

11219

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

TIPIFICACION DE CEPAS BACTERIANAS MEDIANTE
LA ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS
PULSADOS PARA EL ESTUDIO DE BROTES
INFECCIOSOS INTRAHOSPITALARIOS

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGIA

P R E S E N T A:

DR. ELIAS ASTUDILLO NAVARRETE

ASESORES

DR. FELIPE GONZALES VELÁSQUEZ
QBP. LOURDES OSORIO CARRANZA
DR. RAMON FAJARDO VELAZQUEZ



IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

MÉXICO, D.F.

MARZO 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Carlos Hermida Escobedo
Jefe de Educación e Investigación Médica
H.I.C.M. "La Raza"

Dra. Elena Urdez Hernández
Titular del Curso de Infectología

Dr. Felipe González Velázquez
Asesor de tesis

Eliás Astudillo Navarrete
Residente de 6º año de Infectología

Número definitivo del protocolo: 201 693 0049



DIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M

ASESORES:

Dr. Felipe González Velázquez
Q.B.P. Ma. de Lourdes Osorio Carranza
Dr. Ramón Fajardo Velázquez

COLABORADORES:

Q.B.P. Laura Angélica Javier González
T.L.C. Laura Gabriela Medina Mateos
Q.F.B. Isaías Sánchez González
T.L.C. Rafael Fuentes García
T.L.C. Mario Padilla Laguna

DEDICATORIA:

A mis padres, sobretodo a mi madre por enseñarme a llevar a fin todos los proyectos iniciados y solidarizarse con su familia en todo momento

A mi esposa Rosa Elena por soportar y comprender <aunque parcialmente>, las horas extra de trabajo empleadas

A mi hijo Alejandro quien nació en éste periodo critico de la residencia y padeció de nuestra falta de relación por algunos meses

A los pocos maestros auténticos que aún existen en el Hospital de Infectología y brindan su enseñanza clínica incondicionalmente

A los pacientes por que gracias a sus padecimientos nos inducen al estudio y actualización constante

INDICE

CARÁTULA.....	I
FIRMAS Y NÚMERO DE PROTOCOLO.....	II
ASESORES Y COLABORADORES.....	III
DEDICATORIA.....	IV
INDICE.....	V
TITULO.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	6
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVO.....	14
MATERIAL Y METODOS.....	15
DESCRIPCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXOS (Figuras y tablas).....	29
APÉNDICE.....	35

TITULO

**TIPIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS MEDIANTE LA ELECTROFORESIS
EN GEL DE CAMPOS PULSADOS PARA EL ESTUDIO DE BROTES
INFECCIOSOS INTRAHOSPITALARIOS**

Departamentos de Bacteriología, Unidad de Investigación en Infectología e Inmunología y Epidemiología Hospitalaria del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza" I.M.S.S. México, D.F.

RESUMEN: Las infecciones intrahospitalarias (IIH) constituyen un problema de salud mundial con repercusión en la morbimortalidad y los costos hospitalarios. *Pseudomonas aeruginosa* ha sido identificada como una de las principales etiologías. Se realizó un estudio clínico básico, de diseño retrospectivo y transversal que incluyó la selección de cepas de éste agente tomadas del banco de bacteriología sanitaria del laboratorio clínico, aisladas de diversos especímenes de pacientes hospitalizados durante el periodo junio-noviembre del año 2001; a las cuales se les aplicó la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP) para la digestión del DNA se empleó la enzima *SpeI*. Se analizaron un total de 19 cepas: 3 obtenidas de secreción de tejidos blandos, 5 de secreción del sitio de entrada de catéteres, una de urocultivo, cuatro de secreción de herida quirúrgica; cinco de secreción bronquial dos de lavado bronquio alveolar y una de hemocultivo. Se obtuvieron 6 cepas idénticas (33%), 2 cepas estrechamente relacionadas (11%), 4 cepas probablemente relacionadas (22%) y 6 cepas diferentes (33%). No se consideró como un brote epidémico de IIH, aunque predominó una clona N=6 (33%) que posiblemente fue causa de infección cruzada ya que las muestras procedieron de diferentes servicios, así mismo 2(11%) cepas estrechamente relacionadas consideradas como subtipos y 4 (22%) probablemente relacionadas. Finalmente 6 (33%) cepas diferentes sin relación con las infecciones cruzadas pero que posiblemente forman parte de la flora del hospital. La EGCP es una herramienta de utilidad en la identificación del genoma bacteriano que permite identificar la presencia o no de brotes infecciosos intrahospitalarios.

ABSTRACT

Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains through pulsed-field gel electrophoresis for outbreak study of nosocomial infections

Research Unity in Infectology and Immunology, Clinical Laboratory and Hospital Epidemiology; Infectious Diseases Hospital of Medical Center "La Raza" México, D.F.

Astudillo NE , Osorio CL, Fajardo VR , González VF

The nosocomial infections are a problem of health in the world with consequences in mortality and expensive cost of hospital. *P. aeruginosa* has been isolated like one of main etiologies. We made a clinical basic study, a transverse, retrospective design. We choosed strains of this agent in clinical laboratory from various specimen of patients at the hospital during June to November of 2001 with performance of the pulsed-field gel electrophoresis (PFEG) for every one, use up the *SpeI* enzyme for digestion of DNA. Nineteen strains were analyzed, three belonging to secretion in soft tissues infections, five of secretion of intravascular catheters, one of urinary culture, four from quirurgical wound, five from bronchial secretion, two of bronchi alveolar washes and one of blood culture. We detected 6 (33%) identical strains, 2 (11%) closely related, 4 (22%) not closely related and 6 different strains. It was not estimated as an epidemic outbreak of nosocomial infection although overlook a clone N=6 (33%) than probably was cause of cross infections because the specimen was isolated from various services, thus 2 strains (11%) were closely related and were defined like subtypes; 4 (22%) like not closely related and 6 (33%) different strains. PFEG is a useful tool for identification of bacterial genoma and allow to identify or not outbreak infections.

INTRODUCCIÓN: Las infecciones nosocomiales o intra hospitalarias (IIH) son adquiridas por los pacientes como consecuencia de su atención en los hospitales, de acuerdo con el CDC (Centro para el Control de Enfermedades) de Atlanta, GA USA un caso de infección nosocomial se definen como la condición localizada o generalizada resultante de la reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso o su toxina y que no estaba presente o en periodo de incubación al momento del ingreso del paciente al hospital, y que se presenta en 48 a 72 horas posteriores al ingreso hospitalario; definición que ha sido aceptada y adoptada en nuestro país publicada en el diario oficial de la federación el 30 de marzo del 2000 Así mismo un brote epidemiológico de infección nosocomial es la ocurrencia de dos o más casos de infección nosocomial, asociados epidemiológicamente en un número mayor a lo esperado; y en hospitales donde dicha ocurrencia epidemiológica sea nula, la presencia de un solo caso de define automáticamente como un brote de infección nosocomial (1) En nuestro país el programa nacional de Redes Hospitalarias de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) indican que ocurren en promedio en el 10% de los pacientes hospitalizados (el doble de lo reportado en E U), es decir una ocurrencia anual de 400,000 a 600,000 episodios con impactos desfavorables en la mortalidad, estancia hospitalaria y costos económicos La mortalidad a causa de las mismas se estima en un 5-10%, es decir 40,000 a 60,000 fallecimientos al año (2,3)

Respecto al sitio afectado y agente causal de éste tipo de infecciones está estrechamente relacionado, por ejemplo las infecciones nosocomiales más comunes son las IVU y el gèrmen más frecuentemente aislado es *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *Cándida ssp*, seguidas de las infecciones de dispositivos intravasculares causadas por estafilococo coagulasa negativo siendo el más aislado *S. epidermidis*, y también las neumonías por hipostatismo donde el gèrmen más aislado es *P. aeruginosa*, *S. aureus* y especies de *Enterobacterias* (4),

Desde el punto de vista epidemiológico hay sospecha de un brote infeccioso nosocomial cuando la tasa mensual de una infección particular excede el 95% de intervalo confidencial basado en la tasa del año previo para ese mes, estando justificada una investigación (5), la cual estará dirigida a conocer si el brote es causado por una sola cepa o si es causado por cepas diferentes en lo cual se podrá echar mano de los recursos disponibles que haya en el hospital afectado con el objeto de evitar la propagación mayor del brote, controlar el mismo y tratar adecuadamente de acuerdo al antibiograma para reducir las posibilidades de resistencia bacteriana; dichos recursos como se ha mencionado pueden consistir desde el estudio epidemiológico con el que debe contar todo hospital de cualquier nivel, hasta técnicas de laboratorio sofisticadas como lo es la biología molecular que son más específicas en la identificación de dicho brote.

Por lo anterior decidimos realizar éste estudio a 10 años de patentados los reactivos para su realización en Estados Unidos de Norteamérica <aunque no del todo utilizado, posiblemente por lo costoso de los mismos> y una vez que continua habiendo la presentación de brotes infecciosos nosocomiales sin ser la excepción el Hospital de Infectología de éste Centro Médico considerado de tercer nivel de atención y también a que tuvimos la disponibilidad de aplicar la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) desde el punto de vista de recursos físicos para llegar a tipificar el DNA bacteriano de cada una de las cepas involucradas y conocer cuales correspondieron a la misma cepa y cuales se discriminaron. Se trabajó con un grupo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que son consideradas una causa importante de infecciones nosocomiales particularmente en neumonías por hipostatismo, aunque en éste presunto brote se aisló también de otros especímenes como urocultivo, secreciones de tejidos y secreciones bronquiales así como hemocultivo en 1 sólo caso. El interés de realizar el estudio se acrecentó debido a la alta tasa de resistencia a antibióticos observada en dichas cepas de *P. aeruginosa* lo cual además de agravar el perfil clínico del paciente afectado exige el desarrollo de nuevos antibióticos y también más seguros desde el punto de vista farmacodinámico lo que redundaría en un costo extra para los recursos del hospital o del paciente según se de el caso a nivel institucional o privado respectivamente.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

Con el advenimiento de nuevas técnicas de apoyo diagnóstico se ha fortalecido la posibilidad de confirmar lo que en otros tiempos se planteaba con el empleo de métodos estadísticos y epidemiológicos, que si bien no son del todo exactos, su uso tampoco puede desecharse en el quehacer de detectar la causa de las fluctuaciones de las enfermedades y brotes de las mismas.

Uno de los conocimientos recientes al respecto es lo que se ha dado en llamar epidemiología molecular que se ha definido por Higginson como "la aplicación de técnicas sofisticadas en los estudios epidemiológicos de material biológico " así mismo se propone que la biología molecular debiera ser una subdisciplina de la epidemiología por que de hecho consiste en la aplicación de biomarcadores moleculares en estudios epidemiológicos en diversas áreas como la clínica, la genética, ambiental, etc. (6)

Sin embargo conlleva la presencia de recursos humanos capacitados y la infraestructura de laboratorio necesaria para aplicar dicha tecnología, siendo las técnicas de medición o exposición o enfermedad que no sean invasivas, de bajo costo, reproducibles y aplicables a grandes poblaciones las que serán elegibles.

En la pasada década de los 90's se acrecentó el interés en las técnicas moleculares para el análisis epidemiológico de los brotes infecciosos, lo cual condujo al uso del término *Epidemiología Molecular*. Desde que el DNA cromosomal representa una molécula fundamental para la identificación celular, ha resultado de particular interés en la evaluación de la similaridad cromosomal como una medida epidemiológica (7)

En la actualidad están disponibles varios métodos usados en estudios epidemiológicos para la identificación de gérmenes causales de brotes infecciosos tales como la tipificación serológica, biotipo, análisis de plásmidos, fago tipos ribotipos (8)

Se ha determinado en algunos estudios realizados en Japón que la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) puede ser utilizada para subclasificar aislamientos esporádicos o brotes diarreicos bacterianos en particular con cepas de *Campylobacter jejuni*, donde se describe como una herramienta epidemiológica efectiva y altamente específica (9)

Sin embargo tienen ciertas desventajas de significancia debido a que algunos reactivos especiales no están disponibles comercialmente, otros estudios no tienen suficiente grado de especificidad. La digestión enzimática cromosomal y electroforesis convencional produce muchos fragmentos para un análisis conveniente. La amplificación al azar del DNA polimórfico (RAPD) se ha establecido como una herramienta en estudios filogenéticos y en investigaciones de brotes microbianos en hospitales y en la industria procesadora de alimentos y se ha utilizado como prueba suplementaria (10)

Más recientemente se ha empleado también la reacción en cadena de polimerasa basada en secuencia iterativa (Rep-PCR) y se ha comparado con la electroforesis en campos pulsados en la identificación microbiológica de infecciones nosocomiales específicamente en la detección de cepas de *Staphylococcus aureus* particularmente del *S. aureus* metilino-resistente (MRSA) donde la PFGE se define como un método seguro y reproducible aunque es tedioso y consume mucho tiempo en relación a Rep-PCR que es más fácil de realizar siendo ésta última el sistema ideal para tipificar cepas de bacterias cuya identificación debe ser rápida para el control del brote (11)

En otros Países como Taiwán se reporta la utilidad de la PFGE para la detección de un brote infeccioso por *S. marcescens* en una unidad de cuidados intensivos neonatales, considerado como un método altamente discriminatorio para una investigación epidemiológica completa del brote en cuestión; en ese mismo país la experiencia con cepas de *K. pneumoniae* causales de un brote hospitalario estudiado se demostró que fue inducido por la misma cepa de la bacteria y cuyo origen presuntamente eran los lavabos y la transmisión por medio de las manos del personal de salud (12,13).

Así mismo la PFGE puede ser empleada para dilucidar la estructura genómica de ciertos grupos bacterianos como el caso de un estudio italiano que explora bacterias del género *Wolbachia* que son patógenos intracelulares obligados que infectan una amplio número de especies artrópodos e insectos donde se les ha atribuido diversas modificaciones reproductivas al huésped, así como la virulencia sobre *Drosophila melanogaster* donde *Wolbachia ssp.* es requerida para la fertilidad y desarrollo normal de las formas adultas que éstas infectan. En dicho estudio se determinó la forma circular del genoma y el extremo tamaño del mismo en relación con otras bacterias de vida libre como *E. coli*. (14)

En un estudio reportado en Francia recientemente se reporta la reaparición de *B. pertusis* aun después de haber mantenido la vacunación por 30 años sobretodo en trabajadores de la salud para la atención pediátrica y en base a ello se reporta un caso adquirido intrahospitalariamente demostrándose mediante PFGE que fue la misma cepa aislada de un paciente pediátrico (15,16).

Por otro lado en un estudio realizado en Bélgica la PFGE resultó de utilidad en un brote de *Enterobacter aerogenes multirresistente (MREA)* en una población hospitalaria de pacientes geriátricos hospitalizados (17)

En la Universidad de Maryland en Baltimore, USA se describe un protocolo donde se subtipificó una cepa de *Enterococo vancomicino-resistente (VRE)* donde surge la propuesta de realizar el proceso de electroforesis en menos tiempo. A éste respecto, en Holanda se llevó a cabo un análisis comparativo con cepas de VRE de las cuales el 50% eran nativas de éste país y el resto procedían de Inglaterra, correspondiendo a diferentes especies del género en cuestión siendo las más frecuentes *E. faecium* y *faecalis*; aplicándoseles por un lado amplificación aleatorizada del DNA polimorfico (RAPD), y en segundo lugar PFGE con el objeto de evaluar la calidad de cada una, teniendo como resultado una clara separación entre las cepas de ambos países desde el punto de vista de tipificación genética, así como de las cepas que contenían especies veterinarias (18,19).

Otro estudio que muestra la utilidad de la PFGE fue realizado en Francia con la determinación del tamaño del genoma de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, donde mostró la heterogeneidad de la estructura cromosomica en los diferentes serotipos de éste germen (20).

Finalmente en relación a *MRSA* que posiblemente ha sido el más estudiado con éste método y tal vez porque es la principal causa de brotes infecciosos intra hospitalarios y la complejidad de su tratamiento se citan tres estudios realizados en diferentes países como EUA donde se estudiaron cepas de *MRSA* aisladas en la década de los 60's y después de aplicárseles varios estudios de biología molecular se llegó a la conclusión del posible origen Europeo de éstas cepas estafilocóccicas, por otro lado en Polonia se realizó otro estudio con cepas de *S. aureus* coagulasa positiva y negativa y cuya estirpe fue demostrada mediante la electroforesis de campos pulsados; finalmente en Alemania se estudiaron varias cepas de *MRSA* en un hospital causantes de varios brotes infecciosos ocurridos en diferentes momentos demostrándose 2 clonas causantes del brote mas una tercera clona endémica que fue responsable de un nuevo brote en el año siguiente (21,22,23).

Para conocer el principio de la PFGE es conveniente mencionar antes lo relativo a la electroforesis en gel de agarosa convencional consiste en la tracción constante y unidireccional de moléculas de DNA cargadas negativamente en un medio con carga positiva que es el de agarosa. Bajo esas condiciones las moléculas de DNA < 40 a 50 kilobases de pares (kb) de tamaño migran a través del gel de agarosa en un tamaño dependiente de la forma. En contraste en la PFGE el flujo es multidireccional y hay un cambio continuo en la localización de la carga positiva del gel. Las moléculas de DNA responden por reorientación continua en su dirección de la migración a través del gel de agarosa.

La variedad de PFGE que difiere en como los pulsos en la corriente electroforética son repartidos en el gel de agarosa es el CHEF (Electroforesis de Campos Eléctricos Homogéneos con contorno de grapas) es el circuito más sofisticado que provee la mayoría de las condiciones para la separación electroforética de las moléculas de DNA de tamaño mega-base.

Para realizar lo anterior es necesario el aislamiento previo del cromosoma de DNA mediante digestión enzimática, mediante la lisis *in situ* de las células bacterianas fijadas en bloques de agarosa.

El cromosoma bacteriano es la molécula primaria de identidad en la célula, por esta razón, las comparaciones en relación al cromosoma mantienen una base fundamental para la comparación epidemiológica. El DNA cromosómico intacto se aísla mediante digestión con restricción enzimática. El resultado es un juego de fragmentos de DNA (normalmente 15-20) que son demasiado grande en su tamaño para ser analizado por el electroforesis de gel de agarosa convencional. Sin embargo, estos fragmentos de DNA pueden ser separados por PFGE, proporcionando así claramente los medios interpretables de evaluar la relación cromosómica entre aislados de interés epidemiológico. El análisis cromosómico por PFGE proporciona una comparación fundamental de los organismos en cuestión.

El análisis cromosómico por PFGE tiene las siguientes ventajas: a) proporciona fácilmente patrones de bandas de DNA comparable que son altamente reproducibles, no hay un organismo específico, el DNA puede ser obtenido de cualquier organismo donde el cromosoma puede ser aislado, con una inversión de tiempo global de sólo unos días se completa el proceso. Por todas estas razones, PFGE se ve ahora como el Estándar de Oro para el análisis epidemiológico de infecciones nosocomiales.

Mientras PFGE no requiere un nivel extenso de especialización técnica, sus aspectos más exigentes son: 1) la preparación de DNA cromosómico y 2) el ajuste de la electroforesis que cambia los parámetros.

Para el análisis de PFGE, se usan las enzimas de restricción de corte raro para generar un número relativamente pequeño de fragmentos de restricción cromosómica comprendiendo el genoma entero del organismo que se examina. Obtener el DNA cromosómico intacto es requerido para este proceso, se aísla para ser analizado se encajona y es lisado en el pequeño bloque de agarosa donde la hebra de DNA cromosómico soltado se protegerá previamente a la digestión de la restricción-enzimática.

Dentro de los últimos años, se ha aplicado la tecnología de PFGE al análisis genético y/o epidemiológico de por lo menos 38 grupos de patógenos específicos.

El valor clínico y económico de un plan comprensivo para el estudio de una infección nosocomial es bien conocido. Todavía varias preocupaciones comunes existen con respecto al análisis epidemiológico de infección nosocomial. Éstos incluyen: 1) los resultados inconclusos, 2) una falta de reproducibilidad, 3) prueba que sólo es con toda seguridad específico el organismo, 4) una falta de pruebas para algunos organismos y 5) la inversión de tiempo y esfuerzo requerido.

El análisis cromosómico por PFGE tiene las siguientes ventajas: 1) proporcionando bandas de DNA prontamente comparable con un patrón, 2) favorablemente reproducible, 3) No hay un microorganismo específico, 4) puede obtenerse de cualquier organismo donde el DNA cromosómico puede aislarse, 5) con la inversión de unos días en cuanto a tiempo se lleva a cabo, así como algo tan importante en éste método es que es altamente discriminativo. En suma varios estudios han documentado la superioridad de PFGE comparado con una variedad de métodos del epidemiológicos tradicionales y moleculares.

Por todas estas razones, el análisis cromosómico por PFGE se está viendo cada vez más como un Estándar de Oro para el análisis epidemiológico de infecciones nosocomiales. Es desafortunado, pero se aclara, que las infecciones nosocomiales son un asunto que continuarán ocupando la atención de la comunidad clínica dentro de los años siguientes. Parece igualmente claro que la tecnología de la PFGE sostiene la gran promesa como un elemento importante en el arsenal para la epidemiología y estudio de las infecciones (24).

JUSTIFICACIÓN

Se consideró importante estudiar un grupo de cepas de *P. aeruginosa* que fueron causa de un probable brote de IHH y detectar si estas pudieran estar presentes en la actualidad

OBJETIVO GENERAL

**TIPIFICAR GENOTIPICAMENTE UN GRUPO DE CEPAS BACTERIANAS
RESPONSABLES DE UN PROBABLE BROTE INFECCIOSO NOSOCOMIAL
MEDIANTE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS**

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal y descriptivo siendo el universo de trabajo la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología, el servicio de Bacteriología Hospitalaria del Laboratorio Clínico así como el servicio de Epidemiología hospitalaria pertenecientes al Hospital de Infectología del Centro Médico “La Raza” Dicho trabajo consistió en la aplicación de la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados a 21 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, sospechosas de ser causa de un brote hospitalario durante el periodo de junio a noviembre del 2001 en los servicios clínicos del hospital.

- Criterios de inclusión: Cepas bacterianas sospechosas de ser partícipes de un brote infeccioso hospitalario correspondiendo todas ellas al género y especie *P. aeruginosa* de acuerdo a la identificación previa ya sea por medio del método tradicional o automatizado.
- Criterios de exclusión: Cualquier cepa de la cual no se obtuvo material genético

DESCRIPCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Una vez que fue autorizado el proyecto de investigación por parte del comité local de investigación, se procedió a la captación de las cepas bacterianas procedentes de especímenes de pacientes, correspondientes al presunto brote infeccioso del mismo hospital según criterios de inclusión previamente emitidos.

Dichas cepas se sometieron al proceso de electroforesis en gel de campos pulsados con la utilización del kit para el género bacteriano correspondiente en éste caso el grupo 3 (ver apéndice) Para lo cual se procedió de la siguiente forma:

Día 1:

Inicialmente se inocularon las cepas aisladas previamente en caldo BHI (Laboratorios *Becton-Dickinson*) de corta estancia para su crecimiento en incubación a 37° C con agitación a 250 rpm; dejándose durante 20 horas para permitir su crecimiento

Día 2:

Acto seguido cada una de las muestras se inocularon en medio enriquecido de gelosa-sangre (Laboratorios *DIBICO*) para permitir el reavivamiento de las bacterias dejándose crecer por todo un día

Día 3:

En tercer lugar se tomó una colonia del medio de cultivo referido para ponerla en 3 ml de caldo BHI el cual nuevamente se mantuvo en agitación a 250 rpm a temperatura de 37° C durante 20 horas con el objeto de obtener un número apropiado de células bacterianas.

Día 4:

Se realizó inicialmente la preparación de la agarosa embebida (Laboratorios *BIO RAD*, California Estados Unidos) con su disolución en un horno de microondas transferida inmediatamente a una incubadora precalentada a 55° C con el objeto de preservarla en su estado líquido ya que por debajo de 50 grados se solidifica; con el objeto de realizar los plugs que son finalmente los pequeños bloques de agarosa que albergan el DNA bacteriano.

Seguidamente se pipetearon 250 μ l (microlitros) de cada una de las muestras del caldo de cultivo de crecimiento previo de toda la noche en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. centrifugándose a 12,000 rpm durante 2 minutos obteniéndose de ésta forma un botón precipitado formado de células bacterianas proceso conocido como empastillamiento celular cuyo tamaño estuvo determinado por un rango preestablecido por el fabricante y un sobrenadante desechado posteriormente mediante pipeteo con puntas estériles.

Una vez "empastilladas" las células bacterianas para cada una de las muestras en el fondo del tubo de microcentrifuga se resuspendieron en 150 μ l de buffer de suspensión celular (Laboratorios *BIO RAD*) pipeteando para homogeneizar las muestras y colocadas a 50° C para equilibrar durante 15 minutos. Pasado éste tiempo se adicionaron a cada una de las muestras 6 μ l de lysozima y 150 μ l de agarosa embebida mantenida previamente a 55° C mezclando rápidamente la suspensión por pipeteo y colocando acto seguido 100 μ l de dicha mezcla en cada uno de los pozos del molde siendo llenados 2 pozos por muestra, permitiendo solidificar a la agarosa por 20 minutos a temperatura ambiente dentro del molde, dicho paso tiene el objeto de lisar la pared bacteriana y dejar libre el DNA embebido en el bloque de agarosa que de ahora en adelante recibe el nombre de "plug" que en nuestro idioma el término equivale a un mini bloque de agarosa que contiene al DNA bacteriano

Transcurrido lo anterior se prepararon por cada muestra un tubo microcentrifuga estéril 500 μ l de buffer de lisis I y 20 μ l de lisozima formándose una solución precipitada blanquecina donde se agregaron los plugs de agarosa solidificados incubándose a 37° C por 1 hora sin agitación; después de transcurrido éste tiempo se enjuagaron los plugs con 1 ml. de buffer de lavado al 1X (Laboratorios *BIO RAD* California U.S.A.), el cual fue desechado posteriormente para culminar éste paso con la adición de 500 μ l de buffer de proteinasa K y 20 μ l proteinasa K (Laboratorios *BIO RAD*) mezclando las muestras por inversión y dejándose a 50° C sin agitación durante toda la noche con el objeto de desproteinizar

Día 5:

Se continuó con la aspiración y desecho de la solución de proteinasa K, la adición de 1 ml (mililitro) de buffer de lavado al 1X y a la agitación de las muestras en un rocker durante 30 minutos, paso que se repitió en 4 ocasiones para garantizar el enjuague de los "plugs" o mini bloques de agarosa con el DNA embebido

A partir de éste paso existe la opción de almacenar los plugs a 4° C en 1 ml de buffer de lavado con lo cual son estables hasta por 6 meses o continuar la digestión del DNA de las muestras con la enzima de restricción lo cual fue continuado para el caso de nuestro trabajo. En éste paso se tomó uno de los bloques de agarosa de cada muestra en un nuevo tubo de microcentrífuga con lo cual se continua el trabajo y el otro se almacena a 4° C en el tubo original que contiene 1 ml de buffer de lavado en caso de requerirse. En éste momento se tomó un plug de control del kit para asegurar que la enzima de restricción trabajara adecuadamente. A la muestra por procesar se adicionó 1 ml de buffer de lavado al 0.1X (preparado de acuerdo a la receta para la preparación del buffer) y se lavó por 30 minutos con agitación suave en un rocker a temperatura ambiente, posteriormente se desechó el buffer de lavado al 0.1X y se adicionaron 500 µl del buffer de la enzima *Spe I* (Laboratorios PROMEGA Madison, USA.) a cada uno de los plugs incubándose por 30 minutos con agitación suave en un rocker a temperatura ambiente; acto seguido se desechó el buffer *Spe I* y se adicionan 300 µl de *Spe I* buffer mas 8.3 µl de la enzima *Spe I* (Laboratorios PROMEGA Madison, USA) enzima de utilidad porque produce cortes raros en las moléculas de DNA, la cual fue extraída del congelador de -20° C mezclándose gentilmente e incubándose a 37° C durante 20 horas.

Día 6:

Después de la digestión enzimática se desecharon el buffer y la enzima *Spe I* pudiéndose almacenar los plugs en 500 ml de buffer de lavado al 1X durante 4

meses a 4° C Sin embargo para fines de completar el trabajo se optó por el corrimiento del DNA en gel para lo cual se preparó el gel de agarosa en el molde destinado para tal fin colocado sobre una placa de acrílico con el peine de 15 pozos en uno de los extremos del molde con el objeto de dejar espacios dentro del gel donde posteriormente se introdujeron los plugs conteniendo el DNA digerido sellado con agarosa de baja fusión para asegurar su estancia dentro del pozo durante el corrimiento, introduciéndose después todo el molde en la cámara de electroforesis inmerso en el buffer de corrimiento preparado con TAE (*Buffer tris-ácido bórico-EDTA*) dejándose por 24 horas con el aparato activado y programado con datos de los microorganismos del grupo 3, lo anterior con el objeto de permitir el corrimiento del DNA digerido a todo lo largo del gel de agarosa basados en el principio de que el DNA con carga eléctrica negativa en relación al buffer de corrimiento con carga positiva será atraído por éste al otro extremo del molde de agarosa.

Día 7:

En el último día del proceso se realizó la extracción del molde de la cámara de electroforesis desechándose el buffer de corrimiento y procediendo a obtener exclusivamente la placa de gel con el DNA corrido y amplificado a lo largo del gel para ser teñido con bromuro de etidio (*Laboratorios BIO RAD*) y después colocado en la cámara de luz ultravioleta donde fué fotografiado y la imagen fue guardada en el disco duro de la computadora de la unidad e impresa para el análisis e inclusión en el reporte final.

La interpretación de los resultados se realizó en base a los criterios de Tenover (26) (**Tabla 1**), la cual consiste en el análisis comparativo del patrón de bandas de las cepas aisladas que se divide en las cuatro siguientes categorías lo que constituye la variable a medir en nuestro estudio:

- Clase I: Idénticas: El patrón de bandas entre las muestras es el mismo, dándosele la misma designación.

- Clase II: Estrechamente relacionadas: Hay diferencia de 1 evento genético, con 1-3 bandas de diferencia y las muestras pueden ser designadas como subtipos.
- Clase III: Posiblemente relacionadas: Hay diferencia de 2 eventos genéticos, con 4-5 bandas de diferencia; las muestras pueden ser consideradas como subtipos. La no evidencia genética debe ser cuidadosamente considerada en éstos casos.
- Clase IV: Diferentes: Hay una diferencia de 3 eventos genéticos con más de 6 bandas de diferencia y las muestras son consideradas de diferente cepa.

RESULTADOS

Durante el segundo semestre del año 2001 de junio a noviembre se identificó un posible brote de infecciones intra hospitalarias por *Pseudomonas aeruginosa* en distintos especímenes referidos al laboratorio, específicamente al servicio de bacteriología sanitaria procedentes de los servicios clínicos del hospital de infectología, (Fig. 1). Se decidió la aplicación de la biología molecular a cada una de las cepas aisladas con el objeto de determinar si correspondían a una misma cepa o a diferentes cepas; específicamente se trabajó con la aplicación de la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) a cada una de éstas las cuales previamente habían sido plenamente identificadas mediante el método automatizado y según el antibiograma con la característica común de ser multiresistentes a la antibioticoterapia con las consecuentes repercusiones sobre el perfil clínico del paciente y de prolongación de la estancia hospitalaria entre otras consecuencias adversas. Las cepas procedieron de diversos especímenes siendo un total de 21 cepas analizadas (Tabla 2), de las cuales 3 correspondieron a secreción de infección de tejidos blandos, 5 a infección del sitio de entrada de catéter central, 1 a urocultivo y 5 de secreción bronquial, 2 de lavado bronquio alveolar y 4 de secreción de herida Qx así como una última a hemocultivo; de ellas 14 correspondieron a pacientes hombres y 7 a mujeres. La lectura del corrimiento fue posible realizarla gracias al buen funcionamiento de la enzima *SpeI* que produjo cortes raros en el DNA bacteriano permitiendo su corrimiento multidireccional en el gel de agarosa y se realizó en dos fases debido a que dicho bloque de agarosa tiene un cupo de 15 pozos lo cual depende del peine empleado para hacer los moldes que en nuestro caso el de éste tamaño fue el único disponible, de tal manera que se realizaron dos cargas incluyéndose un ladder que es un marcador de peso molecular y un plug con DNA de la bacteria previamente preparado.

Como ya se ha mencionado una vez que se extrajo el molde de agarosa de la cámara de corrimiento, se procedió a la lectura del mismo previa tinción con bromuro de etidio bajo rayos de luz UVA captándose la imagen por computadora con los ajustes necesarios para la adecuada visualización de las bandas del DNA con impresión láser de los mismos con objeto de inclusión en el trabajo final.

En la **figura 2** se observan los fragmentos de restricción de todas las cepas, las bandas de las cepas 1,2,9, 10 y 12 con categoría I (33%) de la clasificación de Tenover (**Tabla 1**), las cepas 14 y 23 con categoría II (11%), las cepas 15,24,100 y 415 de categoría III (22%) y el resto (N=6) con categoría IV (33%).

La **tabla 3** describe la relación epidemiológica y muestra que las 6 cepas pertenecientes a la categoría I que son idénticas corresponden a la misma cepa lo cual tiene importancia epidemiológica ya que al hacer el análisis de la ubicación de los pacientes los de las cepas 1 y 2 corresponden a las camas 234 y 236 del segundo piso del hospital que son del mismo cubículo y las cepas 9 y 12 correspondieron a las camas 115 y 119 del primer piso del hospital con la similitud a las dos cepas anteriores, al mismo respecto las dos últimas cepas de ésta categoría son del mismo cubículo en el primer piso, es decir en las camas 114 y 115; llamando la atención ésta última cama aunque fue la misma clona del germen estudiado, el aislamiento se hizo en diferentes fechas.

Respecto a la categoría II la constituyen sólo 2 cepas: 14 y 23, consideradas así debido a la diferencia de 2 bandas donde tampoco se encuentra relación epidemiológica debido a que las muestras son de diferente piso del hospital. En la categoría III se encuentran las cepas 15, 24, 100 y 415 de las cuales la primera y tercera se aislaron del segundo piso y la segunda y cuarta del primer piso. Finalmente, 6 cepas consideradas diferentes y sin relación con el posible brote estudiado que se consideraron como categoría IV.

DISCUSIÓN

Las infecciones de adquisición intrahospitalaria (IIH) continúan siendo un problema de salud en todos los hospitales del mundo aún en la actualidad, lo que repercute negativamente en la morbi-mortalidad de los pacientes así como en los costos hospitalarios; etiológicamente hay un limitado número de gérmenes destacando las bacterias y algunos hongos, agentes los cuales tienen distribución selectiva por ciertas áreas corporales en las que influyen el uso de dispositivos invasivos al paciente como son catéteres y sondas, sin embargo otros pocos que son menos selectivos como el caso de *Pseudomonas aeruginosa* que fue objeto de nuestro estudio pudiendo aislarse de diferentes sitios de la economía y cuya presencia está condicionada por la prolongación de la estancia hospitalaria y particularmente a que es un patógeno hospitalario imposible de erradicar de las instalaciones de estos inmuebles que actúan como fomites.

Con el presente trabajo en primer lugar concluimos que las cepas estudiadas no fueron parte de un brote epidémico, si bien se identificaron 6 cepas idénticas (33%), y dado que su presentación se llevó a cabo en diferentes pisos del hospital, no se llegó a una conclusión absoluta, sin embargo se propone la hipótesis de la presencia de algún fomite común a ambos servicios del hospital que esté siendo el vector para la transmisión cruzada de éstas infecciones. Las cepas de la categoría II que se interpretan como probable causa de un brote se consideran como un subtipo de la categoría I por lo que debería considerarse la posibilidad que las cepas derivaron de la categoría I y por ende tener la vigilancia epidemiológica de las cepas bacterianas. En relación a las cepas pertenecientes a la categoría III y IV que son poco relacionadas a las categorías I y II hablan de la gran variedad de cepas existentes en las instalaciones del hospital que son un factor de riesgo importantes para los pacientes con padecimientos concomitantes que muchas veces los hacen más susceptibles.

La importancia de éste estudio tiene en común con los que le anteceden el control de nuevos brotes de infección nosocomial para el caso que así se considere, así

como, también a la prevención de nuevos brotes una vez que se conoce la flora bacteriana hospitalaria habitual con la ayuda de los cultivos rutinarios.

En contraste siempre ha existido la inquietud de los investigadores en salud para el advenimiento de nuevas técnicas que contribuyan al diagnóstico que incluyen desde la identificación de los gérmenes incluso actualmente con el método automatizado, antibiograma que es de mucha utilidad en las decisiones terapéuticas y en la actualidad la disposición de técnicas de biología molecular como el caso que nos ocupa, sin menospreciar a los métodos epidemiológicos rutinarios que han antecedido a éstos nuevos estudios y que de hecho son los primeros en realizarse para el control y prevención de éste tipo de infecciones. Sin embargo el inconveniente de los estudios de biología molecular es la forma retrospectiva en que se realizan de tal manera que la mayoría de las veces el resultado se tiene disponible cuando el evento que puede ser un brote hospitalario ya ha transcurrido o está en su fase terminal, lo que está determinado por el tiempo empleado desde el aislamiento del germen hasta la realización de la técnica empleada que para nuestro caso fue la electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP) que como se ha referido lleva como mínimo 5 días asociado a la determinación del germen cuando falla el método automatizado y la identificación se tiene que realizar de manera tradicional con pruebas bioquímicas.

Finalmente como ya se ha demostrado en estudios previos en diferentes partes del mundo, la electroforesis en gel de campos pulsados es una herramienta disponible considerada estándar de oro para la identificación del genoma bacteriano y con ello la discriminación de cepas diferentes y sobre todo que puede ser reproducible tantas veces como se realice, sin embargo con el inconveniente del alto costo de los reactivos utilizados que muchas veces no están al alcance del presupuesto del hospital.

CONCLUSIONES

1. El grupo de bacterias de *P. aeruginosa* no fueron parte de un brote epidémico.
2. Predominó una clona en un 33% que fue posiblemente causa de infección cruzada.
3. La EGCP es una buena herramienta para tipificar e investigar brote infecciosos intrahospitalarios

BIBLIOGRAFÍA

1. Justo SC Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-026-SSA2-1998, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN Tomo DLVIII No. 22 México, D F 30 de Marzo 2000.
2. Ponce de León RS Guía Práctica en Infecciones Intrahospitalarias 1ª. Ed 2000.
3. Gaynes RP. Surveillance of Nosocomial Infections Infection Control and Hospital Epidemiology 1997;18(7):1-6
4. George DL. Epidemiology of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients *Clin Chest Med* 1995;16:29-40
5. Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases Fifth edition 2000 Churchill Livingstone
6. López E La aplicación de la biología molecular en la epidemiología. Algunas consideraciones metodológicas. *Gac Med Méx* 1996;133(supp 1):19-22
7. Goering R Molecular Epidemiology of Nosocomial Infection: Analysis of Chromosomal Restriction Fragment Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993;14(10):595-600
8. Suzuki Y. Pulsed-field electrophoresis analysis of *Campylobacter jejuni* DNA for use in epidemiological studies. *Journal of Infection* 1993;27:39-42
9. Suzuki Y Discrimination by means of pulsed-field gel electrophoresis between strains of *Campylobacter jejuni* Lior type 4 derived from sporadic cases and from outbreaks of infection. *J of Infection* 1994;29:183-7
10. Skibsted U. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), pulsed-field gel electrophoresis and phage-typing in the analysis of a hospital outbreak of *Salmonella enteritidis* *J of Hospital Infection* 1998;38:207-16
11. van Der A. Molecular Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains: Comparison of Repetitive Element Sequence-Based PCR with Various Typing Methods and Isolation of a Novel Epidemicity Marker. *J of Clin Microbiol* 1999;37:342-9
12. Su L. Molecular investigation of two clusters of hospital-acquired bacteraemia caused by multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* using pulsed-field gel

electrophoresis and infrequent restriction site PCR *J of Hosp Infection* 2000;46:110-7

13 Jang T. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate an outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit *J of Hosp Infection* 2001;48:13-9

14 Sun L. Determination of *Wolbachia* Genome Size by Pulsed-Field Gel Electrophoresis *J of Bacteriology* 2001;183(7):2219-25

15 Bisgard K. Molecular Epidemiology of *Bordetella pertussis* by Pulsed-field Gel Electrophoresis Profile: Cincinnati, 1989-1996. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20(11):758-60

16 Nouvellon M. Usefulness of Pulsed-field Gel Electrophoresis in Assessing Nosocomial Transmission of Pertussis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20(11):758-60

17 Piagnerelli M. Outbreak of Nosocomial Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* in a Geriatric Unit: Failure of Isolation Contact, Analysis of Risk Factors, and Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21(10):651-3

18 Turabelidze D. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci *J of Clin Microbiol* 2000;38(11):4242-5

19 van den Braak N. Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed-field gel electrophoresis of Smal DNA macro restriction fragment for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol Letters* 2000;192(1):45-52

20 Chevalier B. Chromosome sizes and phylogenetic relationships between serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Letters* 1998;160(2):209-16

21 de Lencastre H. Archaic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular and microbiological properties of isolates from the 1960s in Denmark *Microbial Drug Resistance* 2000;6(1):1-10

22 Mlynarczyk A. Use of pulse-field electrophoresis for intraspecies differentiation of methicillin-resistant coagulase-negative strains of *Staphylococcus aureus*. *Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia*. 1999;51(3-4):207-12

23 Zabel L. Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Studies at a traumatic surgery clinic, 1994-1997 *Unfallchirurg* 2000;103(7):557-63

24. Goering R. Molecular Epidemiology. A practical Course 1998 Creighton University Omaha, Nebraska.
25. Agata E. Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Amplified Fragment-Length Polymorphism for Epidemiological Investigations of Common Nosocomial Pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2001**;22(9):550-4
26. Tenover FC. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **1995**;33:2233-9

ANEXOS

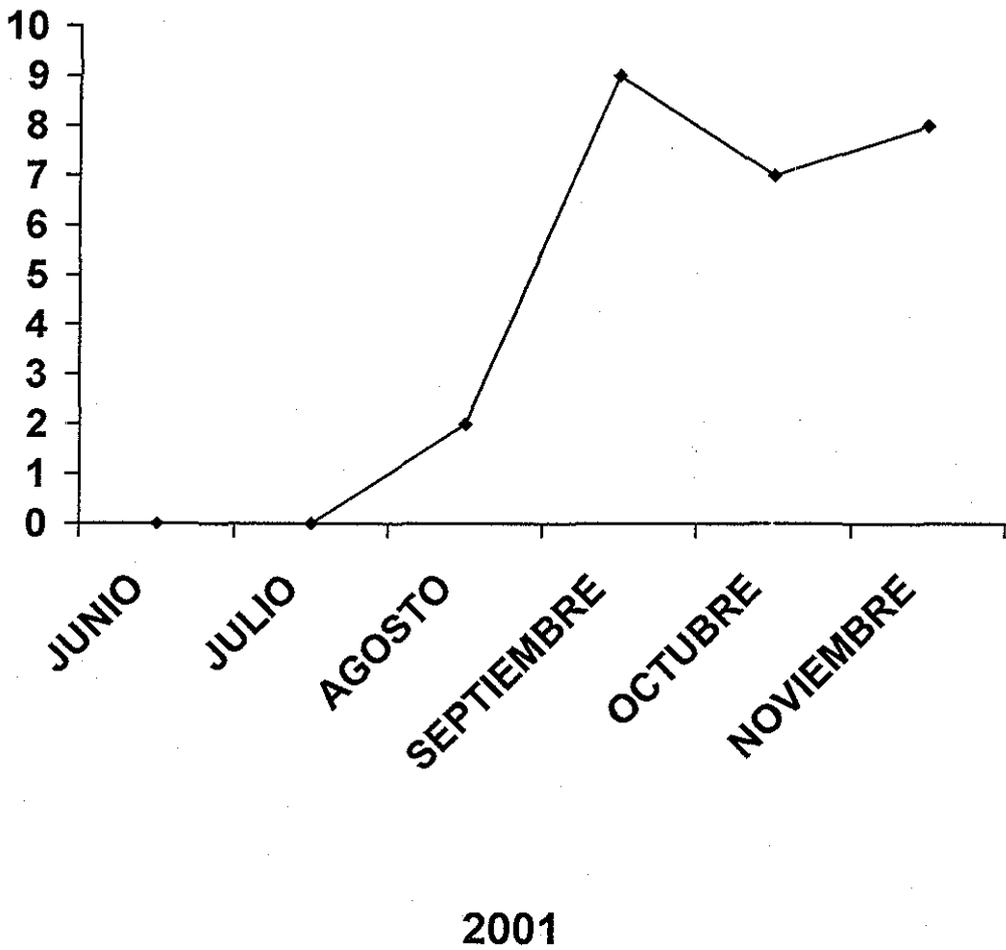
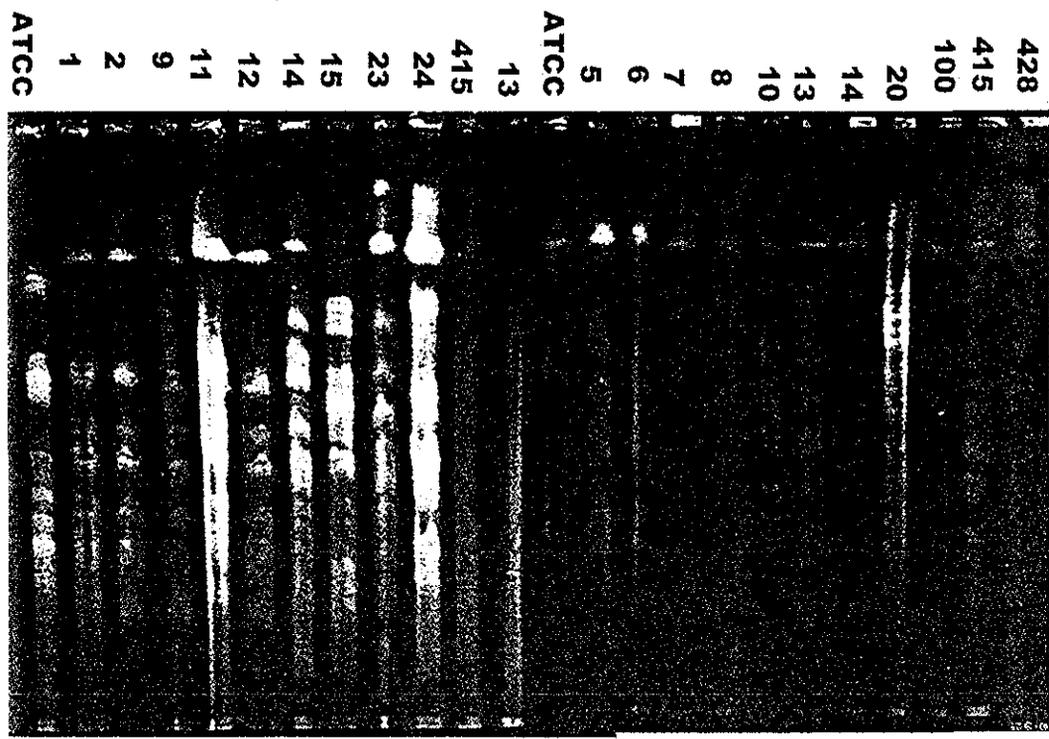


Fig. 1 Distribución de cepas estudiadas por mes.

Tabla 1. Criterios de Tenover para la interpretación		
Categoría	No. Bandas diferentes	Interpretación (del Brote)
Idénticas	0	Epidemia
Estrechamente relacionadas	2-4	Probable
Posiblemente relacionadas	4-8	Menos probable
Diferentes	=>8	No es parte

Tabla 2. Características de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas

CEPA	ESPECIMEN	CAMA	FECHA DE AISLAMIENTO	RESISTENCIA	PRODUCCIÓN DE PICOIANINA
1	Secreción bronquial	236	25 agosto 01		Si
2	Secreción Bronquial	234	20 Nov/01		Si
5	Secreción del sitio de entrada de catéter central	115	04 oct 01		Si
6	Urocultivo	228	19 oct. 01		Si
7	LBA	237	04 oct.01		Si
8	LBA	119	04 oct. 01		Si
9	Sec. catéter	115	04 oct. 01		Si
10	Secreción de infección de tejidos blandos	114	10 set. 01		Si
11	Secreción bronquial	UC11	Set. 01		Si
12	Hemocultivo	119	13 set. 01		Si
13	Secreción del sitio de salida de catéter central	115	07 set 01		No
14	Secreción de Herida Qx	127	07 set. 01		Si
15	Secreción de herida Qx	113	13 set. 01		Si
20	LBA	116	07 set 01		Si
23	Secreción de fascitis necrotizante	211	18 nov. 01		Si
24	Secreción bronquial	207	18 nov. 01		Si
100	Secreción de herida Qx	115	04 oct. 01		Si
415	Secreción de punta de entrada de catéter central	211	18 nov 01		Si
428	Secreción de punta de entrada de catéter central	353	28 nov 01		Si
653	Secreción de absceso	217	10 nov 01		Si
655	Secreción de Herida Qx	959	16 11 01		Si



g. 2. EGCP mostrando fragmentos de restricción del genoma de *aeruginosa* digerido con *SpeI*. Se muestran 19 cepas de *aeruginosa*. Los números indican el número de la cepa. ATCC es cepa control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Relación epidemiológica de las cepas estudiadas

Categorías	Cepa	Cama	Fecha de aislamiento	Origen
IDENTICAS	1	236	25/08/ 01	Secreción Bronquial
	2	234	14/11/01	Secreción bronquial
	9	115	04 /10/ 01	Secreción de catéter
	12	119	13 /09 01	Hemocultivo
	10	114	10 /09/ 01	Sec. Tej. Blandos
	13	115	07 /09/ 01	Secreción del catéter
ESTRECHAMENTE RELACIONADAS	14	127	07 /09/ 01	Secreción de HQx
	23	211	18 /11/ 01	Sec Fascitis Necroz.
PROBABLEMENTE RELACIONADAS	15	113	10 /09/ 01	Secreción HQx
	24	207	18 /11/ 01	Secreción bronquial
	100	115	04 /10/01	Secreción HQx
	415	211	18 /11/ 01	Sec. punta de catéter
DIFERENTES	5	115	04/10/01	Sec. inicio de catéter
	6	228	19/10/01	Urocultivo
	8	119	04/10/01	Lavado broncoalveolar
	11	UCI I	07/09/01	Secreción bronquial
	20	116	17/09/01	Lavado broncoalveolar
	428	353	28/11/01	Sec. punta de catéter

APENDICE

Kit de Reactivos para el Grupo 3 (Bio-Rad)

Buffer de lavado 1x (1x Wash Buffer).

Adicione 50 ml de buffer de lavado 10x y 450 ml de agua estéril a una botella estéril de 500 ml. Mezcle.

Buffer de lavado 0.1x.

Adicione 5 ml de buffer de lavado 1x y 45 ml de agua estéril a una botella estéril de 50 ml o un tubo estéril. Mezcle.

Buffer de Corrimiento 1x (1x Running Buffer).

Vierta una botella de corrimiento 20x dentro de una probeta graduada. Llévase a 2 litros con agua destilada.

Nota: Un precipitado puede formarse por almacenarse prolongadamente. Para redissolver, afloje la tapa y autoclave por 15 minutos, o caliente en un horno de microondas hasta que el precipitado desaparezca.

Agarosa 1%.

1. Fusione una botella de 100 ml de agarosa en un horno de microondas. Esto tomará aproximadamente 1 a 2 minutos. Cheque la agarosa cada 30 segundos para asegurarse que al hervir no se derrame.

2. Vierta la agarosa dentro del molde para hacer el gel GenePath. Permita a la agarosa solidificar por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente antes de usarse.

1% Low Melt Agarose (agarosa de baja fusión 1%).

1. Fusione la agarosa de baja fusión en un horno de microondas. Esto tomará alrededor de 1 minuto. Cheque la agarosa cada 15 segundos para asegurarse que la agarosa al hervir no se derrame.

2. Esta agarosa es usada para apretar el plug de la muestra dentro del pozo.

1 mg/ml de Bromuro de Etidio.

El Bromuro de Etidio es usado para teñir los fragmentos del DNA. Adicione 5 gotas aproximadamente a 300 ml de agua destilada. Siempre use guantes cuando utilice el Bromuro de Etidio.