el sistema basado en el uso de Multiplex PCR, es capaz de identificar el agente infeccioso causante de neutropenia febril en muestras de sangre periférica provenientes de pacientes admitidos al Servicio de Hematología a la UCI del Hospital Dr. Gustavo Fricke en muestras de sangre.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Pacientes

Este estudio fue diseñado inicialmente para pacientes oncológicos inmunodeprimidos del Hospital Dr. Gustavo Fricke que presentaban neutropenia febril, es decir, bajo número de neutrófilos en la sangre que se presenta con un cuadro febril. Para poder incorporar estos pacientes a formar parte de este estudio, ellos firmaron un consentimiento informado amplio que es el que recomienda el comité de ética del Minsal (Anexo 1). Las muestras de sangre de estos pacientes que fueron utilizadas en los ensayos fueron transportadas en cadena de frío a 4°C a Santiago y analizadas el mismo día de la extracción en la mayoría de los casos.

Los voluntarios sanos utilizados como controles fueron ingresados al estudio previa forma de un consentimiento informado para controles sanos (Anexo 2).

2.2. Materiales Biológicos y Reactivos

2.2.1 Cepas bacterianas

Las cepas *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y *Klebsiella pneumoniae* utilizadas para la extracción de DNA son cepas ATCC del Programa de Microbiología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, donada gentilmente por la Dra. María Teresa Ulloa.

Todas las cepas, incluidas las fúngicas, fueron almacenadas en 20% de glicerol a -20°C para su uso posterior.

2.2.2 Cepas fúngicas

Las cepas de levaduras (*Candida*) fueron donadas gentilmente por la Dra. María Teresa Ulloa del Programa de Microbiología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Tabla 1).

Tabla 1: Cepas utilizadas en el estudio.

Levadura	ATCC
<i>Candida albicans</i>	790028
<i>Candida krusei</i>	6258
<i>Candida parapsilosis</i>	22019
Bacteria	Código
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3

2.2.3 Reactivos

Las empresas donde fueron adquiridos los reactivos utilizados en este estudio fueron:

- De Ambion (Austin, TX, EEUU) se adquirió agarosa LE.
- De BD Bacto (Franklin Lakes, NJ, EEUU) se adquirió el medio de cultivo líquido Brain Heart Infusion (BHI).
- De Fermentas (Burlington, Canadá) se adquirió patrón de peso molecular de 100 pb.
- De Difco (Sparks, MD, EEUU) se obtuvieron los medios de cultivos sólidos agar Luria Bertani (LB)
- De Integrated DNA Technologies (San Diego, Ca, EEUU) se obtuvieron los oligonucleótidos que se enviaron a sintetizar.
- De Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo ditioneitol (DTT).
- De Merck (Darmstadt, Alemania) se adquirió ácido bórico, etanol absoluto, glicerol, HCl, Tritón X-100 e isopropanol.
- De Promega (Madison, WI, EEUU) se utilizó la enzima DNA polimerasa GoTaq DNA Polymerase, Green GoTaq Flexi Buffer, MgCl₂ y dNTPs.

- De Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EEUU) se adquirió tiocianato de guanidina.
- De TCL (Santiago, RM, Chile) se adquirió NaCl.
- De US Biological (Swampscott, MA, EEUU) se adquirió EDTA y Tris Base.

2.3 Métodos

2.3.1 Condiciones de cultivo

El cultivo de *S. aureus*, *K. pneumoniae* se realizó durante 18 -24 hrs a 37°C en medio líquido “*Brain Heart Infusion*” (BHI) agitando a 200 rpm. Además se realizaron cultivos sólidos en placas con agar Luria Bertani (LB) con el fin de identificar colonias.

En el caso de *S. pneumoniae* se obtuvo el cultivo listo para la extracción de DNA y sólo se extrajo un asa del patógeno directamente desde la placa y se inoculó el caldo BHI.

El cultivo de *Candida* se realizó a 37°C en placas de agar “*Brain Heart Infusion*” BHI durante 24-48 horas. También se creció en medio líquido durante 24hrs a 37°C en “*Brain Heart Infusion*” (BHI) agitando a 200 rpm.

2.3.2 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se optimizó el protocolo de extracción propuesto por Qiagen® en su sistema comercial Qiamp DNA blood mini Kit® spin protocol, basado en columnas y centrifugación. Se utilizaron muestras de sangre periférica recogidas en tubos tapa lila de 4 mL usando 200 µl de sangre enriquecida como templado de extracción. Se eluyó en 50 µl previa incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se eliminó la columna y se guardó el DNA extraído a 4°C en tampón TE, provisto en el sistema comercial.

2.3.3 Amplificación mediante PCR

Todas las reacciones de PCR provenientes de muestras clínicas se realizaron en un volumen total de 20 µl. La concentración final de sus reactivos fue: 1X de tampón 5X Green GoTaq Flexi Buffer, 3 mM de solución de MgCl₂ 25 mM, 0,2 mM de dNTP de una mezcla a 25 mM de cada desoxinucleótido, 0,1 µM de cada partidor, 1 unidad de DNA polimerasa GoTaq DNA Polymerase 5U/µl y se llevó a un volumen final 20 µl con agua grado Biología Molecular estéril. Se tomaron 12µl de DNA templado para la reacción en el caso de los Multiplex-PCR Bacterias/ Hongos y 5µL en el caso de Beta Globina para el control positivo de amplificación.

En el caso de tener un resultado positivo se realizó una nueva PCR utilizando como templado el producto de PCR positivo diluido 100 veces en tampón TE 1X. En este caso el volumen final de reacción fue de 50 µl manteniendo las concentraciones finales para cada reactivo. El nuevo producto de PCR se almacenó a 4°C.

Los perfiles térmicos utilizados en el termociclador (Labnet Multigene Gradient) fueron (Tabla 2):

Programa	Desnaturación inicial	Etapa de ciclo			N° de ciclos	Extensión final
		Desnaturación	Apareamiento	Extensión		
Multiplex-PCR Bacterias	1 min. a 94°C	45 seg. a 94°C	45 seg. a 61°C	45 seg. a 72°C	40	1 min. a 72°C
Multiplex-PCR Hongos	2 min. a 94°C	45 seg. a 94°C	45 seg. a 55°C	45 seg. a 72°C	40	2 min. a 72°C
Multiplex-PCR Beta Globina	1 min. a 94°C	45 seg. a 94°C	45 seg. a 61°C	45 seg. a 72°C	40	1 min. a 72°C

Tabla 2: Perfiles térmicos de los diferentes programas de PCR utilizados.

Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TBE 1X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8) a 65 volts durante 120 minutos y se visualizaron luego de la tinción con Bromuro de Etidio usando un transiluminador de UV (Ultra Lum) y documentados usando GelDoc™ (NEON®).

2.3.4 Diseño de partidores

El diseño de partidores se realizó mediante un alineamiento múltiple (DNASTAR-Lasergene v6 y MacVector) del gen rRNA 16S, obtenido en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de cada patógeno y se eligió la sección que presentaba menos homología entre las diferentes especies (Figura 2). Se diseñaron partidores entre 21 y 24 pb, con una temperatura de alineación entre 55°C y 60°C y que la región 3' OH del partidador fuese la parte más específica. En los casos de, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* los partidores fueron obtenidos de la literatura (Tabla 3). Los partidores se enviaron a sintetizar a la empresa IDT, (Integrated DNA Technologies (San Diego, CA, EEUU)).

La pareja de partidores que amplifican la región de Beta Globina Humana usada como control positivo fue gentilmente donada por Monserrat Balanda (ISP, Santiago, Chile).

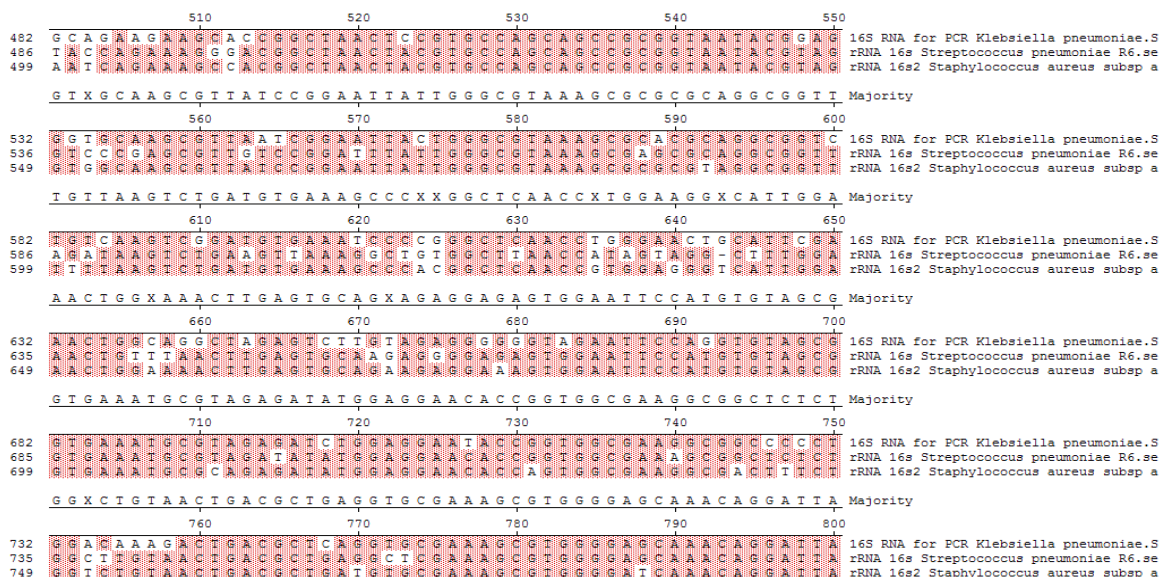


Figura 2: Alineamiento múltiple de las secuencias del gen rRNA 16S.

La figura muestra el alineamiento del gen rRNA 16S de las especies *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*. En rojo se observa el alto porcentaje de identidad al comparar las secuencias de las tres especies bacterianas.

Tabla 3: Partidores diseñados y utilizados en el presente trabajo.

Nombre Partidor	Patógeno	Gen	Ampli-ción
KpFw1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	rRNA 16S	775 pb
KpRv1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	rRNA 16S	
SpFw1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	rRNA 16S	457 pb
SpRv3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	rRNA 16S	
SaFw5	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	rRNA 16S	219 pb
SaRv6	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	rRNA 16s	
CandFw1	<i>Candida albicans</i>	ITS2 [12]	228 pb
CandRv1	<i>Candida albicans</i>	ITS2	
AspFw1	<i>A. fumigatus</i> y <i>A. flavus</i>	rRNA 18S [13]	405 pb
AspRv1	<i>A. fumigatus</i> y <i>A. flavus</i>	rRNA 18S	
BetaFw1	Humano	Beta Globina	260
BetaRv1	Humano	Beta Globina	260

2.3.5 PCR *in Silico*

Se realizó una serie de ensayos de PCR *in silico* con el fin de confirmar la amplificación selectiva y específica de patógenos con los partidores diseñados usando el sitio web <http://insilico.ehu.es/PCR/> para los patógenos de interés y aquellos patógenos más cercanos que es posible encontrar en sangre de pacientes inmunodeprimidos.

2.3.6 Fortificación de sangre con bacterias

Se utilizó sangre periférica obtenida de adultos sanos que colaboraron de forma voluntaria en tubos tapa lila de 4 ml previa firma de una carta de consentimiento informado. La sangre fue fortificada con las diluciones seriadas de un cultivo de OD 0,8 para una posterior extracción de DNA, amplificación por PCR y resolución en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, para así determinar el límite de detección del protocolo diseñado y establecer la sensibilidad del método.

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CFU/mL	$3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^1$	5

Tabla 4: Diluciones seriadas de patógenos en sangre:

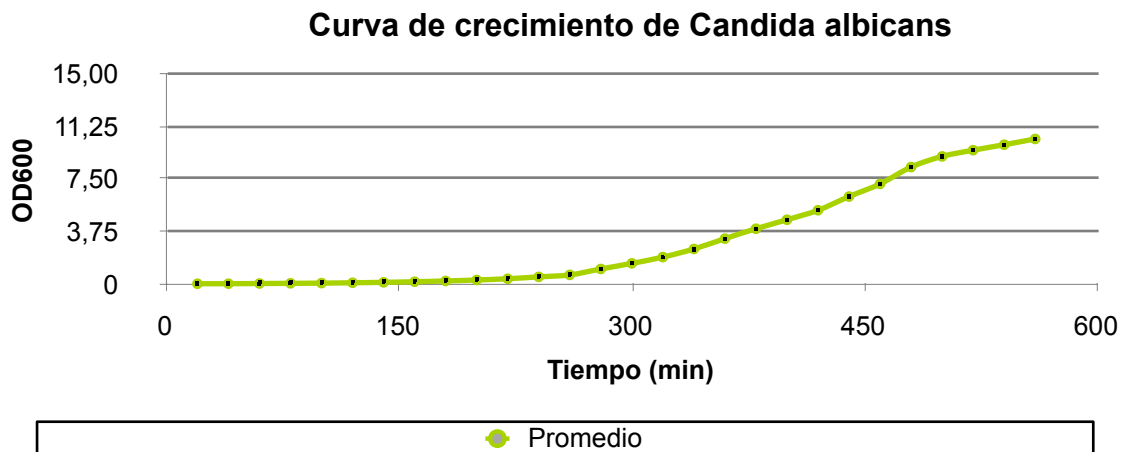
Se muestra la cantidad de CFU/mL por cada tubo de las diluciones para la extracción de DNA. En paralelo se sembraron en placa 100 µl de cada dilución en BHI para corroborar la exactitud de las diluciones.

3. RESULTADOS

3.1 Cultivo de Microorganismos.

3.1.1 Curvas de crecimiento:

En una primera etapa se establecen las curvas de crecimiento en duplicado para los patógenos *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae* los cuales fueron tomados como referentes de patógenos fúngicos y bacterianos respectivamente (Figura 3).



A

B

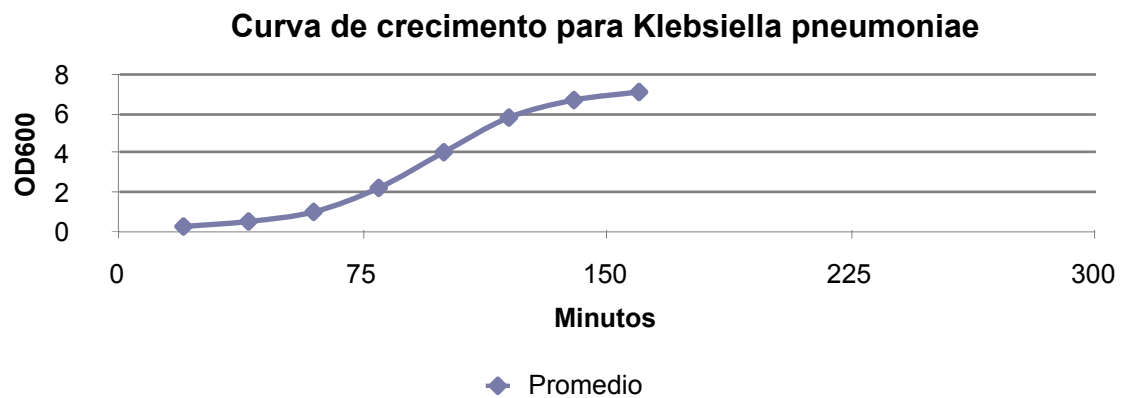
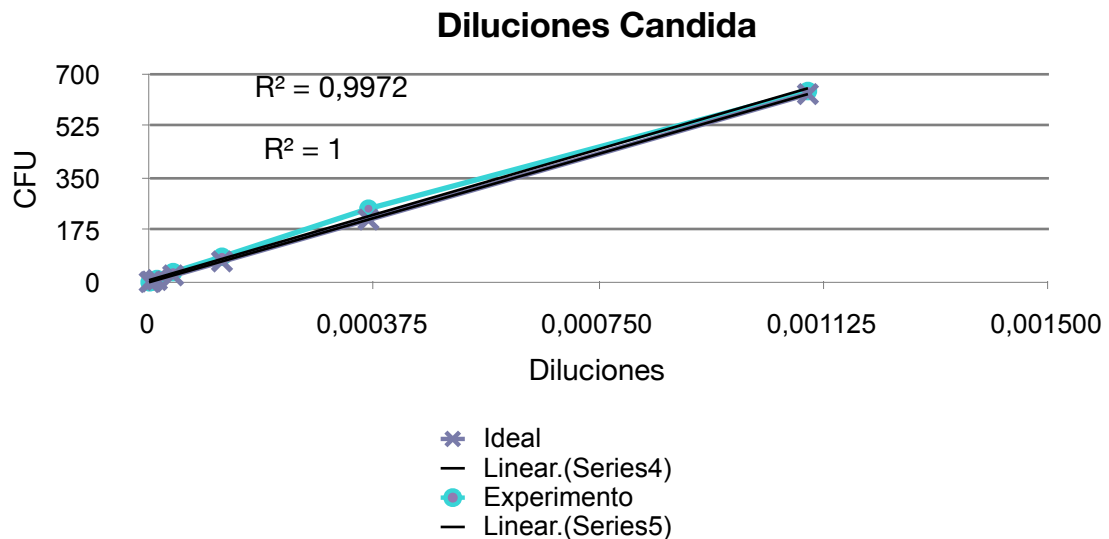


Figura 3: Curvas de crecimiento para *Candida albicans* y *Klebsiella psneumoniae*

A: Crecimiento en caldo BHI a 37°C a 200rpm para *Candida albicans*, B:Crecimiento en caldo BHI a 37°C a 200rpm para *Klebsiella pneumoniae* .

3.1.2 Curvas de dilución:

Posteriormente se establecen las curvas de dilución en triplicado para los patógenos *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae* , las cuales serán utilizadas posteriormente en el enriquecimiento de sangre (Figura 4).



A
B

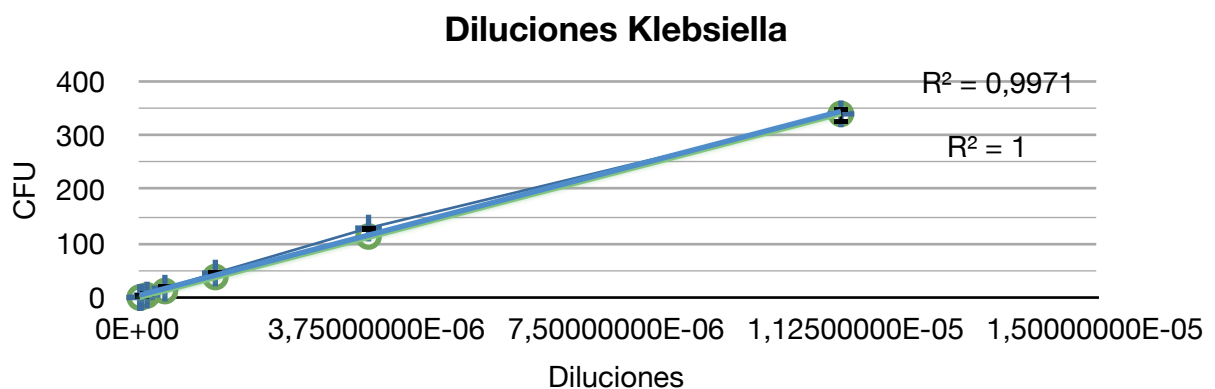


Figura 4: Curvas de dilución para *Klebsiella pneumoniae*, y *Candida albicans*.

A: Diluciones seriadas en caldo BHI para *Candida albicans*, B: Diluciones seriadas en caldo BHI para *Klebsiella pneumoniae*. Se muestran los promedios de las mediciones comparadas con el valor ideal esperado.

3.2 Ensayos realizados en sangre enriquecida

3.2.1 Análisis de la importancia de la centrifugación en el proceso de extracción de DNA

3.2.1.1 Buffy Coat

Con el fin de mejorar la sensibilidad de ensayo, en una primera instancia se planteó la idea de centrifugar la sangre para concentrar a los patógenos en una zona denominada Buffy Coat. Esta corresponde a la fracción del centrifugado con mayor concentración de células bacterianas y glóbulos blancos. Para separar la fase del “buffy coat” se centrifugó a una velocidad baja (600 xg durante 10 minutos) para evitar que las células precipitaran. Luego de realizar ensayos a diferentes velocidades y sembrar en placas distintas cada una de las fracciones resultantes, se comprobó que la mayoría de los patógenos eran arrastrados por los mismos eritrocitos al fondo del tubo y no era posible recuperarlos en el Buffy Coat (Tabla 4)

Velocidades de Centrifugación (xg)	Fracción	Cuenta (CFU's)	Observación
50	Superior	-	No se forman fases
50	Inferior	-	
100	Superior	1	
100	Inferior	190	
150	Superior	5	
150	Inferior	215	
200	Superior	1	
200	Inferior	240	
Sin centrifugar		230	Sin centrifugar

Tabla 5: Recuento de colonias respecto de la centrifugación diferencial y recuperación.

3.2.2 Análisis del protocolo de extracción de DNA desarrollado previamente

3.2.2.1 Extracción basada en Tiocianato de Guanidina y Columnas Axygen.

Con el fin de mejorar la sensibilidad de ensayo, en una primera instancia se planteó la idea de extraer DNA la sangre utilizando un protocolo basado en Tiocianato de Guanidina adaptado de *Cremonesi* y cols y centrifugado en rotor de ángulo móvil (Universal, Hettich) a 3.500 rpm durante 5 minutos. Para extraer el DNA se utilizaban las dos porciones del centrifugado. Una de ellas es la que queda sobre el gel separador, el “*Buffy coat*”, que corresponde a la placa leuco-plaquetaria y donde se encuentra la mayor cantidad de bacterias. La segunda porción es el sobrenadante. Ambas porciones se colocaron en tubos Eppendorff diferentes y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 minutos (Mikro 22 R, Hettich) y luego se eliminó el sobrenadante.

Al trabajar con muestras de sangre fresca fortificada, ésta se centrifugó a 600 xg durante 10 min., se extrajo el sobrenadante y éste se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm (Mikro 22 R, Hettich) durante 2 min. En estos casos, al precipitado se agregó de tampón de lisis de Tiocianato de Guanidina pH 7, se resuspendió, se mezcló en vórtex y se transfirió a una columna Axygen, que se colocó sobre un tubo Eppendorff de 2 ml. Luego se centrifugó a 450 xg durante 30 segundos. Se eliminó el centrifugado y se agregó solución de lavado “*Washing Solution*” a la columna y se centrifugó a 450 xg durante 30 seg. Luego se eliminó el centrifugado. Para secar la columna se utilizó etanol absoluto y se centrifugó a 10.000 rpm (Mikro 22 R, Hettich) durante 1 min. Luego la columna se colocó en un tubo Eppendorff nuevo de 1,5 ml. A la columna se agregó tampón TE (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) precalentado a 65°C y se centrifugó a 10.000 rpm (Mikro 22 R, Hettich) durante 1 min. Se eliminó la columna y se guardó el DNA extraído a 4°C

Para establecer la viabilidad del proceso de extracción antes planteado, se comparó con lo que se considera el mejor protocolo de extracción de DNA del mercado, correspondiente a aquel provisto por la empresa Qiagen®. Se observó que la sensibilidad mostrada por el sistema comercial Qiagen fue sustancialmente mejor que el protocolo usado anteriormente, por lo que se decide su reemplazo y se definió como el que utilizará en todos los próximos ensayos. (Figura 5)

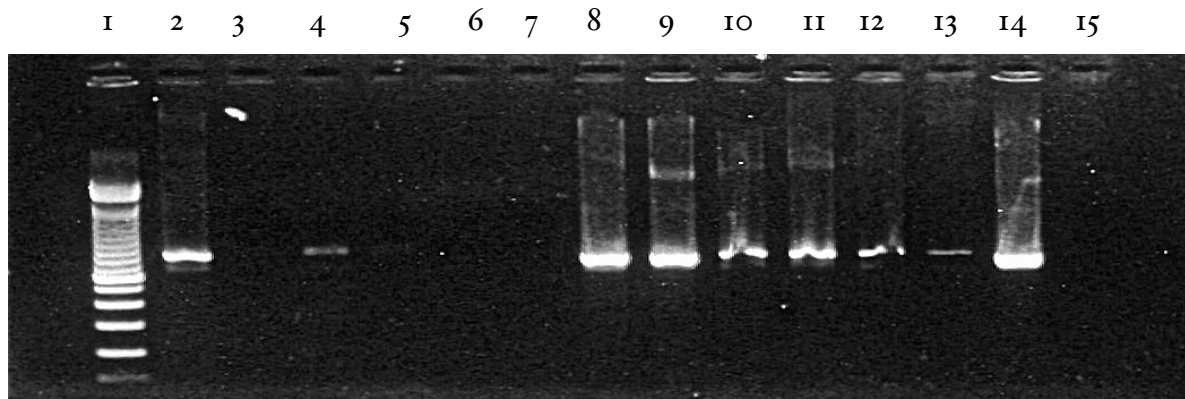


Figura 5: Comparación de protocolos de extracción de DNA

La prueba de los protocolos de Qiagen vs Axygen, se realizó utilizando las mismas diluciones bacterianas en duplicado. Carriles 2-7: Extracción de DNA con protocolo previamente diseñado para Columnas Axygen. Carriles 8-13: Extracción de DNA utilizando columnas Qiagen. Carril 14: Control positivo de extracción y PCR, carril 15: NTC. En el carril 1 se cargó el patrón de masa molecular de 100 pb. La banda más notoria corresponde a 500 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

3.3 PCR *in silico* para establecer la especificidad de ensayo.

Se simulación reacciones de PCR *in silico* con el fin de enfrentar los partidores a secuencias templado conservadas de las cuales no contamos en el laboratorio y conocer la cantidad de productos de PCR derivados de los ensayos de amplificación y de esa manera establecer la especificidad del ensayo.

Tabla 6: Resultados positivos de PCR *in silico*

Se muestra una tabla sólo con los resultados positivos de amplificación por PCR *in silico* para todas las cepas disponibles en la base de datos de <http://insilico.ehu.es/>

Pareja	Organismo	Resultado	Tamaño
Kp	1 - Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578	+	775
	2 - Klebsiella pneumoniae 342	+	
	3 - Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044	+	

	4 - Klebsiella variicola At-22	+	
Sp			
	2 - Streptococcus pneumoniae TIGR4	+	457
	3 - Streptococcus pneumoniae R6	+	
	20 - Streptococcus pneumoniae D39	+	
	27 - Streptococcus pneumoniae Hungary19A-6	+	
	28 - Streptococcus pneumoniae CGSP14	+	
	29 - Streptococcus pneumoniae G54	+	
	32 - Streptococcus pneumoniae ATCC 700669	+	
	34 - Streptococcus pneumoniae JJA	+	
	35 - Streptococcus pneumoniae P1031	+	
	36 - Streptococcus pneumoniae 70585	+	
	37 - Streptococcus pneumoniae Taiwan19F-14	+	
	45 - Streptococcus mitis B6	+	
	47 - Streptococcus pneumoniae TCH8431/19A	+	
	48 - Streptococcus pneumoniae AP200	+	
	49 - Streptococcus pneumoniae 670-6B	+	
St			
	1 - Staphylococcus aureus subsp. aureus N315	+	219
	2 - Staphylococcus aureus strain Mu50	+	
	3 - Staphylococcus aureus subsp. aureus MW2	+	
	4 - Staphylococcus aureus subsp. aureus MRSA252	+	
	5 - Staphylococcus aureus subsp. aureus MSSA476	+	
	6 - Staphylococcus epidermidis ATCC_12228	+	
	7 - Staphylococcus aureus subsp. aureus COL	+	
	8 - Staphylococcus epidermidis RP62A	+	
	9 - Staphylococcus haemolyticus JCSC1435	+	
	11 - Staphylococcus aureus RF122	+	
	12 - Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_FPR3757	+	
	13 - Staphylococcus aureus subsp. aureus NCTC 8325	+	
	14 - Staphylococcus aureus subsp. aureus JH9	+	
	15 - Staphylococcus aureus subsp. aureus JH1	+	
	16 - Staphylococcus aureus subsp. aureus str. Newman	+	
	17 - Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu3	+	
	18 - Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH1516	+	
	20 - Staphylococcus aureus subsp. aureus ED98	+	
	21 - Staphylococcus lugdunensis HKU09-01	+	

In silico PCR amplification
 Primer 1 -> 5'-GTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG-3'
 Primer 2 -> 5'-TCAAGGGCACACCTCCAAATCGA-3'
 No mismatches allowed. [info](#)

Selected strains

- 1 - *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578
- 2 - *Klebsiella pneumoniae* 342
- 3 - *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044
- 4 - *Klebsiella variicola* At-22

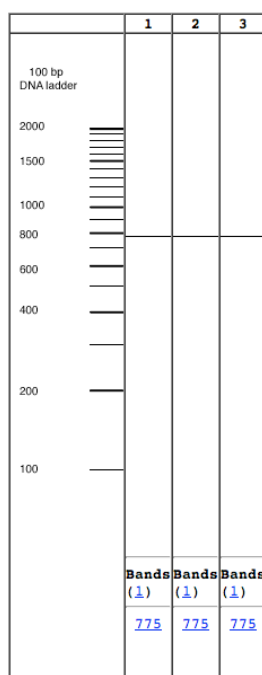


Figura 6. Amplificación de PCR *in silico*

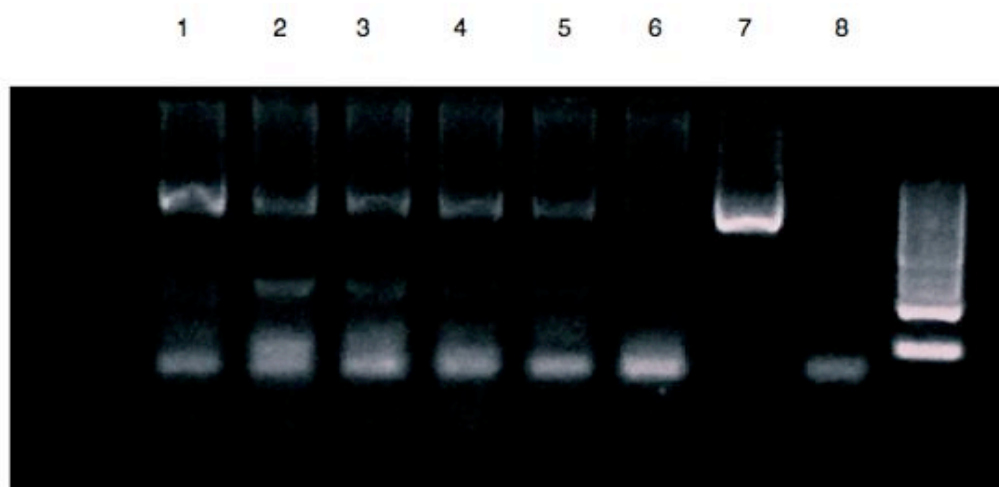
Carril 1: Amplificación de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578 Carril 2: Amplificación de *Klebsiella pneumoniae* 342, Carril 3: Amplificación de *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044

3.4 Análisis de sensibilidad.

3.4.1 Curvas de dilución en sangre y amplificación por PCR para determinar sensibilidad de ensayo.

Con el fin de determinar la sensibilidad del ensayo en sangre, se realizaron curvas de dilución de patógenos en sangre tomado un referente bacteriano, *Klebsiella pneumoniae* y un referente fúngico, correspondiente a *Candida albicans*. Para ello se agregó una cantidad co-

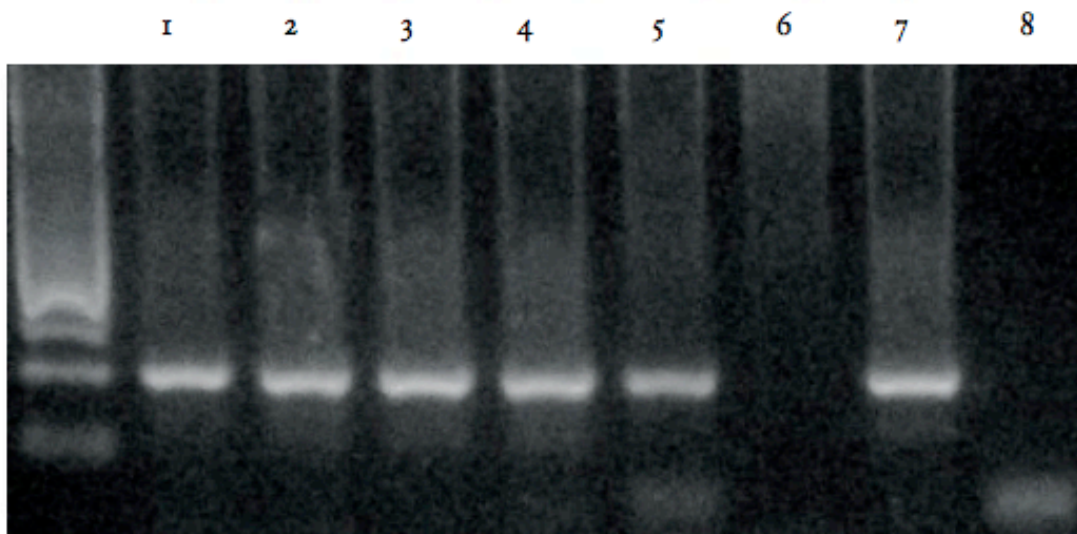
nocida de patógenos a 200 µl de sangre para hacer la extracción de DNA con columnas Qia-
gen y posterior PCR (Figura 6 y 7)



	1	2	3	4	5	6	7	8
Plaqueo (100uL)	no se puede contar	no se puede contar	625	125	16	1	Control positivo	Control negativo
CFU / mL de sangre	12000	1200	600	120	15	5		
CFU / totales			120	24	3	0		
CFU / por rx de PCR	600	60	25-30	5-6	1-2	0		

Figura 7: Sensibilidad del ensayo en sangre fortificada con *Klebsiella pneumoniae*

Se realiza una dilución seriada de *Klebsiella pneumoniae* en sangre, con las cantidades de patógenos indicadas en la tabla anterior. En la figura se observa que la señal de la banda correspondiente al tamaño esperado para *Klebsiella* (775pb) se mantiene incluso con 1-2 CFU por reacción de PCR (15CFU/mL de sangre). El control negativo corresponde a sangre sin fortificar y el control positivo corresponde a un PCR de colonia.



	1	2	3	4	5	6	7	8
Plaqueo (100uL)	no se puede contar	no se puede contar	625	125	16	1	Control positivo	Control negativo
CFU / mL de sangre	12000	1200	600	120	15	5		
CFU / totales			120	24	3	0		
CFU / por rx de PCR	600	60	25-30	5-6	1-2	0		

Figura 8: Sensibilidad del ensayo en sangre para hongos *Candida albicans*

Se realiza una dilución seriada de *Candida albicans* en sangre, con las cantidades de patógenos indicadas en la tabla anterior. En la figura se observa que la señal de la banda correspondiente al tamaño esperado para *Candida* (228pb) se mantiene incluso con 1-2 CFU por reacción de PCR (15CFU/mL de sangre). El control negativo corresponde a sangre sin fortificar y el control positivo corresponde a un PCR de colonia.

3.5 Ensayos realizados en muestras clínicas

3.5.1 Análisis en muestras clínicas provenientes del Hospital Dr. Gustavo Fricke en Viña del Mar.

Con el fin de validar los resultados *in vitro*, se estudian muestras clínicas reales provenientes de Hospital Dr. Gustavo Fricke en Viña del Mar.

Tabla 7: Muestras Clínicas analizadas.

1. Tabla con la información de los pacientes estudiados.

Nº	EDAD	FECHA TM	Hemocultivos	PCR Bact.	PCR Hongos
1	22	12-abr-10	2 negativos	+Staphylococcus	-
2		13-abr-10	4 negativos	+Staphylococcus	-
1`	22	29-abr-10	2 negativos	+Klebsiella	-
4		5-mayo-10	4 negativos	+Streptococcus	+Candida
5	18	8-jun-10	19 negativos, 1 positivo a SCN	+Staphylococcus	+Aspergillus
6	27	22-jun-10	10 negativos	+Staphylococcus	-
6`	27	7-jul-10		-	-
8	30	6-ago-10	no encontrada	+Staphylococcus	-
9	26	19-ago-10	4 negativos	-	-
10	54	19-ago-10	10 negativos	-	-
11	30	25-ago-10	9 negativos, 3 positivos a E. coli	+Staphylococcus	-
12	52	27-agos-10	4 negativos, 2 positivos a SCN	-	-
13	27	2-sep-10		-	-
14	54	2-sep-10		-	-
15		20-sep-10		+Staphylococcus	-

3.5.2 Amplificación por PCR.

Se implementó un sistema de recolección de las muestras de modo de que fuera posible obtener el DNA mismo día de su extracción desde el paciente. Inmediatamente después se realiza amplificación por PCR según el protocolo establecido. Se muestra el ejemplo de un resultado positivo (Figura 9) y negativo (Figura 10). El gen de β Globina humano se utiliza como control positivo de extracción y de reacción de amplificación por PRC para descartar falsos negativos.

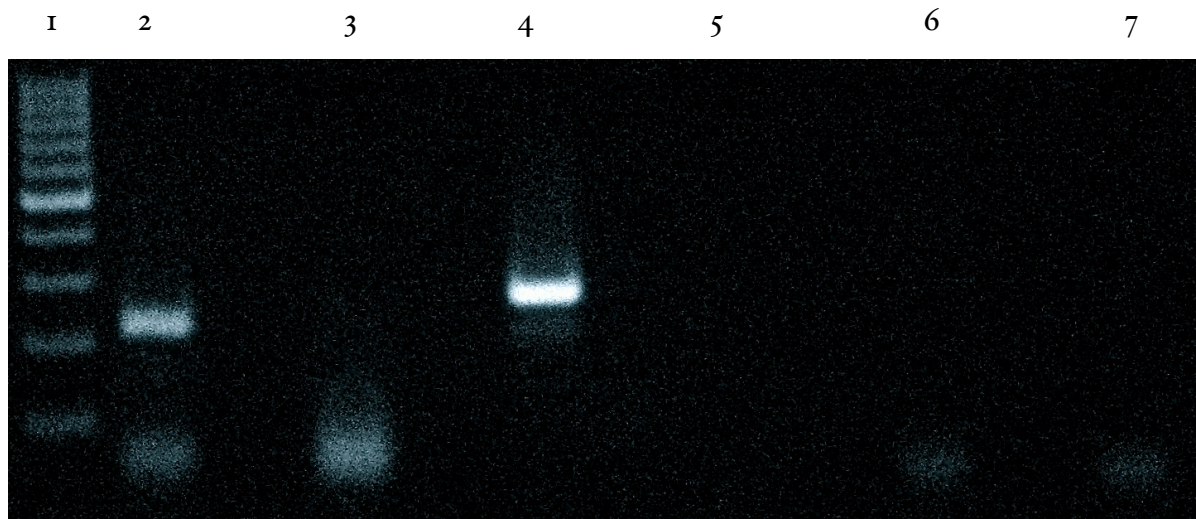


Figura 9: Muestra Clínica 11

Carril 2: Amplificación positiva para *Staphylococcus* (219pb). Carril 3: NTC, Carril 4: Control positivo de extracción y PCR amplificación de β Globina, Carril 5: NTC de β Globina, Carril 6-7: No hay amplificación de DNA de patógenos fúngicos. En el carril 1 se cargó el patrón de peso molecular de 100 pb. La banda más notoria corresponde a 500 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio.

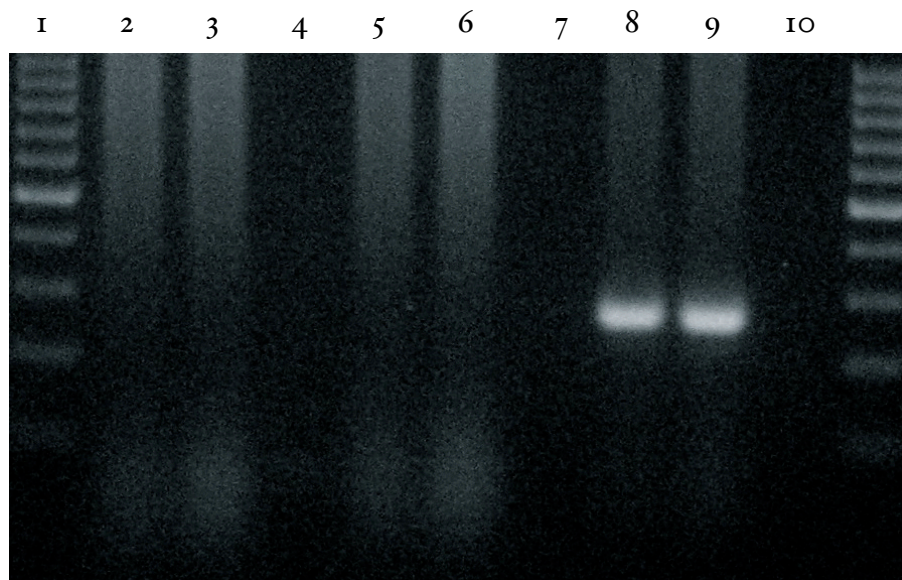


Figura 10: Muestras Clínica 9 y 10

Carril 2-3: Amplificación negativa para bacterias. Carril 4: NTC, Carril 5-6: Amplificación negativa para patógenos fúngicos, Carril 7: NTC, Carril 8-9: Control positivo de extracción y PCR amplificación de β Globina, Carril 10: NTC. En el carril 1 se cargó el patrón de peso molecular de 100 pb.

La banda más notoria corresponde a 500 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio.

En la figura 8 se observa el resultado positivo de amplificación para el patógeno *Staphylococcus sp.* a partir de una muestra clínica. En la figura 9 se observa un resultado negativo tanto como para patógenos bacterianos como fúngicos pero con la presencia de amplificación para β Globina humana descartando falsos negativos.

3.6 Ensayos de especificidad

3.6.1 PCR *in vitro* para establecer la especificidad de ensayo.

3.6.2 Templados de *Salmonella sp.* y *Shigella sp.*

Se utilizó DNA de *Salmonella sp.* y *Shigella sp.* proveniente del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile para realizar ensayos de especificidad para los partidores desarrollados. Se escogieron estos patógenos debido a que se encuentran presentes normalmente en la mayoría de las muestras de sangre de pacientes inmunodeprimidos. A partir de los resultados observados se puede afirmar que las parejas de partidores usadas en los ensayos son específicas para *Klebsiella sp.* y no presentan amplificación cruzada con patógenos presentes en sangre del género *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* por lo que son útiles para la identificación específica de *Klebsiella sp.*

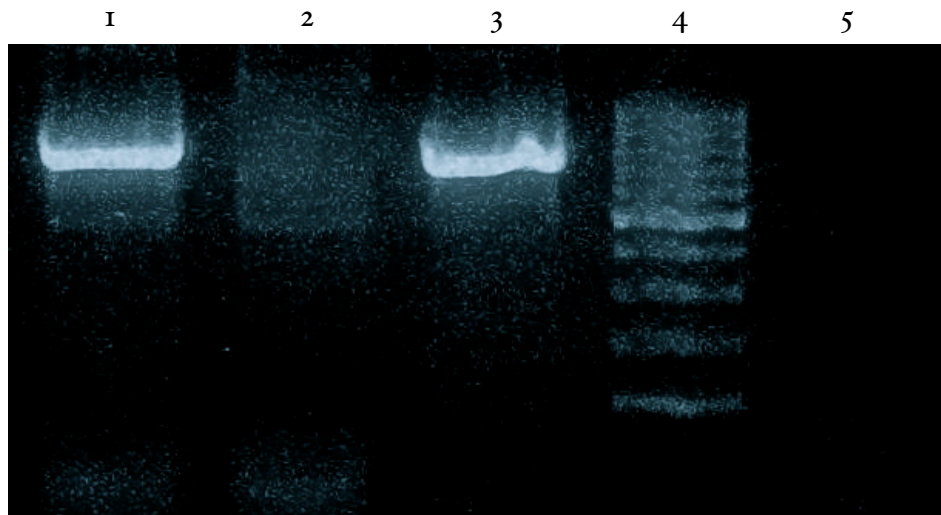


Figura 11: Ensayo de Especificidad

Carril 1: Templado de *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella*. Carril 2: Templado de *Salmonella* y *Shigella*, Carril 3: Templado de *Klebsiella* (control positivo), Carril 5: NTC. Carril 4 se cargó el patrón de masa molecular de 100 pb. La banda más notoria corresponde a 500 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio. Todas las reacciones se desarrollan usando todas las parejas de partidores disponibles para bacterias.

4. DISCUSION

El desarrollo de técnicas de biología molecular en el diagnóstico clínico ha adquirido gran importancia debido a su alta especificidad, selectividad y rapidez. Por esta razón la implementación de métodos de detección de patógenos mediante PCR trae consigo grandes beneficios a los pacientes y al sistema de salud, como la disminución de la mortalidad de los pacientes, disminución de los días cama y de la aparición de resistencias a antibióticos.

En este trabajo se logró desarrollar un método de extracción de DNA rápido, sensible y de fácil manejo. Además el producto que se obtiene es de buena calidad y no posee impurezas que pueden afectar el resultado del PCR. Más aún, se demostró que este método puede ser utilizado para la extracción de DNA de bacterias y hongos

Uno de los puntos más importantes en el desarrollo de este trabajo fue el estudio de partidores diseñados anteriormente, dado que estos debían tener como resultado una banda única y específica para cada patógeno, con 100% de especificidad respecto de especies cercanas que pudieran resultar en falsos positivos.

La sensibilidad es uno de los factores decisivos en la elección de un método u otro. En el desarrollo de este trabajo la medición de la sensibilidad fue un tema difícil de implementar, debido a las condiciones experimentales de trabajo. Por ejemplo, en el Multiplex-PCR bacteriano es fundamental impedir la formación de productos inespecíficos. Para ello se escogió una alta temperatura de apareamiento de los partidores de 61°C, que es superior al rango utilizado habitualmente para PCR que es de 55-60°C. Esta temperatura impide que se amplifiquen productos no deseados, pero a la vez acota las posibilidades de unión de los partidores con su secuencia blanco, especialmente cuando ésta se encuentra en bajas concentraciones. Además se utilizó un protocolo de PCR de 40 ciclos de amplificación para aumentar lo más posible la sensibilidad lo más posible. El grado de estrictez puede ser mejorado con el diseño de un “*Nested-PCR*” (PCR anidado), que aumentaría notablemente la sensibilidad del PCR y permitiría detectar la presencia de un bajo número de templado[21]. Sin embargo, el uso de un PCR anidado aumenta el tiempo necesario para el análisis, así como el costo involucrado y la posibilidad de contaminación cruzada pues se requiere de una segunda reacción de PCR. El aumento de la sensibilidad se contrapone a la mayor complejidad

del ensayo. Otro factor que influye en la sensibilidad del método es el tamaño de la alícuota de muestra que se utiliza para la extracción de DNA, debido a que son pocos microlitros, lo cual podría disminuir las posibilidades de detectar el patógeno, cuando éste se encuentra en concentraciones muy bajas. Esto se podría corregir aumentando la cantidad de muestra inicial de extracción para trabajar optimizando el protocolo de extracción, dado que se podría perder DNA, lo que influiría notablemente cuando se encuentran pocos patógenos en el medio. En este trabajo se optimizó el protocolo de extracción de DNA descartando etapas de centrifugación y utilizando volúmenes mayores a 1 mL debido a los problemas técnicos de ello. Se comprobó que la centrifugación disminuía la sensibilidad del ensayo y que el procesamiento de la muestra el mismo día de la extracción de la sangre aumentaba la sensibilidad considerablemente respecto de muestras congeladas, al evitar una etapa de congelamiento

Luego del estudio de los partidores se logró obtener amplicones únicos, específicos y selectivos para cada uno de los patógenos bacterianos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* y para los patógenos fúngicos *Aspergillus* y *Candida*. Con estos resultados se montaron dos ensayos de Multiplex-PCR diferentes. El primero de ellos, Multiplex-PCR bacteriano que detecta simultáneamente la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae*. El segundo Multiplex-PCR detecta la presencia de *Aspergillus* y/o *Candida*. En nuestro caso, debido a la disponibilidad de un termociclador con Gradiente es posible realizar los dos ensayos en una misma reacción, cuando se analizan sólo 1 a 3 muestras simultáneamente.

Los resultados de los PCR, obtenidos en sangre fortificada se confirmaron en sangre provenientes de muestras clínicas. Se logró el mismo resultado, es decir, se pudo detectar la presencia de los patógenos bacterianos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* y para los patógenos fúngicos *Aspergillus* y *Candida*, sin que interfiriese el DNA humano que se encuentra en la muestra de sangre, el cual fue utilizado como control positivo de extracción y amplificación.

Se comprobó que el ensayo de Multiplex PCR entrega mejores resultados que el hemocultivo tradicional. En la mayoría de los casos estudiados, el PCR arrojaba un resultado igual de específico mucho más sensible y además en menor tiempo. En el caso de algunos

pacientes se les llegó a hacer mas de 10 hemocultivos sin llegar a un diagnóstico certero. Es destacable el caso de un paciente que luego de 19 hemocultivos lo único que finalmente le ayudó y definió el curso terapéutico fue el ensayo de PCR. En los caso de que el ensayo de PCR fue negativo, este se correlacionó con el hallazgo de un hemocultivo positivo para patógenos no detectados corroborando la especificidad del análisis.

Inicialmente este proyecto se diseñó para trabajar con muestras de sangre periférica y no para hemocultivos. El uso de estos últimos trae ventajas y desventajas. Una de las ventajas es que al ser cultivados aumentan considerablemente la cantidad de bacteria que hay en el medio, lo que trae consigo el aumento de la sensibilidad del método. Sin embargo este cultivo agrega alrededor 18 horas de retraso al análisis, pues éste es el tiempo que debe transcurrir para que las bacterias crezcan en el medio del hemocultivo, lo que trae consigo un demora en el diagnóstico y posterior tratamiento del paciente. Otra desventaja de los hemocultivos es que contienen muchos reactivos, como la hemina, la cual es un fuerte inhibidor del PCR y podría permanecer en la solución de DNA final cuando este es extraído. Todos estas propiedades podrían influir en la reproducibilidad del método al trabajar con muestras reales por lo que en este trabajo sólo se utilizaron muestras de sangre periférica.

La importancia de disponer de sistemas rápidos, certeros y poco costosos como estrategia de mejoramiento de la salud pública, especialmente en países en desarrollo o para grupos específicos como pacientes inmunodeprimidos como lo son aquellos que se encuentran en quimioterapia, con leucemia o VIH positivos, hacen que el desarrollo de técnicas que involucren estas características tengan un gran potencial de desarrollo. Es así como un estudio realizado por “*Nature Genetics*” el 2002[22], donde se encuestó a 28 investigadores del área científica y de países desarrollados, donde se les preguntó “Cuáles creían ellos que iban a ser las principales biotecnologías que podrían ayudar a mejorar la salud en los países en desarrollo en los próximos cinco a diez años”, debiendo considerar los siguientes aspectos: impacto, conveniencia, necesidad, viabilidad, brecha de conocimientos y beneficios indirectos, se obtuvo como resultado que la categoría mejor valorada fue “Tecnologías moleculares modificadas y asequibles para el diagnóstico de enfermedades infecciosas”.

Para países en vías de desarrollo que no cuentan con las capacidades humanas, técnicas y monetarias para el correcto uso y mantención de sofisticados equipos de PCR en tiempo real, la alternativa desarrollada basada en el multiplex PCR se vislumbra como una oportunidad única de incorporar la Biología Molecular en los ensayos de rutina de centros de salud públicos y mejorar la sobrevivencia de los pacientes. Una gran ventaja del ensayo desarrollado es la capacidad de hacer un screening para las bacterias y hongos más comunes que afectan a los pacientes inmunodeprimidos de una sola vez. De esta manera se reducen los costos considerablemente ya que no se necesita hacer un ensayo para cada sospecha de patógeno. En el caso de PCR en tiempo real, la sensibilidad teórica debería ser muy superior a la de un PCR tradicional. Con las técnicas implementadas en el desarrollo de esta memoria es posible acercarse considerablemente a esa sensibilidad sin la obligación de aumentar los costos. De la misma manera, los reactivos utilizados en el PCR en tiempo real son considerablemente más caros que los utilizados en el PCR tradicional, dificultando la masificación de este tipo de técnicas.

Teniendo en cuenta que el diagnóstico rápido y adecuado de enfermedades infecciosas no es sólo importante para un pronto tratamiento, sino que también para impedir que se diseminen las enfermedades y evitar así el malgasto de recursos en tratamientos inefectivos, debido a que según los investigadores los métodos usados actualmente son engorrosos e inadecuados, hacen que las tecnologías moleculares cumplan la mayoría de los aspectos que se consideraron en la encuesta.

Las tecnologías basadas en el diagnóstico molecular ya están en uso, como lo es el PCR, anticuerpos monoclonales y antígenos recombinantes. Estas tecnologías se pueden modificar para hacer que sean más adecuadas para el diagnóstico en países en desarrollo, como por ejemplo el PCR que se realiza a muestras de DNA pro-viral de VIH en pacientes pediátricos.

En nuestro caso la interacción con los médicos tratantes de los pacientes de donde se obtuvo la muestra de sangre periférica fue de vital importancia, ya que se comprobó en la marcha la utilidad diagnóstica del ensayo. Muchas veces se confió en el resultado entregado

por el ensayo molecular antes de que el del hemocultivo debido al aumento de sensibilidad y rapidez sustanciales, salvando la vida de 3 pacientes en extremo riesgo.

Es importante señalar que debido al reducido número de muestras no es posible determinar con 100% de certeza la no aparición de falsos negativos o positivos, ya que no siempre se contó con el hemocultivo como contraparte. En nuestro caso, junto con el resultado del hemocultivo, se valora lo observado por el clínico en la evolución del paciente luego de la ayuda diagnóstica y posterior tratamiento. Para un profesional clínico es sumamente importante poder descartar infecciones por hongos, por lo que quedan abiertas las puertas para los aquellos investigadores que deseen aumentar el número de pacientes estudiados y determinar fehacientemente la especificidad y sensibilidad del ensayo.

5. CONCLUSIONES

- Se confirmó el método de identificación desarrollado con anterioridad para las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* y de las especies fúngicas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*, en muestras de sangre de pacientes inmunodeprimidos.
- Se logró montar una técnica de cultivo microbiológico para las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* y de las especies fúngicas *Candida albicans*.
- Se logró determinar la especificidad de los partidores diseñados respecto de otras cepas bacterianas típicas intrahospitalarias.
- Se logró mejorar y determinar la sensibilidad de la técnica en sangre, la cual resultó ser de 1-2 CFU/Rx de PCR lo que equivale a 15CFU/mL de sangre.
- Se logró detectar los patógenos ensayados en muestras de sangre fortificada con una sensibilidad similar a los ensayos de PCR en tiempo real disponibles en el mercado.
- Se logró identificar el agente causante de enfermedad en muestras reales de pacientes inmunodeprimidos provenientes del Hospital Dr. Gustavo Fricke en Viña del Mar.

6. PROYECCIONES

Con el fin de validar los resultados obtenidos, en el futuro será necesario ensayar el sistema sobre un número mayor de cepas de los patógenos estudiados y sobre un número superior de muestras clínicas que cuenten con los respectivos hemocultivos para poder hacer una comparación mas certera.

Es importante en el futuro poder secuenciar los productos obtenidos desde el PCR para confirmar los hallazgos y validar el ensayo.

Otro tema que debe ser desarrollado, es la extensión de este sistema de diagnóstico al análisis de estos y otros patógenos en otros fluidos biológicos como líquido cefalorraquídeo (LFR), lavado broncoalveolar (BAL), orina, etc., ya que este era uno de los objetivos iniciales de este proyecto el cual no fue desarrollado.

Este método debe ser probado sobre número mayor de muestras reales, ya que hasta el momento sólo se ha trabajado con un pequeño número de éstas. Además se debe afinar la reproducibilidad del método para poder así otorgar un diagnóstico certero al paciente y que este sea utilizado rutinariamente en los centros asistenciales. Es posible también ampliar los análisis a muestras provenientes de la UCI de otro tipo de pacientes.

Con todos los resultados obtenidos y los que se estiman obtener en el futuro, se desea desarrollar un sistema de test práctico para la detección de estos patógenos en el laboratorio clínico, con el fin de que exista un método de detección rápido, sensible y específico a disposición de los hospitales, clínicas y pacientes, especialmente en los países del tercer mundo.

Otra de las proyecciones de este estudio es la aplicación de esta misma estrategia al diseño de otros sistemas de diagnóstico para otros patógenos infecciosos como son virus y parásitos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Reiss, E., et al., *Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections*. Med Mycol, 1998. **36 Suppl 1**: p. 249-57.
2. Pizzo, P.A., et al., *The child with cancer and infection. I. Empiric therapy for fever and neutropenia, and preventive strategies*. J Pediatr, 1991. **119**(5): p. 679-94.
3. Lorente, M.L., et al., *Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study*. Thorax, 2000. **55**(2): p. 133-7.
4. Kurupati, P., et al., *Rapid detection of Klebsiella pneumoniae from blood culture bottles by real-time PCR*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(3): p. 1337-40.
5. Apey, M.B., *Identificación precoz de patógenos oportunistas en sangre mediante PCR multiplex*, in *Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular*. 2007, Universidad de Chile: Santiago.
6. Buchheidt, D., et al., *Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect Aspergillus species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients*. Br J Haematol, 2002. **116**(4): p. 803-11.
7. Alvarez, I. and J.F. Wendel, *Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference*. Mol Phylogenet Evol, 2003. **29**(3): p. 417-34.
8. Daar, A.S., et al., *Top ten biotechnologies for improving health in developing countries*. Nat Genet, 2002. **32**(2): p. 229-32.
9. Garcia, P., et al., *Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 1): p. 67-72.
10. Karahan, Z.C., et al., *PCR evaluation of false-positive signals from two automated blood-culture systems*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 1): p. 53-7.
11. Hughes, *2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer*. Clinical Infection Disease, 2002. **34**(6): p. 730-751.
12. Fraser, V.J., et al., *Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(3): p. 414-21.
13. Yamamoto, Y., *PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(3): p. 508-14.

14. Janda, J.M. and S.L. Abbott, *16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 2761-4.
15. Zhang, Y., et al., *Detection of Streptococcus pneumoniae in whole blood by PCR*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(3): p. 596-601.
16. Schabereiter-Gurtner, C., et al., *Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important Aspergillus and Candida species in clinical specimens*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(3): p. 906-14.
17. Martineau, F., et al., *Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(3): p. 618-23.
18. Fagon, J.Y., et al., *Mortality attributable to nosocomial infections in the ICU*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1994. **15**(7): p. 428-34.
19. Hebart, H., et al., *Prospective screening by a panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia*. Br J Haematol, 2000. **111**(2): p. 635-40.
20. Kinnunen, U., et al., *Continuous-monitoring blood culture screening system improves the detection of bacteremia in neutropenic patients*. Scand J Infect Dis, 1996. **28**(3): p. 287-92.
21. Saruta, K., et al., *Rapid identification and typing of Staphylococcus aureus by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region*. FEMS Microbiol Lett, 1997. **146**(2): p. 271-8.

8. ANEXOS

Anexo 1 : Consentimiento Informado Pacientes

Hora Inicio:

ESTUDIO: “Identificación precoz de gérmenes fúngicos y bacterianos mediante el uso de Multiplex PCR en pacientes con Neutropenia Febril.”.

OBJETIVO: Estudio de identificación rápida de gérmenes para el tratamiento de infecciones por patógenos oportunistas y enfermedades oncológicas.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

- 1.- El médico especialista tratante Dr. me ha explicado claramente mi enfermedad, el pronóstico y las posibilidades de tratamiento.
- 2.- Sé que debo realizarme una serie de exámenes: de sangre, radiografías, ecotomografías entre otros; para el diagnóstico, tratamiento y el seguimiento de esta enfermedad.
- 3.- Se me ha explicado que seré tratado, según protocolo,con: Cirugía, si no, Quimioterapia sinoRadioterapia sinoy según el estadio o etapa de mi enfermedad.
- 4.- La cirugía tratará de eliminar el tumor canceroso, el que puede ser extirpado total o parcialmente. Para este procedimiento seré anestesiado general si no , regional si no
- 5.- La Quimioterapia son medicamentos endovenosos u orales, anticancerosos, que tratan de controlar o curar mi enfermedad. Puede provocar efectos secundarios desagradables frecuentes y transitorios como: caída del cabello, o vómitos y náuseas, otros efectos menos frecuentes como úlceras bucales, anemia, infección, sangramiento, incluso ocasionalmente efectos graves como esterilidad y hasta la muerte.

6.- La radioterapia, consiste en la aplicación de radiación que trata de disminuir, total o parcialmente el tumor. Puede provocar efectos secundarios desagradables frecuentes y transitorios como: mareos, lesión local de la piel y mucosas, alteración del gusto, náuseas, vómitos y diarrea. Otros efectos menos frecuentes como úlceras bucales, anemia, molestias para orinar, y pérdida de la sensibilidad superficial.

7.- He comprendido que no todos los cánceres son curables en un 100% y que existe la posibilidad de recaída y también de no respuesta al tratamiento.

8.- Es posible que también requiera otro tipo de tratamientos, como transfusiones de sangre y/o plaquetas, antibióticos y otros.

9.- Se que puedo sentir dolor, el que siempre se tratará y que puede ser aliviado total o parcialmente.

10.- Doy mi consentimiento para seguir el tratamiento y las recomendaciones del especialista y equipo de salud, sí _____, no _____ .

En caso de optar por seguir el tratamiento, el equipo de salud me informará de cualquier cambio y se compromete a contestar mis consultas.

Puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento. De no aceptar el tratamiento, o retirarme en el curso de él, declaro haber sido informado de las posibles consecuencias para mi estado de salud y no perderé ninguno de los beneficios que tengo como paciente.

11.- Yo,
declaro que he sido informado que tengo....., y que he leído con detención cada detalle de este documento y me han aclarado todas mis dudas.

12.- Nombre pacienteFirma _____

Nombre familiar (testigo).....Firma _____

Médico Dr. Firma _____

Fecha

NOTA: Este formulario fue elaborado por Directorio PANDA, y consensuado por Unidad de Ética del Ministerio de

Salud. Jornada Nacional 2000, Villa Alemana. Debe ser visado por Comité Hospitalario de ética de cada centro PANDA.

Anexo 2: Consentimiento Informado Controles Sanos

ESTUDIO: “Identificación precoz de gérmenes fúngicos y bacterianos mediante el uso de Multiplex PCR en pacientes con Neutropenia Febril.”.

OBJETIVO: Estudio de identificación rápida de gérmenes para el tratamiento de infecciones por patógenos oportunistas y enfermedades oncológicas.

La profesora Daniela Seelenfreund me ha solicitado donar mi sangre para participar en un estudio destinado a desarrollar un método más rápido para diagnosticar la presencia de bacterias y hongos que causan enfermedades en pacientes inmunodeprimidos y/o con cáncer.

Se me ha explicado que el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico en el futuro podrá ir en beneficio directo de los pacientes enfermos, de modo que se pueda definir su tratamiento en forma más rápida y certera.

Estoy en conocimiento que la muestra de sangre venosa se usará para analizar si ésta contiene o no algún microorganismo patógeno.

Tengo entendido que puedo negarme a que la muestra de sangre se utilice para realizar dichos estudios. Se me ha explicado también que puedo decidir si quiero o no saber los resultados de dichos estudios, aceptar o no que esta muestra sea guardada para estudios posteriores o pedir que sea destruida luego de terminar el estudio actual.

He comprendido que es importante poder desarrollar sistemas de diagnóstico mejorados. De esta manera los niños enfermos podrán recibir el tratamiento más adecuado y vivir en mejores condiciones de salud.

Cualquier duda o pregunta podré hacerla a la Profesora Daniela Seelenfreund Fono: 9781677 y/o al Tesista Sebastián Salinas Fono: 9781677, ambas de la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Viña Mackenna 20, Providencia, Santiago.

Declaro que he leído este documento y que me han aclarado todas las dudas.

Doy mi consentimiento con entera libertad y voluntariamente.

Sí acepto participar _____

No acepto participar _____

Nombre, firma y Rut del donante

Nombre, firma y Rut del profesor a cargo

Muchas gracias por su colaboración Santiago,.....de.....de 2.....