

Diversidad bacteriana en dos Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales

★ RESUMEN ★

- Estudio publicado en 2013 por Jacques Ravel del Inst. Cs del Genoma de la Universidad de Maryland USA.
- Recién Nacidos muy susceptibles a Infecciones Oportunistas.
- No existe gran debate entre la propagación de Infecciones y los EHI.
- Se estudiaron 2 UCIN de San Diego para caracterizar la diversidad microbiana del EHI.
- Utilizó la Técnica de Secuenciación de Próxima Generación para 30 muestras de diferentes superficies.

Extracción de ADN – Amplificación rRNA 16S

Productos PCR purificados se combinan en una única reacción para la pirosecuenciación (luminiscencia)

Análisis de datos usando QIIME

93 +/- 39 Géneros Bacterianos por muestra de EHI (patógenos oportunistas y bacterias coliformes fecales)

INTRODUCCIÓN

Estudio 1993-2001 encontró:

- 🔗 65% RNBP contrajo al menos una infección durante su internación.
- 🔗 38% Tenían Sepsis.
- 🔗 27% Falleció por Infecciones Hospitalarias.
- 🔗 Los sobrevivientes infectados fueron más propensos a desarrollar trastornos neurológicos.

**ES MUY DIFÍCIL COMPRENDER LAS FUENTES Y VÍAS DE TRANSMISIÓN DE
LOS AG. INFECCIOSOS**

Los PATÓGENOS NOSOCOMIALES pueden sobrevivir durante meses en un estado viable en el EHI

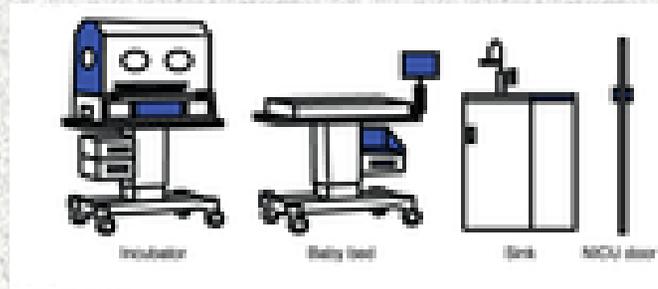
Se utilizan métodos independiente de cultivo, mediante amplificación y secuenciación de genes

CARACTERIZAR LA DIVERSIDAD MICROBIANA DEL EHI con un enfoque en las superficies de contacto en común entre las dos salas estudiadas.

★ MÉTODO ★

1- RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

- ✓ En 2 UCIN de San Diego en 01/2009 y 02/2009 en superficies tocadas antes de manipular al paciente.
- ✓ Superficies estudiadas: Cabecera de la cama – manijas de los cajones – pantallas táctiles – teclados - botones de puertas – incubadoras – grifos del lavabo – balanzas – etc.
- ✓ Mediante Hisopos (-80°C hasta extracción del ADN).



2- EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR (30 hisopos y para dos controles negativos).

- ✓ Hilos de algodón + mezcla de reacción de lisozima → Incubar baño 37°C x 30 min.
- ✓ Se añade una proteinasa y un Buffer y se mezcla suavemente → Incubar baño 70°C x 10 min.
- ✓ Purificación mediante un KIT (Dneasy Tissue).
- ✓ Después de la extracción el ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro.

- La PCR se realiza en lotes pequeños (y controles positivos y negativos) para reducir la posibilidad de contaminación del laboratorio.
- La amplificación PCR con códigos de barra se realizó con cebadores bacterianos "universales".
- Para las muestras se realizaron 30 ciclos de Amplificación PCR:

-----Etapa de Desnaturalización → 94°C x 5 min.-----

CICLOS: Desnaturalización a 94°C x 1 min.
Recocido a 55°C x 45 seg.
Extensión a 72°C x 15 min.

-----Extensión Final → 72°C x 10 min.-----

3- SECUENCIACIÓN

- ✓ Productos de PCR con código de barras se purificaron con un Kit de purificación y luego cada muestra se cuantificó en un espectrofotómetro.



ANÁLISIS INFORMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS

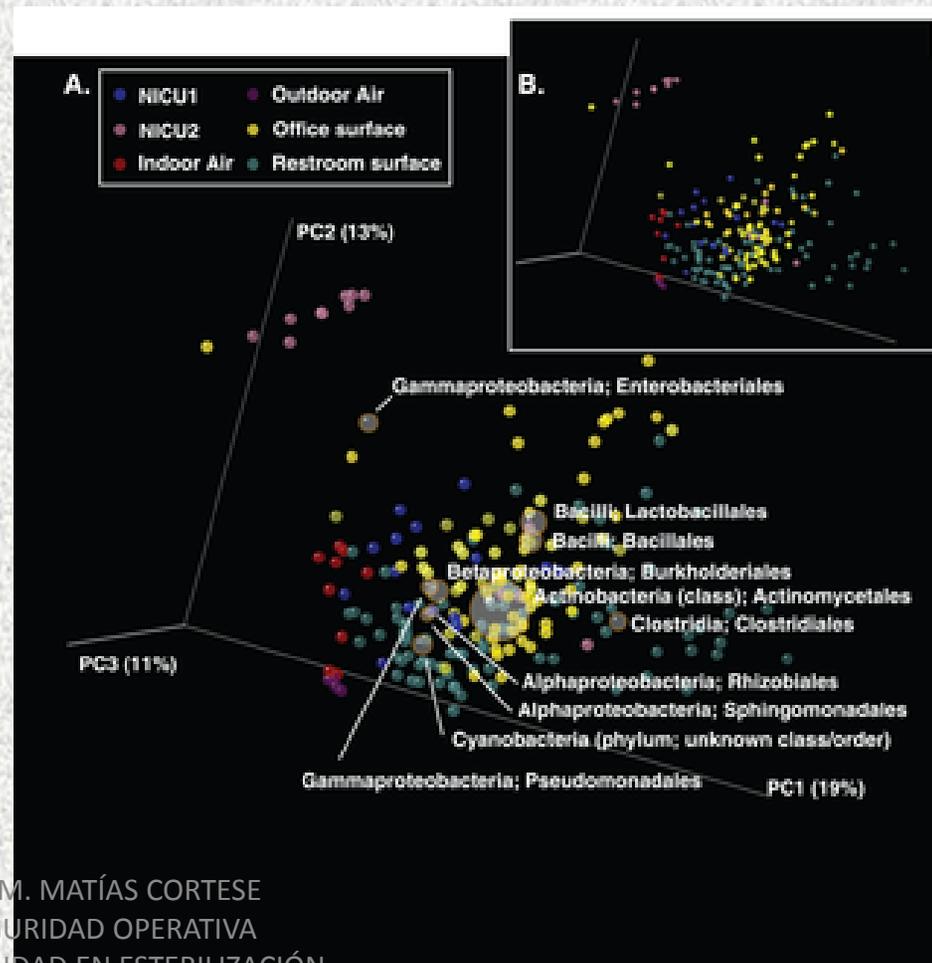


Los datos con código de barra de la Pirosecuenciación se analizan utilizando una base de datos con bibliotecas de secuencias agrupadas en unidades taxonómicas.

Se compara los datos de las 2 UCIN con los obtenidos en estudios publicados anteriormente en los que se siguieron protocolos de trabajo similares de purificación, amplificación y pirosecuenciación de muestras de:

- ❖ Espacios de trabajo de oficinas de 3 grandes ciudades
- ❖ Superficies de baños.
- ❖ Bacterias transportadas por el aire en Centros de Atención Salud.
- ❖ Bacterias asociadas a diferentes sitios del cuerpo humano.
- ❖ Diversos tipos de suelos

Análisis de coordenadas principales (PCoA)



FARM. MATÍAS CORTESE
SEGURIDAD OPERATIVA
ESPECIALIDAD EN ESTERILIZACIÓN

★ RESULTADOS ★

- Todos las M produjeron productos PCR visibles, y los controles negativos de PCR y extracción de ADN estaban en blanco.
- La Pirosecuenciación de 30M → Total 321.000 secuencias , restando las de baja calidad arrojó un promedio para:

UCIN1 2.200 secuencias por unidad de superficie

UCIN2 12.000 secuencias por unidad de superficie

Acinetobacter	Microbacterium
Actinomyces	Neisseria
Burkholderia	Pasteurella
Clostridium	Propionibacterium
Enterobacter	Pseudomonas
Flavimonas	Roseomonas
Flavobacterium	Staphylococcus
Gemella	Stenotrophomonas
Leclercia	Streptococcus

doi:10.1371/journal.pone.0054703.t002

«La técnica no
permite identificar a
nivel especie»

Se enumeran los 17 géneros de diferentes bacterias, que contienen especies con patógenos oportunistas que se encuentran comúnmente en las dos salas.

✦ DISCUSIÓN ✦

- Los métodos de secuenciación de alto rendimiento independientes de cultivo empleados en las UCIN, revelan una diversidad microbiana mayor que la revelada por métodos por cultivo.
- Cada superficie estaba habitada en promedio por 100 géneros de bacterias x unidad de superficie. (incluyendo muchos patógenos oportunistas)
- En ambas Salas se encontraron Enterobacter, Neiseria, Pseudomonas, Streptococcus, Staphylococcus, y los miembros de éstos géneros son conocidos por causar infecciones nosocomiales a los recién nacidos. Además se observó un número considerable de organismos que no se cultivan fácilmente.
- ACoP se encontró que 9 M de UCIN1, eran fácilmente separables del resto de las muestras de UCIN1 y UCIN2.(color rosa). Mientras que el resto se agruparon con muestras de interior de oficina, centros de salud y baños.
- Un análisis mas profundo de esas 9M de UCIN1 indicó un exceso de secuencias de enterobacterias fue el responsable de dicha separación. (Tracto digestivo – heces). Estos conocidos patógenos proliferan con facilidad en los Hospitales y muchos presentan resistencia a diferentes fármacos.
- Otro punto a destacar fue el hallazgo de una proporción importante de géneros de bacterias asociadas a la piel humana, particularmente propionibacterium, uno de los más comunes en ambas salas. También se encontró Streptococcus, Staphylococcus y otras bacterias muy comunes de la superficie de las manos.
- Las superficies de UCIN1 se asemejan mucho mas que las de UCIN2 a la piel humana, sospechando que puede deberse a una limpieza más reciente en UCIN2. Podemos decir que las manos son uno de los principales vectores de transmisión.
- En un futuro se podría estudiar la determinación a largo plazo de la diversidad bacteriana y la infección de las superficies en el tiempo, registrando el programa de limpieza y así determinar la velocidad de colonización del EHI.

Limitación del estudio:

No se puede determinar cuales de los microbios identificados fueron viables, ya que organismos no viables, no pueden causar directamente una infección aunque si pueden aportar resistencia Antibiótica a la comunidad bacteriana.

Inconveniente del enfoque del estudio:

Falta de resolución taxonómica a nivel cepa, lo que puede resultar problemático en la diferenciación de patógenos de sus parientes no patógenos.

A MEDIDA QUE LOS MÉTODOS DE ALTO RENDIMIENTO SEAN MÁS BARATOS Y LA BIOINFORMÁTICA ASOCIADA A ELLOS SEA MÁS ACCESIBLE, ESTAS TÉCNICAS PODRÁN SER USADAS PARA REALIZAR EL SEGUIMIENTO DE LA PROPAGACIÓN DE BACTERIAS EN UCIN, DETECTAR DESVIACIONES DE ESTA DIVERSIDAD Y DESARROLLAR UN SISTEMA DE ALERTA TEMPRANA PARA DETECTAR AGENTES INFECCIOSOS

Fin.-