

PROTOCOLOS RED DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LOS MICROORGANISMOS
RESISTENTES (RedLabRA)

**Estudio de cepas de enterobacterias mediante electroforesis en campo
pulsante (PFGE)**

Aprobado por:	Código:	RedLabRa-I-001
Fecha: 15/02/2021	Ed.:	01
Firma:	Fecha edición:	15/02/2021

OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

La instrucción describe el método molecular de estudio de cepas clínicas de Enterobacterias mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE).

RECURSOS MATERIALES

EQUIPOS

- CHEF DR.
- Estufa.
- Espectrofotómetro.
- Baño termostataado.
- Termobloque.
- Microondas/hornillo.
- Centrífuga.
- Vortex.
- Molde y peines CHEF DR para gel.
- Moldes para bloques de PFGE.
- Tubos eppendorf 1 ml.
- Tubos Greiner 5 ml.
- Tubos Bijoux 2 ml.

REACTIVOS

- Placas de Müller Hinton.
- Agarosa PFGE.
- Proteinasa K.
- Enzima de restricción: Elegir la que corresponda dependiendo de la enterobacteria a tratar (la mas usada es la XbaI)
- Buffer H.
- Agua destilada libre de nucleasas.
- Ladder de peso molecular.
- Búferes: SE PH 7,5. Lisis PH 9,5, TE, TBE PH 8

REALIZACIÓN

1º día

- Subcultivar las cepas a media placa de **Müller-Hinton** e incubar en la estufa a 35±2°C hasta el día siguiente.
- Rotular:
 - Tubos eppendorf con **1 ml de buffer SE pH 7.5** (1 tubo por muestra).
 - Tubos eppendorf vacíos (1 tubo por muestra).
 - Tubos greiner con **4.6 ml de buffer SE pH 7.5** (1 tubo por muestra).
 - 1 tubo greiner con **5 ml de buffer SE pH 7.5** que servirá como blanco.
 - Tubos bijoux (1 tubo por muestra).
- Preparar:

- Agarosa 1% (**1g de agarosa en 100 ml de buffer SE pH 7.5**).
- **Moldes de plástico** para dispensar agarosa (3 pocillos por muestra). Les ponemos cinta de autoclave para que no se nos salga la agarosa y rotulamos los números de las cepas.

2º día

- Encender el espectrofotómetro 15 min antes.
- Calentar en microondas (100°C) la agarosa para bloques pesada el día anterior hasta que se disuelva bien y mantener en baño termostataado a 56°C hasta su utilización para bloques.
- Tomar un asa de cultivo morada (10µl) de cada cepa y resuspender en cada tubo eppendorf con 1 ml de SE PH 7.5 (**suspensión nº 1**).
- Transferir 0.4 ml de suspensión nº1 al tubo greiner con 4.6 ml de buffer SE PH 7.5 (**suspensión nº2**). Vortear.
- Medir la absorbancia a 420 nm.
 - Ajustar la densidad óptica a 420 nm. Antes de poner el blanco ajustar la transmitancia a cero.
 - Ajustar la absorbancia a cero con el blanco. A continuación, introducir los tubos greiner con las suspensiones problema y medir la absorbancia.
- Con ayuda de las tablas (obtenidas tras la curva de calibrado), determinar el volumen a tomar de:
 - Suspensión bacteriana (**suspensión nº1**).
 - Buffer SE PH 7.5.El volumen final será de 0.5 ml.

Esto constituirá la (**suspensión nº3**) (que contiene 10⁹ ufc/ml).

- Introducir estos tubos eppendorf con la solución nº3 en el baño termostataado a 56°C.
- Trasvasar 0.5 ml de agarosa (también en el baño a 56°C) a cada eppendorf y homogeneizar bien (**suspensión nº4**).
- Tomar 0.5 ml de suspensión nº4 y rellenar los 3 pocillos del molde por cada muestra.
- Introducir el molde en la nevera (4°C durante 10min) para que solidifique.
- Preparar la solución de lisis bacteriana:
 - **Buffer de lisis PH 9.5** → 1ml/muestra.
 - **Proteinasa K** →20 µl/muestra.
- Repartir 1 ml de la solución de lisis con proteinasa K a cada bijoux.
- Quitar el exceso de agarosa con la paleta e introducir los bloques en los bijoux con la ayuda de un asa de 1ul, comprobar que quedan bien recubiertos con la solución de lisis.
- Incubar a 56°C durante 4h.
- Pasado ese tiempo quitar la solución de lisis y repetirla y dejar incubar overnight a 56°C.

3º día

- Eliminar la solución de lisis.
- Hacer 8 lavados con **buffer TE PH 7.5**, echando 1.5 ml del buffer a cada bijoux y dejando 20 min entre cada lavado a 4°C.
- Conservar los bloques en TE PH 7.5 a 4°C.

4º día

- Rotular 1 tubo eppendorf por cada muestra.
- Preparar estabilización:
 - **Buffer H** → 10 µl/muestra.
 - **Agua libre de nucleasas** → 90 µl/muestra.(Se recomienda preparar la mezcla para todas)
- **Añadir 100 µl de la solución de estabilización** a cada eppendorf.
- Cortar un tercio (transversal) del bloque de agarosa y añadirlo en el eppendorf (comprobar que queda bien recubierto el bloque).

- **Mantener 30 min en nevera a 4°C.**
- Con micropipeta eliminar la solución de estabilización.
- Preparar digestión:
 - **Buffer H** → 10 µl/muestra.
 - **Agua libre de nucleasas** → 86 µl/muestra.
 - **Enzima** → 2,4 o 5 µl/muestra. (dependiendo de la enterobacteria con la que se esté trabajando)
 - (preparar la mezcla para todas)
- Añadir **100 µl de la solución de digestión a cada eppendorf** (comprobar que el bloque queda bien recubierto).
- Mantener los bloques **3 h en calor seco** (termobloque o estufa) a 35±2°C.
- Preparar:
 - Gel de agarosa en proporción 1% en buffer TBE 0.5X.
(150 ml buffer TBE 0.5X + 1.5 g agarosa de bajo punto de fusión).
 - 2 L de buffer TBE 0.5X PH 8
(1900 ml de Agua destilada + 100 ml de TBE 10X).

Conservar en nevera a 4°C hasta su uso.

- Disolver la agarosa en microondas y mantener en baño a 56°C hasta su utilización.
- Disponer el molde correspondiente y colocar el peine (doble) para formar los pocillos.
- Verter la agarosa a 56°C y dejar solidificar. Dejar un poco de agarosa en el baño para sellar después los pocillos del gel.
- Retirar el peine. El gel puede conservarse en nevera, cubierto con papel de aluminio para evitar deshidratación, hasta su utilización.
- **Añadir 100µl de buffer TE PH 7,4** en cada eppendorf con los bloques digeridos para detener la actividad enzimática.
- Poner el ladder en el primer pocillo y en el último.
- Introducir cada bloque digerido en cada pocillo procurando situarlo en la parte inferior y perfectamente adherido al gel (sin burbujas de aire).
- Sellar los pocillos con la agarosa reservada en el baño y esperar a que gelifique.
- Desmoldar el gel y limpiar la bandeja inferior para que no queden restos de agarosa.
- Añadir los 2 litros de Buffer 0.5X en el aparato CHEF DR.
- Introducir el gel en la posición de electroforesis:
 - Conectar la bomba de flujo y fijar la temperatura.
 - Bomba entre **80 y 90**.
 - Temperatura **12°C**.Asegurarse de que la recirculación de buffer es correcta.
 - Conectar CHEF DR.(condiciones válidas para ciertas enterobacterias)
 - Pulso inicial: **1s**.
 - Pulso final: **50s**.
 - Tiempo: **23h**.
 - Voltios: **6**.

5º día

- Apagar el CHEF DR y la bomba.
- Retirar el gel del CHEF DR y disponerle en una bandeja.
- Evacuar el buffer y limpiar la cubeta para que no queden restos y cuidado con no presionar los electrodos al limpiarlos.
- Teñir el gel con el colorante elegido para su posterior visualización en lector o transiluminador.