

# DIFUSION POST-CAPACITACION FENOTIPIFICACION Y GENOTIPIFICACION DE *Clostridium difficile*

Instituto de Salud Publica de Chile.

Sub-Departamento de Genética Molecular

16/11 – 04/12.

**“El presente trabajo de investigación y/o transferencia tecnológica ha sido posible gracias al apoyo del Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos del PROCIENCIA del CONACYT”.**



# Programa de Capacitación.

- **Semana 1.**

- Organización de trabajo.
- Reunión con Jefes, Encargados y Capacitores.
- Electroforesis de Campo Pulsado.

## **Semana 2.**

Mañana. SubDepartamento de Patogenos Emergentes. Fenotipificacion de *Clostridium difficile*

Tarde. Electroforesis de Campo Pulsado.

MLST.

## **Semana 3.**

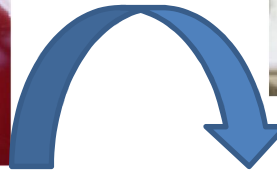
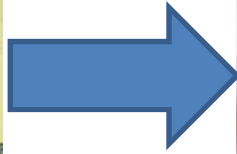
Analisis de software. Bionumerics PFGE.

Analisis de software. Bioedit Sequence Aligment

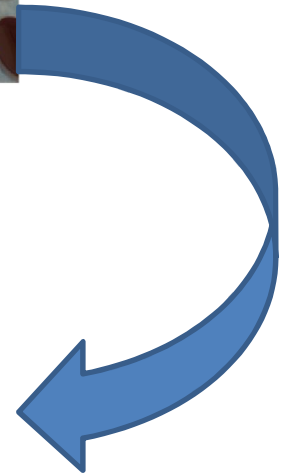
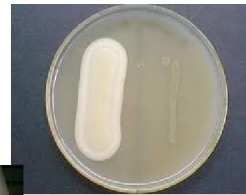
CHROMAS LITE.

MLST.

# DEPARTAMENTO DE PATOGENOS EMERGENTES.

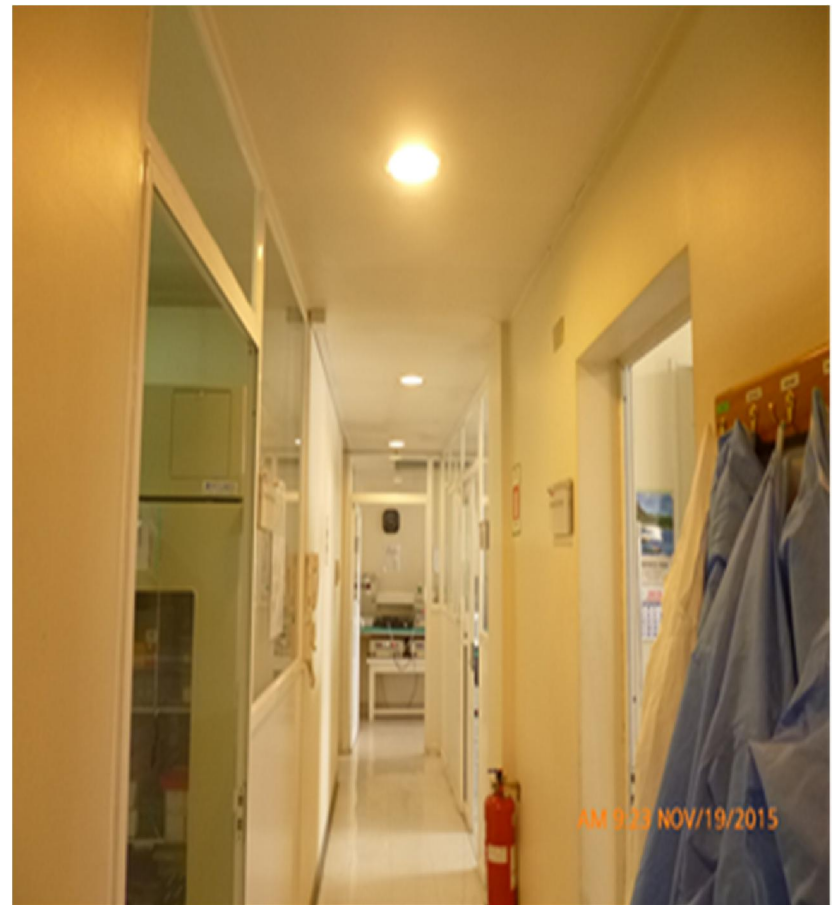


Sub-Departamento de Genetica Molecular



# Sub-Departamento de Genetica Molecular.

- PhD. Jorge Fernandez. Biologo Molecular
- Bioq. Carolina Aguayo.



# Electroforesis de Campo Pulsado.

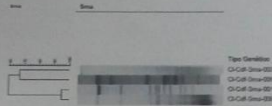


- Esta técnica separa moléculas de DNA en matrices de agarosa, sometiéndolas en campos eléctricos que se alternan en dos direcciones.
- Se considera el “Gold standard” de los métodos de tipificación molecular de cepas bacterianas.
- Permite separar moléculas desde 20 Kpbs hasta 10 Mpbs.

Subtipificación Molecular de *Clostridium difficile* mediante PFGE

1. DESCRIPCIÓN

El estudio de *Clostridium difficile* consiste en identificar los diferentes subtipos genéticos que circulan en el país. Esto ha permitido obtener una base de datos nacional con los diferentes subtipos obtenidos desde el año 2011. Desde el 2011 hasta el presente año se han detectado 113 subtipos diferentes, siendo el clon CL-CDF-SMA-001 el más predominante, presente en el alrededor del 70% de las muestras recibidas entre los años 2011 y 2015. En la Figura se muestran los subtipos predominantes entre los años 2011 y 2015.



2. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

2.1 Ingreso muestra

Las muestras llegan en tubo con 5 mL de cultivo de caldo cerebro corazón, debe incluir un tubo solo con medio de cultivo para usar como blanco en lectura de espectrofotómetro.

2.2 Preparación de la muestra

- 2.2.1 Preparación del material de trabajo se realiza según el punto 7.5.1
- 2.2.2 En el gabinete de bioseguridad se realiza el traslado de la muestra a los tubos Falcón de 5 mL, previamente rotulado con número consecutivo de acuerdo a la ficha de trabajo.
- 2.2.3 Medición en espectrofotómetro realizar según punto 7.5.3. las muestras se trabaja duplicado.
  - Traspasar 500 µL de la muestra a la cubeta y medir en espectrofotómetro. La medición debe tener un 0,6 a 0,8 OD.
  - A cada tubo Eppendorf 1,5 mL se traspasa los 500 µL de la muestra.
- 2.2.4 Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto
- 2.2.5 Eliminar el sobrenadante en un tubo Falcón de 15 o 50 mL que contenga hipoclorito de sodio al 1%
- 2.2.6 Resuspender el pellet en 200 µL de Buffer CLB-CD
- 2.2.7 Se prepara dos plugs por tubos. Se agrega 200 µL de agarosa 1% TE con Si mezclar 2 veces. (TECL-MSA-K?) NO
- 2.2.8 Tomar los 200 µL y rellenar los pocillos de los moldes de los plug, previamente rotulados. Dejar solidificar.
- 2.2.9 Lisis de las células en los "plugs" de agarosa. Seguir los pasos como indica punto 7.5.8.
  - Primera incubación.
    - ◊ A cada tubo falcón de 50 mL se le agrega:
      - 2000 µL de Buffer CLB-CD
      - 200 µL Lisozima al 20mg/mL
      - 5 µL Mutanolisina SU/ µL

- ◊ Se coloca los plugs al tubo falcón de 50 mL, correspondiente
  - ◊ Incubar los tubos a 37°C (± 2 °C), en un baño termostático por 2 horas.
  - Segunda incubación
    - ◊ Eliminar el buffer de la incubación anterior.
    - ◊ Agregar a cada tubo:
      - 2000 µL Buffer PK 1
      - 20 µL Proteinasa K
    - ◊ Incubar a 54 (± 2 °C) en baño termostático con agitación por toda la noche (ON).
  - 2.2.10 Lavados de los plugs. Seguir las instrucciones del punto 7.5.9. *NO LAVAR CON AGÜA?*  
 Descartar el Buffer de lisis y agregar 15 mL Buffer TE 1X previamente calentado a 54°C (± 2 °C). Lavar 3 veces seguidas y luego por un intervalo de tiempo de 5, 10, 15 y 20 minutos.
  - 2.2.11 Transferir los plugs a un tubo criotubo rotulado como indica la letra I del punto 7.5.9.
- 2.3 Digestión del plug con enzima de restricción  
 Seguir las instrucciones del punto 7.5.10.

Reactivo	Volumen por plug preparado
Agua destilada desionizada	176 µL
Buffer	20 µL
Enzima de restricción Sma I (10U/ µL)	4 µL
Volumen total	200 µL

Temperatura de incubación de la enzima Sma I es de 30°C

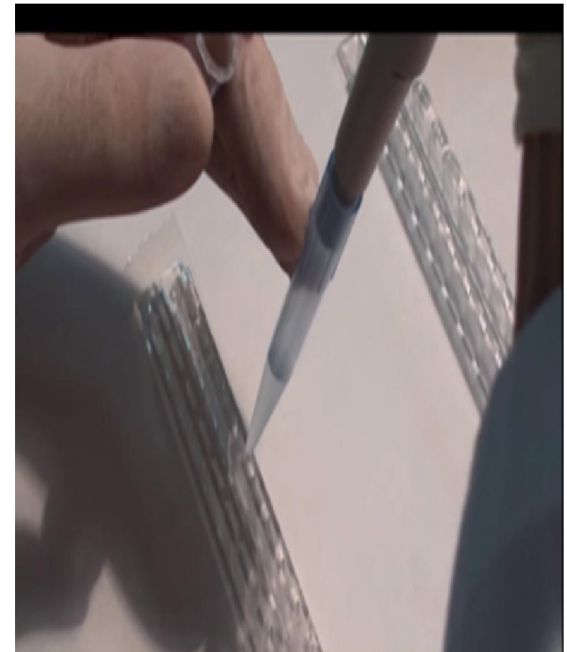
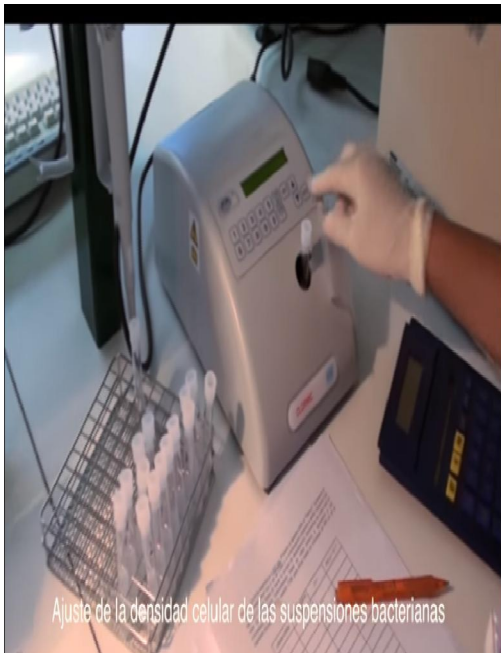
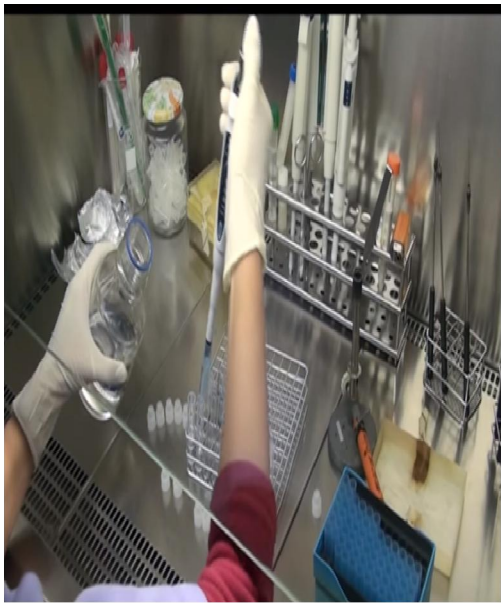
- 2.4 Preparación del gel de agarosa para PFGE, siembra de los plugs, tinción y documentación del PFGE.  
 El pulso de corrida de *Clostridium Difficile* es 1-40s por 18 horas *{ 18h }*.  
 Seguir las instrucciones del punto 7.5.11 al 7.7.1.  
*• THUBICA 1000 µL → 200 µL de TECL-MSA-K (a la cubeta) -*
- 3. Análisis en Bionumerics: se debe ingresar el gel al software según IT-250.01-007 Análisis PFGE en Programa Bionumerics. Seguir con el paso 7.10.11. La nomenclatura del subtipo es la siguiente: Cl-Cdf-Sma-XXX.
- 4. Expresión de resultados  
 Los resultados deben ser informados como lo indica el punto 7.15 con el siguiente formato.

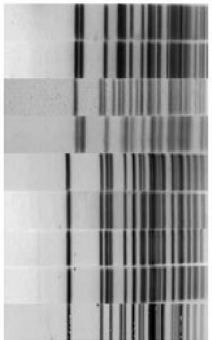
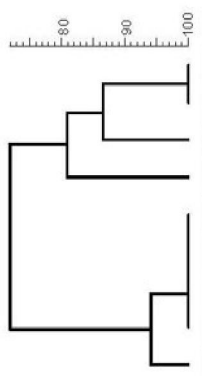
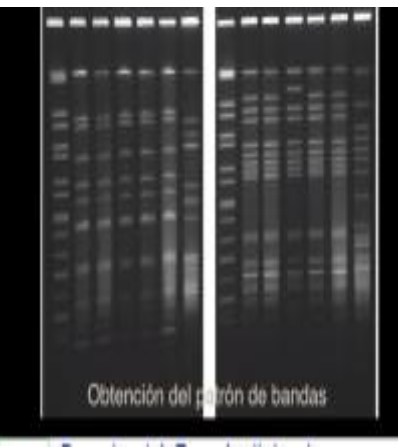
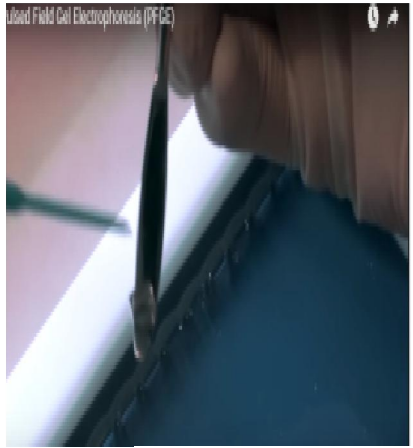
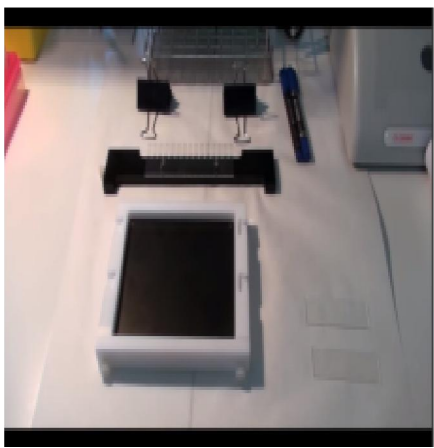
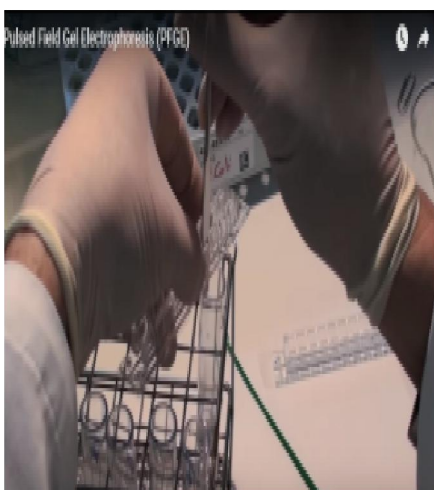
Número laboratorio ISP	Nombre paciente	Apellido paterno paciente	Apellido materno paciente	Procedencia de la muestra	Resultado PFGE

*• identificación longer...*

- Técnica estandarizada en Quebec - Canadá.
- POE de PFGE *Clostridium difficile*.
- Cepas de *Clostridium difficile*. (22)
- Procesamiento de las cepas.
- Análisis de resultados en software.







Strain	Type A clade
UT07-4632	A2
UT07-4633	A2
WY96-3418	A2
ATCC 6223	A2
SCHU S4	A1
UT07-4262	A1
UT07-4263	A1
UT07-4265	A1
MA00-2972	A1

Obtención del patrón de bandas

REALIZADO POR: VERONICA ORREGO M.

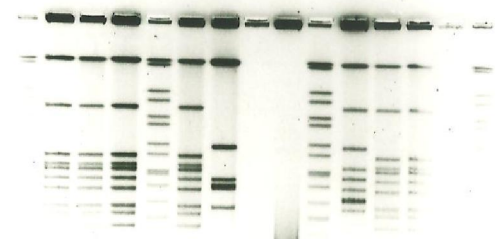
FECHA: 20

**B- DIGESTION CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN Y ELECTROFORESIS**

Nº Carril	Origen	Nº ISP	Enzima restricción	Fecha repetición	Subtipo	Subtipo nuevo
1	SB	-	XbaI			
2	C. difficile A 380-2015		SmaI			
3	C. difficile A 381-2015					
4	C. difficile A 382-2015					
5	SB	-	XbaI			
6	C. difficile A 385-2015		SmaI			
7	C. difficile A 388-2015					
8	C. difficile A 389-2015					
9	C. difficile A 390-2015					
10	SB	-	XbaI			
11	C. difficile A 391-2015		SmaI			
12	C. difficile A 392-2015					
13	C. difficile A 393-2015					
14	C. difficile A 395-2015					
15	SB	-	XbaI			

XbaI x 5  
SmaI x 12  
H<sub>2</sub>O 280  
B 100  
E 20  
H<sub>2</sub>O 210  
B 24  
E 4

CLSPCD15002V (Raw 1-D Image)



CLSPCD15002V (Raw 1-D Image)



**Antecedentes de Reactivos**

Nombre Enzima	XbaI	SmaI
Nº lote buffer	129797	129797
Nº lote enzima	231928	221308
Unidad	40U	40U
Temperatura incubación	37°C	36°C

**Condiciones de corrida**

Equipo N°	27 B
Pulsos	7-40
Tiempo	18.
Temperatura	14 °C
Temp. ambiente	21,5
Humedad Amb.	34

Observación:

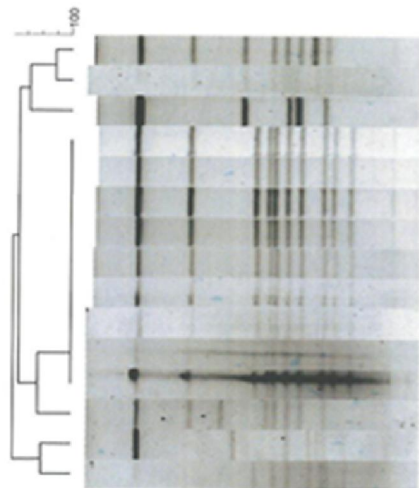
**C. ANALISIS BIOINFORMATICO**

Normalización Bionumerics \_\_\_\_\_  
Gel Interpretado por \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_ Aprob \_\_\_\_\_

Nº Informe \_\_\_\_\_ Fecha Informe \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Sma

Sma



Key	Origen de la muestra	Edad	Año	Tipo Genético	Procedencia de la muestra
391-15/#1	DEPOSICION	43	2015	Cl-Cdf-Sma-082	HOSPITAL CLINICO HERMINDA MARTIN
410-15/#1	DEPOSICION	87	2015	Cl-Cdf-Sma-003	HOSPITAL CLINICO HERMINDA MARTIN
388-15/#1	DEPOSICION	70	2015	Cl-Cdf-Sma-048	HOSPITAL PADRE ALBERTO HURTADO
380-15/#1	DEPOSICION	55	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL LEONARDO GUZMAN
381-15/#1	DEPOSICION	68	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL CESAR GARAVAGNO BUROTTO TALCA
382-15/#1	DEPOSICION	70	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL CESAR GARAVAGNO BUROTTO TALCA
385-15/#1	DEPOSICION	58	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL CESAR GARAVAGNO BUROTTO TALCA
392-15/#1	DEPOSICION	75	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL CLINICO HERMINDA MARTIN
393-15/#1	DEPOSICION	70	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL CESAR GARAVAGNO BUROTTO TALCA
398-15/#1	DEPOSICION	49	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL EL CARMEN DR.LUIS VALENTIN FERR
406-15/#1	DEPOSICION	57	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL CESAR GARAVAGNO BUROTTO TALCA
407-15/#1	DEPOSICION	98	2015	Cl-Cdf-Sma-001	HOSPITAL EL PINO
404-15/#1	DEPOSICION	73	2015	Cl-Cdf-Sma-114	HOSPITAL EL CARMEN DR.LUIS VALENTIN FERR
403-15/#1	DEPOSICION	63	2015	Cl-Cdf-Sma-007	HOSPITAL EL CARMEN DR.LUIS VALENTIN FERR
408-15/#1	DEPOSICION	94	2015	Cl-Cdf-Sma-022	HOSPITAL EL PINO

# MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST).





# PROCEDIMIENTO MLST.

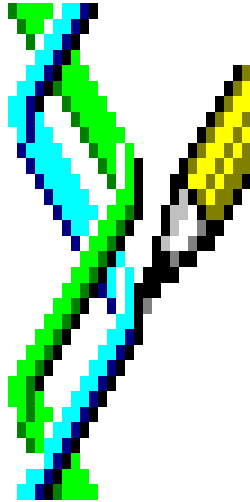
- Extracción y purificación del ADN bacteriano ( chequeo en gel de Agarosa la presencia de ADN).
- PCR de Amplificación de los 7 genes ( adk, atpA, dxr, glyA, recA, sodA, tpi).
- Purificación de productos de Amplificación.
- Medición de la concentración de ADN.
- Chequeo de bandas en gel de Agarosa.
- **Secuenciamiento.**
  - PCR asimétrico para secuenciamiento.
  - Purificación de la muestra.

Análisis de las secuencias.





# BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT



BioEdit Sequence Alignment Editor

File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

C:\Users\DELL\Downloads\adk (1).fas

4 total sequences

Mode: Select / Slide Selection: null Position: 1:183 Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1

1 CATATATCAACAGGAGATATATTCAGAAAGAAATAAAAAGAGGGAAACAGAACTTGGAAAAAAGCTAAAGAAATACATGGACCAAGGTTTATTAGTACCAGATGAGTTAACTGTAGGTTTAGTTACTGA  
A382-2015 CATATATCAACAGGAGATATATTCAGAAAGAAATAAAAAGAGGGAAACAGAACTTGGAAAAAAGCTAAAGAAATACATGGACCAAGGTTTATTAGTACCAGATGAGTTAACTGTAGGTTTAGTTACTGA  
A388-2015 CATATATCAACAGGAGATATATTCAGAAAGAAATAAAAAGAGGGAAACAGAACTTGGAAAAAAGCTAAAGAAATACATGGACCAAGGTTTATTAGTACCAGATGAGTTAACTGTAGGTTTAGTTACTGA  
A391-2015 CATATATCAACAGGAGATATATTCAGAAAGAAATAAAAAGAGGGAAACAGAACTTGGAAAAAAGCTAAAGAAATACATGGACCAAGGTTTATTAGTACCAGATGAGTTAACTGTAGGTTTAGTTACTGA

BioEdit Sequence Alignment Editor

File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

C:\Users\DELL\Downloads\adk (1).fas

4 total sequences

Mode: Select / Slide Selection: null Position: Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1

1 TATGCCAAGGAGAAATTATATCAAAAGAGCTGATGATAATGAAGAAACTGTATCTAAGAGAAATACAAAGTTTATCTAGATGAAACTAAGGCTTTAGTAGATTATTATAGCAAAACAAGGTATAATAGCAGAT  
A382-2015 TATGCCAAGGAGAAATTATATCAAAAGAGCTGATGATAATGAAGAAACTGTATCTAAGAGAAATACAAAGTTTATCTAGATGAAACTAAGGCTTTAGTAGATTATTATAGCAAAACAAGGTATAATAGCAGAT  
A388-2015 TATGCCAAGGAGAAATTATATCAAAAGAGCTGATGATAATGAAGAAACTGTATCTAAGAGAAATACAAAGTTTATCTAGATGAAACTAAGGCTTTAGTAGATTATTATAGCAAAACAAGGTATAATAGCAGAT  
A391-2015 TATGCCAAGGAGAAATTATATCAAAAGAGCTGATGATAATGAAGAAACTGTATCTAAGAGAAATACAAAGTTTATCTAGATGAAACTAAGGCTTTAGTAGATTATTATAGCAAAACAAGGTATAATAGCAGAT



[Help](#)

## Sequence query - *Clostridium difficile* locus/sequence definitions

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences. [?](#)

— Please select locus/scheme — Order results by —

All loci  locus

— Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size) —

— Alternatively upload FASTA file —

Select FASTA file:

Seleccionar archivo Ningún archivo seleccionado

— or enter Genbank accession —

Action

Sequence query - Clostridi

secuencias chile - maveor

mlstdbNet user guide

pubmlst.org/perl/biggsdb/biggsdb.pl?db=pubmlst\_cdificile\_seqdef&page=sequenceQuery



[Help](#)

## Sequence query - *Clostridium difficile* locus/sequence definitions

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences. [?](#)

— Please select locus/scheme — Order results by —

All loci  locus

— Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size) —

```
CATATATCAACAGGAGATATATTCAGAAAGAAATATAAAGAGGGGAACAGAACTTGGAAAAAAGCT
AAAGAATACATGGACCAAGGTTTATAGTACCAGATGAGTTAACTGTAGGTTTAGTTACTGATAGA
ATATCTCAAGAAGATTGTAAAAATGGATTATGTTAGATGGATTTCCAAGAAATGTAGCACAAAGGA
GAACATTAGATATCTTCTAAAAAATGCTGGTATATCACTAGATAAAGTTGTCAATATTGAAGTT
GATAAAGATATATAGTGTCTAGAGCAGTTGGTAGAAGAATATGTAAGTCTTGTGGAGCTACTTAC
```

— Alternatively upload FASTA file —

Select FASTA file:

Seleccionar archivo Ningún archivo seleccionado

— or enter Genbank accession —

Reset

Submit

## Sequence query - Clostridium difficile locus/sequence definitions

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences.

Please select locus/scheme — Order results by —  
 adk locus (single or multiple contigs up to whole genome in size)  
 Alternatively upload FASTA file — or enter Genbank accession — Action  
 Select FASTA file:     
 Seleccionar archivo Ningún archivo seleccionado  
 ATATATT CAGAAA GAATATA AAAAGAGGGAACGAGA ACTTGAAAAAAGCT  
 AAGGTTTATTAGTACCAGATGAGTTAACTGTAGGTTTAGTTACTGATAGA  
 STAAAAATGGATTATGTTAGATGGATTTCCAAGAAATGTAGCACAAGGA  
 ICTTAAAAATGCTGGTATATCACTAGATAAAGTTGTCAATATTGAAGTT  
 TGTCTAGAGCAGTTGGTAGAAGAATATGTAAGTCTTGTGGAGCTACTTAC

## Sequence query - Clostridium difficile locus/sequence definitions

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences.

Please select locus/scheme — Order results by —  
 adk locus  
 Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size)  
 Alternatively upload FASTA file — or enter Genbank accession — Action  
 Select FASTA file:     
 Seleccionar archivo Ningún archivo seleccionado

1 exact match found.

Allele	Length	Start position	End position
adk: 1	501	1	501

## Search *Clostridium difficile* locus/sequence definitions database by combinations of loci

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored. Autofill profile

adk	atpA	dxr	glyA	recA	sodA	tpi

ST:

Options Display/sort options Action

Search:  Order by: ST  ascending

Display:  records per page [i](#)

## Search *Clostridium difficile* locus/sequence definitions database by combinations of loci

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored. Autofill profile

adk	atpA	dxr	glyA	recA	sodA	tpi
1	1	1	10	1	3	5

ST:

Options Display/sort options Action

Search:  Order by: ST  ascending

Display:  records per page [i](#)

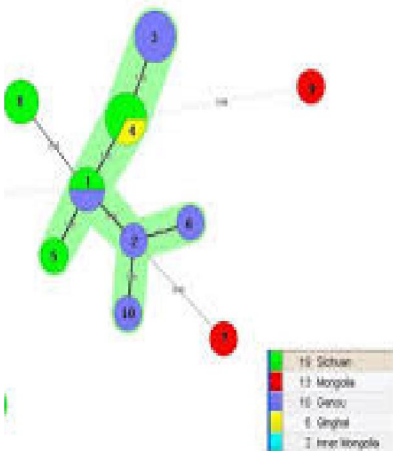
Exact matches found (7 loci).

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	adk	atpA	dxr	glyA	recA	sodA	tpi	mlst	clade
1	1	1	1	10	1	3	5	2	

Analysis tools:

Export:



**GRACIAS.**