



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Aislamiento de Bacterias Aerobias en Lavados
Bronquiales de Pacientes del Hospital General de
México.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
García Ramírez José Antonio

Asesora:

M. en C. María Graciela Molina González

Laboratorio de Bacteriología y Propagación de Semillas



Tlalneantla Edo. Mex. Marzo 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Índice

1. ÍNDICE	2
2. DEDICATORIA	4
3. AGRADECIMIENTOS	5
4. RESUMEN	5
5. INTRODUCCIÓN	8
6. ANTECEDENTES	10
6.1. NEUMONÍA.....	10
6.1.1. NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD	11
6.1.2. NEUMONÍA NOSOCOMIAL.....	12
6.2. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	13
6.2.1. CULTIVO DE ESPUTO.....	14
6.2.2. LAVADO BRONQUIAL Y CULTIVOS CUANTITATIVOS.....	15
6.3. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS	18
6.3.1. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA.....	18
6.3.2. IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS MOLECULARES.....	19
7. JUSTIFICACIÓN	23
8. OBJETIVOS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
9. MATERIALES Y MÉTODOS	26
9.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	26
9.2. ABUNDANCIA DE BACTERIAS EN LAVADOS BRONQUIALES	26
9.3. AISLAMIENTO DE BACTERIAS	27
9.4. PRESERVACIÓN DE LAS CEPAS	27
9.4.1. ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS PARA LOS ENSAYOS	28

9.5.	IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS	28
9.6.	IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS.	28
9.7.	IDENTIFICACIÓN POR LA SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN QUE CODIFICA PARA ARNR 16S	29
9.7.1.	EXTRACCIÓN DE ADN MÉTODO DE AP.	29
9.7.2.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	29
9.7.3.	SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL ARNR 16S	30
10.	RESULTADOS	31
10.1.	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN MUESTREADA.....	31
10.2.	CULTIVOS DE LAVADOS BRONQUIALES DE PACIENTES CON UNA INFECCIÓN ACTIVA.....	32
10.3.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR MORFOLOGÍA COLONIAL Y POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS	33
10.4.	IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA ARNR 16S.	40
11.	DISCUSIÓN	46
11.1.	OBTENCIÓN DE MUESTRA Y DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN.	46
11.2.	CULTIVOS DE LAVADOS BRONQUIALES DE PACIENTES CON UNA INFECCIÓN ACTIVA.....	47
11.3.	AISLAMIENTOS BACTERIANOS.....	49
11.3.1.	AISLAMIENTO DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS.....	50
11.3.2.	AISLAMIENTO DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	52
11.4.	ANÁLISIS PARCIAL DEL GEN QUE CODIFICA PARA ARN16S.....	56
12.	CONCLUSIONES	60
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
14.	ANEXO	71

2. Dedicatoria

A mi madre **Emilia Ramírez**

3. Agradecimientos

A **Emilia Ramírez**. Gracias por tus enseñanzas, por todo el tiempo dedicado, por el apoyo, por estar en las buenas y las malas, los consejos, los jalones de orejas, en fin no terminaría nunca de agradecerte todo lo que has hecho por mí, no sabes cuanto te quiero Emi.

A mis Hermanos: **Erasto, Mari y Rubén**. Por todo el apoyo brindado durante toda la vida, gracias por formar parte de esta aventura; los quiero hermanos.

De manera muy especial, quiero agradecer a mis padres académicos: la maestra **Graciela Molina** y el maestro **Alejandro Monsalvo** pues esta tesis fue hecha gracias a su invaluable apoyo.

A mis sinodales: M. en C. **Emelia Campoy**, Dr. **Juan Antonio Montaraz**, y a la Biol. **Irma Castillo** por su tiempo y comentarios para mejorar este trabajo, infinitas gracias.

A los biólogos y P. de biólogos que de ser completos desconocidos terminaron siendo mis hermanos de carrera: **Fabiola Vallejo, Blanca Callejas, Desiree Olivares, Roberto Núñez** y **Guadalupe Espejo**, gracias por el apoyo para sacar adelante los retos que tuvimos durante toda la carrera, gracias por consejos, por su amistad, por todo. No quisiera dejar de lado a **Ericka Bello, Diana Nieves, Ana Soto y Ana de la Cruz** quienes estuvieron presentes durante la elaboración de esta tesis, pero quiero agradecer especialmente a **Jonatan Aguilera Romero**, mi

hermano de carrera y tesis. Jon tu sabes cuanto nos costo esto, gracias por escucharme, ayudarme a planear las cosas, por todo lo que hiciste durante estos años juntos.

También quisiera dar las gracias a las señoras **Clara** y **Graciela** por la amistad incondicional para mi y mi familia.

A mis compañeras de trabajo: **Andrea, Juanita, Sandra** y al **Dr. Javier Gallo** por mi primera oportunidad laboral.

Agradezco al personal que trabaja en la unidad de neumología del Hospital General, principalmente a los doctores **Lima, Colli** y **Núñez** por facilitarnos las muestras de lavados bronquiales y a las personas mas importantes para la realización de este trabajo: **los pacientes**.

Este estudio se llevó acabo gracias al apoyo del proyecto PAPIIT-UNAM clave IN200310-31.

4. Resumen

En nuestro país, las Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs) representan la tercera causa nacional de muerte en niños de 0-3 años y el octavo lugar de mortalidad general a nivel nacional. Dentro de las IRAs, las neumonías ocupan el tercer lugar en las causas de mortalidad de adultos a nivel mundial. La etiología de las neumonías es diversa e incluyen las infecciones de origen bacteriano. En este sentido, el cultivo cuantitativo de la muestra de lavados bronquiales ayuda a conocer a los microorganismos responsables de la infección, presentes en una concentración de $\geq 1 \times 10^4$ UFC/mL, de los colonizantes que se encuentran por debajo de este punto de corte. El objetivo del presente estudio fue determinar la incidencia de bacterias aerobias causante de neumonía en pacientes sometidos a lavados bronquiales del Hospital General de México. Se obtuvieron 104 lavados bronquiales de pacientes que asistieron a la unidad de neumología en el Hospital General de México, se realizaron cultivos cuantitativos en medios selectivos y uno enriquecido. Se obtuvieron aislamientos que indicaron una infección activa en el paciente y posteriormente cultivos puros que fueron identificados por pruebas de bacteriología clásica y por la secuenciación parcial del gen que codifica para ARNr 16S. El 45.19% (47/104) de los pacientes a los que se les realizaron lavados bronquiales procesados presentaron una infección activa pues las UFC/mL superaba 1×10^4 UFC/mL. Las bacterias más frecuentemente aisladas fueron *Staphylococcus epidermidis* en el 18% de los casos, seguida por *Escherichia coli* (13%), en menor porcentaje, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Moraxella catarrhalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mitis*. Se concluye que *E. coli* y *S. epidermidis* son unos de los principales agentes etiológicos de la neumonía en el Hospital General de México. Y que la identificación por pruebas bioquímicas y por la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S coincidió en un 84% de las cepas analizadas.

5. Introducción

Las vías respiratorias representan un hábitat microbiano de lo más heterogéneos y complejos del cuerpo humano, incluye el tracto respiratorio alto y bajo, y estos pueden ser colonizados por diversos microorganismos conocidos como flora bacteriana (Cota *et al.*, 2003).

Los recién nacidos comienzan a ser colonizado por la flora poco después de su nacimiento, y al primer mes de vida las vías respiratorias están completamente colonizadas por algunas bacterias del genero *Streptococcus*, durante la niñez, se suman otras bacterias como espiroquetas y *Bacteroides*; en la adultez se agregan especies de *Actinomyces*, algunos géneros de enterobacterias como *Escherichia coli* de forma accidental con los alimentos e incluso hongos como *Candida* (Shenep, 2000; Chumpitaz *et al.*, 2004).

Sin embargo, muchas de las bacterias de la flora normal resultan ser potencialmente patógenas y podrían causar enfermedades al huésped. Esto depende de la sensibilidad del sistema inmune de la persona y la capacidad de adherencia, colonización y crecimiento del microorganismo. En este sentido, los pacientes, sufren el ataque de diversos microorganismos, causando infecciones como la neumonía (Madigan, *et al.*, 2003).

La neumonía es definida como una lesión inflamatoria del parénquima pulmonar en respuesta a la llegada de microorganismos a la vía aérea. Desde el punto de vista de la práctica clínica, el diagnóstico se puede realizar por medio de radiografías y la presencia de algunos síntomas como: tos, expectoración purulenta, disnea, dolor pleurítico y fiebre (García y Aspa, 2005).

La neumonía puede ser causada por virus, hongos o bacterias, siendo estas últimas las de mayor incidencia, con una amplia diversidad de patógenos, entre las que destacan *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Streptococcus pneumoniae* y algunas bacterias poco comunes como son algunos géneros de la

familia *Enterobacteriaceae* como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* por mencionar algunos y también se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma spp.* (Paladino, 2002).

En el mundo, las infecciones en vías respiratorias bajas, constituyen una causa muy importante de morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados. De acuerdo a datos del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), en nuestro país las infecciones respiratorias agudas constituyeron en el 2008 la octava causa de muerte nacional con 13 738 decesos y durante el año 2011 el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) reportó 25 925 377 casos atendidos de infecciones respiratorias agudas, siendo el Distrito Federal y el Estado de México donde mayor número de personas fueron hospitalizadas por estas infecciones respiratorias agudas (Sistema Nacional de Información en Salud [SINAIS], 2008) Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [INEGI], 2011)).

En nuestro país, la instancia encargada de ofrecer servicios de diagnóstico de enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica es el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INdRE). Dentro de este instituto, se encuentra el laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas bacterianas y Pertussis que actualmente realiza aislamiento y serotipificación de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*, además del aislamiento e identificación de *Bordetella pertussis* y *parapertussis* por PCR en tiempo real (Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica [INdRE] 2013).

6. Antecedentes

6.1. Neumonía

La neumonía se define como un proceso inflamatorio del parénquima pulmonar, secundario a la colonización de microorganismos patógenos que generan algunos síntomas de infección aguda como respiración rápida y dificultosa, tos, fiebre, pérdida de apetito y secreción purulenta que se acompaña además de un infiltrado que puede apreciarse en la radiografía de tórax. (García y Aspa, 2005).

La gravedad de las neumonías depende de diversos factores como son la edad, el estado de salud, el nivel socioeconómico, condiciones preexistentes del paciente y el tipo de organismo causante de la enfermedad. Actualmente la neumonía ocupa el tercer lugar en las causas de mortalidad de adultos a nivel mundial, y en nuestro país, las infecciones respiratorias son los problemas médicos más comúnmente atendidos en los hospitales, y representan la 3° causa nacional de muerte en niños de 0-3 años y ocupa el 8° lugar en causa de mortalidad general a nivel nacional, siendo el Distrito Federal y Estado de México los lugares con mayor morbilidad y mortalidad (Sistema Nacional de Información en Salud [SINAIS], 2008) (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [INEGI], 2011).

Se ha demostrado que en países en desarrollo como México, más de la mitad de los casos de neumonía se deben a bacterias, predominando *Streptococcus pneumoniae* (30%) y *Haemophilus influenzae* (27%). Esto podría sugerir que la mayoría de las defunciones por neumonía se deben a infección por agentes bacterianos (Organización Panamericana de la Salud, 1995).

La clasificación de las neumonías se puede realizar con base a factores, como el agente causal que las provoca, (neumocócica, estafilocócica, etc), el tipo de

huésped (inmunodeprimidos), afectación anatomopatológica (neumonía lobar, bronconeumonía, etc.) y por el lugar donde se adquiere la neumonía, y es clasificada como neumonía adquirida en la comunidad (NAC) y neumonía nosocomial (NN) (García y Aspa, 2005).

6.1.1. Neumonía Adquirida en la Comunidad

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es definida como la infección aguda del parénquima pulmonar de origen extrahospitalario, su diagnóstico se basa en la presencia de síntomas y signos clínicos como son: tos con expectoración purulenta, dolor torácico, disnea, fiebre o hipotermia, junto con una auscultación pulmonar anormal, acompañado de la presencia de infiltrados pulmonares revelados por técnicas radiológicas (Blanquer y Sanz, 2010).

La gravedad de la neumonía puede variar desde un cuadro simple, en sujetos jóvenes previamente sanos, que puede confundirse con infecciones del tracto respiratorio superior, bronquitis o resfriado, hasta cuadros graves que deben ser manejados en unidades especializadas de cuidado intensivo y ponen en peligro la vida de los pacientes. Los principales mecanismos de adquisición de una neumonía son la aspiración de contenido bucofaríngeo o gástrico o la inhalación de aerosoles (Saldías y Pérez, 2005).

De acuerdo con Blanquer y Sanz en 2010, el agente etiológico mayormente aislado en neumonías adquiridas en la comunidad es *Streptococcus pneumoniae*, en algunos estudios se menciona que es responsable de dos tercios de las NAC, seguido de *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Moraxella catarrhalis*.

La frecuencia de los casos de neumonía adquirida en la comunidad, aumenta conforme avanza la edad y debido a diferentes factores de riesgo incluido el alcoholismo, asma, inmunosupresión, enfermedades cardíacas y pulmonares, hay un incremento significativo en las tasas de morbilidad y mortalidad (Loeb, 2003).

6.1.2. Neumonía Nosocomial

La Neumonía Nosocomial (NN) es aquella inflamación del parénquima pulmonar que da inicio 48h después del ingreso hospitalario. Se reconocen 2 subgrupos de NN la temprana y la tardía; la primera aparece en los primeros días de ingreso al hospital. Frecuentemente este tipo de NN es causada por bacterias de la comunidad que colonizan la orofaringe como *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, entre otros, mientras que la NN tardía, aparece después de 7 días de estancia hospitalaria, causada por patógenos hospitalarios que colonizan la orofaringe después del ingreso (Barreiro-López, *et al.*2005).

La NN es la principal causa de muerte por infecciones adquiridas en el ámbito hospitalario y la segunda en frecuencia luego de la infección urinaria. En las unidades de cuidados intensivos representa la causa más frecuente de infección intrahospitalaria y se asocia con una elevada morbi-mortalidad (Weyland *et al.*, 2011).

La etiología de la NN en ocasiones, esta relacionada con los gérmenes que se encuentran colonizando la orofaringe o estructuras contiguas como senos paranasales y placa dental. Dancewicz *et al.* en 2009 analizaron las bacterias potencialmente patógenas que colonizan el árbol bronquial en pacientes con cáncer de pulmón, en 15 casos se encontraron bacterias potencialmente patógenas como *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *H. influenzae*.

Los porcentajes de los diferentes agentes causantes de NN, se muestran en el Cuadro 1, en este, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, *Acinetobacter* spp. y géneros de la familia Enterobacteriaceae como *K. pneumoniae* son los principalmente aislados (Luna *et al.*, 2005).

Cuadro 1: Etiología en 4 305 episodios de neumonía nosocomial

Patógeno	Porcentaje
Gram negativos	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21.4
<i>Acinetobacter</i> spp.	8.5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.1
Enterobacteriaceaea	17.9
<i>Haemophilus</i> spp.	6.2
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0.5
<i>Legionella</i> spp.	0.2
Otros bacilos gramnegativos	2.7
Gram positivos	
<i>Staphylococcus aureus</i>	21.7
<i>Staphylococcus</i> coagulasa-negativo	1.6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3.3
Otros <i>Streptococcus</i> spp.	6
<i>Enterococcus</i> spp.	0.7
Flora de la vía respiratoria superior (Sin especificar según diversos estudios)	2.5
Anaerobios	0.5
Hongos (<i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Neumocystis jiroveci</i>)	2.1
Virus	0.4
Otros patógenos (Sin especificar según diversos estudios)	2.8

Para conocer la etiología de la neumonía se han desarrollado diversos tipos de técnicas para la obtención de muestras del tracto respiratorio como son el cultivo o tinción de esputo y técnicas fibrobroncoscópicas.

6.2. Técnicas de diagnóstico

Actualmente, los especialistas en enfermedades infecciosas enfrentan grandes dificultades en el diagnóstico y tratamiento de las neumonías. La etiología de la neumonía es muy variable y el tratamiento está basado en epidemiología, manifestaciones clínicas, radiografía y exámenes de laboratorio. El criterio más común para el diagnóstico de las neumonías es la aparición de un nuevo infiltrado

en los pulmones que puede ser apreciado en radiografías, además de fiebre, leucocitosis y secreción purulenta. Aún cuando se desconoce el microorganismo causante de la neumonía, se usan antibióticos de amplio espectro para poder erradicar la infección, y si este tratamiento falla, entonces se procede a la identificación de los microorganismos (Carvalho *et al.*, 2008).

6.2.1. Cultivo de esputo

El cultivo o tinción de esputo, es una técnica para diagnóstico de neumonías sencilla, rápida y barata; da una buena orientación para la aplicación de los antimicrobianos, sin embargo el uso del cultivo o tinción del esputo es controvertido, pues la flora orofaríngea puede crear resultados falsos positivos y tener en la muestra microorganismos que no son los verdaderos responsables del proceso infeccioso (Morejón 1998).

Allaouchiche *et al.* en 1999, analizaron la correlación que existía entre el cultivo de los cepillados bronquiales y su respectiva tinción de Gram. Los resultados de la tinción de Gram fueron expresados según la ausencia o presencia de células bacterianas en el campo, clasificadas como cocos, bacilos o cocos y bacilos en la misma muestra, posteriormente se realizaron los cultivos cuantitativos de los cepillados bronquiales. De acuerdo a esto solo en el 51% de los casos coincidieron ambas técnicas, concluyen que las tinciones de Gram pudieran ser utilizadas para el diagnóstico rápido, sin embargo son poco confiables para proporcionar un adecuado tratamiento.

Dada la desventaja del cultivo de esputo para la identificación del microorganismo, se ha optado por el uso de técnicas de broncoscopía. En la actualidad, la broncoscopía es una indicación común con el fin de explorar y realizar maniobras en el árbol bronquial para el diagnóstico de diferentes enfermedades, como las infecciosas, de cada paciente y para la detección de neumonías (Márquez, 2002).

6.2.2. Lavado Bronquial y Cultivos Cuantitativos

El lavado bronquial es un procedimiento que permite obtener información acerca de los constituyentes celulares y bioquímicos de la superficie epitelial del tracto respiratorio inferior, a través de la instilación y posterior aspiración de líquido en uno o varios segmentos o subsegmentos pulmonares (Escribano *et al.*, 2005).

La técnica consiste en dejar bloqueado el extremo del fibrobroncoscopio en un bronquio del territorio pulmonar elegido, se inyectan 50 mL de solución salina a una temperatura de 37°C, que se reaspiran por medio de la misma sonda. Esta maniobra es repetida en 3 ocasiones. La zona del lavado bronquial se elige según sea el proceso patológico, y una radiografía torácica orienta la elección del examinador. Una de las ventajas de estas técnicas es que no existen reacciones secundarias para los pacientes (Housset, 2001).

El estudio cuantitativo del lavado bronquial es una técnica empleada para diferenciar los microorganismos infecciosos presentes en la muestra del lavado bronquial, con una concentración mayor, de los de la flora normal, con concentración inferior, y de ese modo elegir los antibióticos que pudieran ser preescritos. En particular, en los lavados bronquiales un agente patógeno tiene colonias con crecimiento de 1×10^4 UFC/mL (Sacsquispe y Ventura, 2001; Maldonado-Ortiz, 2005; Meseguer, 2007). La precisión de los cultivos cuantitativos es en promedio del 81% y una especificidad del 65%. Actualmente el cultivo cuantitativo de las muestras de lavados bronquiales no es un procedimiento común que se realiza de forma rutinaria, sin embargo, su utilización ha ido en aumento.

Carvalho *et al.* en 2008 estudiaron a 22 pacientes con enfermedad hepática que estuvieron bajo ventilación mecánica y fueron diagnosticados con neumonía nosocomial. Obtuvieron muestras del tracto respiratorio inferior por sistema de aspirado endotraqueal, Bal cath® y lavados broncoalveolares, con esta última técnica, se aislaron 17 microorganismos; *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* fueron los que con mayor frecuencia se presentaron, y por el sistema de aspirado

endotraqueal, reportaron 31 aislamientos y *S. aureus* se aisló con mayor frecuencia.

Cuando un paciente ha estado sometido a antibióticos previo a la realización de lavados bronquiales, el punto de corte para considerar como patógena a una bacteria es de 1×10^3 UFC/mL. Con respecto a esto, en el 2011 Weyland *et al.* reportaron que 74% de los pacientes con tratamiento previo, de cefalosporinas de tercera generación y en algunos casos una combinación de vancomicina/inipenem, presentaron cultivos cuantitativos positivos $\geq 1 \times 10^3$ UFC/mL mientras que el 83% sin tratamiento previo generaron cultivos cuantitativos $\geq 1 \times 10^4$ UFC/mL, siendo *Acinetobacter spp.*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* los agentes más frecuentemente aislados.

La incidencia de las NN se ha incrementado en las últimas dos décadas, la edad avanzada, enfermedad pulmonar crónica, la internación previa y la ventilación mecánica son unos de los principales factores de riesgo para su adquisición. La ventilación mecánica es un tratamiento de soporte vital, en el que mediante una máquina se suministra un soporte ventilatorio y oxigenatorio, facilitando el intercambio gaseoso y el trabajo respiratorio de los pacientes con insuficiencia respiratoria o en condiciones críticas. El procedimiento quirúrgico favorece la aspiración de secreciones contaminadas por microorganismos de la flora normal. Estella *et al.* en 2008 clasificaron las neumonías con base en el tiempo de hospitalización que tenían los pacientes en: neumonía extrahospitalaria, neumonía asociada a ventilación mecánica precoz, neumonía asociada a ventilación mecánica tardía y neumonía en pacientes inmunodeficientes. La bacteria más frecuentemente aislada fue *Haemophilus influenzae* con 5 pacientes, seguida por 3 aislamientos de *S. aureus* ambas aisladas a partir de pacientes con ventilación mecánica precoz.

Zaccard *et al.* en 2009 compararon las bacterias presentes en los cultivos cuantitativos de lavados broncoalveolares bilaterales contra lavados bronquiales unilaterales, ambos provenían de pacientes diagnosticados con neumonía asociada a ventilación mecánica. En ambas muestras fueron recuperadas las

mismas especies bacterianas, siendo *S. aureus* la bacteria más frecuentemente aislada, seguida por *P. aeruginosa* y *H. influenzae*. Lo mismo fue reportado por Vaz *et al.* (2011) quienes a demás aislaron especies de la familia Enterobacteriaceae como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. aerogenes*, entre otras y *S. aureus* resistente a meticilina fue aislado dentro de su estudio.

Con respecto a pacientes inmunocomprometidos, la neumonía es una causa importante de morbilidad y mortalidad. En particular entre los pacientes infectados por VIH tienen la probabilidad de desarrollar neumonías bacterianas 1.8 veces más que una población seronegativa con similares factores de riesgo. Dentro de los principales patógenos bacterianos que se han implicado dentro de la neumonía en personas seronegativas destacan las infecciones por *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. tuberculosis*. Pérez *et al.* en 2011 reportaron la etiología de la neumonía de pacientes infectados por VIH y el microorganismo que se encontró con mayor frecuencia fue *Pneumocystis jiroveci*, seguido por *S. pneumoniae* y *Mycobacterium avium complex*.

Actualmente en nuestro país, se mantiene vigilancia epidemiológica de 4 bacterias causantes de IRAs: Neumococo, Meningococo, *Haemophilus* y *Bordetella pertussis* y *B. parapertussis*, estas últimas especies, son causantes de tosferina y una enfermedad similar a esta respectivamente, las cuales tienen una alta tasa de morbilidad y afecta principalmente a los lactantes y menores de un año (Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica [INdRE], 2013).

En cuanto a la etiología de las neumonías presentes en el Hospital General de México, Flores en 2007 realizó un estudio de pacientes con NN ingresados a este hospital. El estudio se llevo a cabo durante el periodo de enero del 2006 a mayo del 2007, primero a los pacientes se les realizó una toma de muestra simple, como es un aspirado traqueal o esputo y posteriormente se analizaron cultivos cuantitativos de cepillados bronquiales protegidos ($>10^3$ UFCxmL), lavados bronquiales ($>10^4$ UFCxmL) y hemocultivo. Los patógenos con mayor número de aislamientos correspondieron a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Finalmente para la identificación del microorganismo causante de una infección, como lo es la neumonía bacteriana surgen diversas técnicas que se utilizan en la actualidad en los laboratorios clínicos y dependiendo el grado de exactitud que se requiera para la identificación de los mismos, se selecciona entre pruebas fenotípicas o pruebas moleculares, ya que ambas ofrecen ventajas y desventajas (Bou *et al.* 2011).

6.3. Técnicas de identificación de bacterias

6.3.1. Identificación Fenotípica

Las técnicas fenotípicas, basan la identificación bacteriana en las diferentes características morfológicas del organismo, tanto microscópicas como macroscópicas para realizar una identificación presuntiva, que es completada por baterías de pruebas bioquímicas que proporcionan algunas características metabólicas, como son presencia de una enzima o el desarrollo de crecimiento de un microorganismo sobre algún sustrato como única fuente de carbono (Mac Faddin, 2000)

También existen las pruebas miniaturizadas, que consisten en microtubos con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente con el aislamiento a caracterizar. Estos sistemas pueden ser manuales, como el API, o automatizados, en los cuales la inoculación, incubación y lectura se hace de forma automatizada. Incluso, los sistemas automatizados además de contener los sustratos liofilizados contienen diversos antimicrobianos a diferentes concentraciones para realizar simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo (Bou *et al.*, 2011).

La principal ventaja que ofrece la técnica de identificación fenotípica es que son de bajo costo, además que al obtener el microorganismo causante de la infección, se pueden realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de la cepa. Pero las pruebas fenotípicas no proporcionan información necesaria para la identificación bacteriana, como el hecho que no todas las cepas de una misma

especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos, y aunado a que requieren de mucho tiempo así como las limitaciones en las bases de datos, es por esto que se han desarrollado otro tipo de pruebas como las pruebas moleculares (Rodicio y Mendoza 2004).

6.3.2. Identificación por técnicas moleculares

Las pruebas moleculares se han seleccionado como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a las características fenotípicas.

Una de las técnicas de biología molecular que se ha utilizado para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica fue desarrollada por Kary Mullis en la década de los 80's y consiste en utilizar dos oligonucleótidos y una enzima llamada taq polimerasa para conducir la síntesis de una secuencia específica de ADN. Cada uno de los oligonucleótidos se une a las hebras de ADN y los sitios donde se unen los oligonucleótidos generalmente están separados por unos cientos de pares de bases (100-1000 pb) y son amplificadas por medio de la repetición de los ciclos (Bangham, 1991).

La reacción consta, de aproximadamente 30 ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero (desnaturalización) consiste en la ruptura de los puentes de hidrogeno del ADN blanco. En el segundo (alineamiento) ocurre el alineamiento de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los oligonucleótidos, a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias y en el tercer paso (elongación) la polimerasa extiende la longitud de los oligonucleotidos, añadiendo los nucleótidos libres en el orden que la secuencia de nucleótidos sugiere (Rodríguez y Barrera 2004).

Para la identificación bacteriana, una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos de los distintos géneros y especies bacterianas como los genes que codifican para las

subunidades ribosómicas 5S, 23S y 16S, pero el análisis del ARNr 16S, es en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación mas precisa (Bou *et al.*, 2011).

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de los 70's. Los estudios de Woese originaron el término dominio, distribuyendo a los organismos en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya (Olsen y Woese, 1993).

Así, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del reino procariota y como consecuencia, la clasificación e identificación bacteriana ya que en las ediciones vigentes del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* y *The Prokaryotes* basan su estructuración en las relaciones filogenéticas establecidas con esta macromolécula (Rodicio y Mendoza 2004).

Los estudios en los cuales se utiliza la secuenciación del gen que codifica para ARNr 16S han ido en aumento, aunque siguen siendo escasos. De hecho, en la mayor parte de las publicaciones revisadas para la identificación de bacterias de origen clínico por pruebas de biología molecular, se usan oligonucleotidos de especies específicas, esto con la finalidad de no esperar el tiempo de la secuenciación, y tener una identificación más rápida.

Hansen *et al.* (2010), desarrollaron una PCR para la detección de bacterias causantes de una infección en sangre. Diseñaron oligonucleotidos específicos para bacterias Gram negativas: *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, y otras especies de bacterias Gram negativas, para el caso de bacterias Gram positivas, los oligonucleotidos específicos que se ocuparon fueron para *Staphylococcus sp.*, *S. aureus*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y para *S. pneumoniae*. Se compararon los resultados de la identificación por pruebas de bacteriología clásica con los resultados para la PCR, se observó que la PCR tiene una sensibilidad y especificidad del 100%, por lo cual, puede ser usada para el diagnóstico sepsis.

De igual forma Yang *et al.* en 2008 describen una sensibilidad del 98% en un protocolo para la detección de bacterias causantes de artritis séptica a partir de oligonucleótidos específicos para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* y dentro de los Gram negativos *E. coli* y *Neisseria gonorrhoeae*.

En cuanto a la presencia de patógenos en vías respiratorias, Rudkjobing *et al.* (2011) describen por medio de cultivos y del análisis del ARN 16S las bacterias de la microbiota presentes en infección pulmonar en pacientes con fibrosis quística. Con ambas técnicas se identificaron *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* como los responsables de infecciones en estos pacientes, además en el análisis del ARN 16S se reportaron diversas bacterias no cultivables.

Por otro lado, Bahrani-Mougeot *et al.* (2007) reportaron a las bacterias potencialmente patógenas y patógenas que estaban presentes en el dorso de la lengua y en lavados broncolalveolares de pacientes con diagnóstico de neumonía por ventilación mecánica, pertenecientes a la unidad de cuidados intensivos con diagnóstico de neumonía por ventilación mecánica. La identificación se realizó por medio de la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S y posteriormente se llevo acabo la clonación. Se encontró una amplia diversidad de patógenos en tanto en las muestras obtenidas en el exudado de lengua, como las que se obtuvieron en el lavado broncoalveolar, de las cuales en 14 pacientes la bacteria estaba presente en las dos zonas (lengua y bronquios). Además también se identificaron bacterias que no habían sido reportadas por cultivos, como *Pseudomonas fluorescens*, *Dialister pneumosintes*, *Haemophilus segnis* y *Gemella morbillorum*.

En el Hospital General de México, el cultivo de esputo se ha conservado como la técnica de diagnóstico para las NAC, a pesar de que la especificidad y sensibilidad de la técnica han sido objeto de discusión, para apoyar el cultivo de esputo, las radiografías de tórax han sido la prueba diagnóstica mas certera pues presenta varias ventajas entre las que destaca su pronta obtención, además como se mencionó anteriormente la prueba de esputo no es 100% específica, ya que

puede ser positiva en pacientes sanos que al contaminarse el esputo de neumococos a su paso por la orofaringe nos da un resultado falso positivo (Hospital General de México, 2014).

Actualmente se han empezado a hacer estudios donde se hacen comparaciones de las técnicas de biología molecular, contra las técnicas de bacteriología clásica. Bosshard *et al.* 2006 comparan tres sistemas de identificación de bacterias clínicas Gram negativas: API 20 NE System, VITEK 2 ID-GNB Card y la secuenciación del gen ARNr 16S. Por medio de la secuenciación, el 92% de los aislados fueron asignados a nivel de especie y 8% a nivel de género, con el API 20 NE 54% de los aislamientos fueron asignados a especie y 7% a género y el 39% de los aislamientos no se pudieron determinar y en el caso de VITEK 2 donde 53% de los aislados fueron identificados a nivel de especie, 1% a género y el 46% no fue identificado, por lo tanto en este reporte se propone la utilización de no solo la bacteriología clásica, sino también la utilización de técnicas moleculares para el correcto diagnóstico de un paciente.

7. Justificación

En la actualidad, las infecciones del tracto respiratorio inferior, constituyen una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados. En México, la mayoría de estudios que se han realizado se enfocan a los sectores más vulnerables de la población como son los niños menores a 5 años y los adultos mayores.

El Hospital General de México (HGM), se encuentra ubicado en la zona centro del país, proporciona servicios de salud en las especialidades médicas, quirúrgicas y de apoyo al diagnóstico y tratamiento de enfermedades en sus diferentes unidades. La unidad de neumología presta atención a pacientes de consulta externa y hospitalizados de las unidades médicas de oncología, geriatría, infectología, etc. que presentan entre otros padecimientos, sintomatología de infecciones respiratorias y es en esta unidad donde se realiza la toma de lavados bronquiales. Durante 2010 la unidad de neumología atendió un total de 9903 pacientes, se registró 149 egresos y 37 defunciones causados por neumonías. Así que esta unidad es el lugar ideal para conocer la incidencia bacteriana en infecciones del tracto respiratorio inferior de pacientes ambulatorios y hospitalizados.

El hospital cuenta con el apoyo del laboratorio de análisis clínicos para la identificación de los agentes patógenos causantes de neumonía o trastornos respiratorios a partir de los lavados bronquiales. Pero en el laboratorio se sigue usando el cultivo de esputo como técnica de diagnóstico y no se realizan los cultivos cuantitativos a partir de los lavados bronquiales, lo que trae como consecuencia confundir bacterias colonizantes de las realmente patógenas, aunado a esto, la aparición de bacterias que tienen metabolismo similar entre ellas o son poco comunes en infecciones respiratorias hace que a veces las bacterias pudieran ser confundidas con otras, es por esto que la biología molecular apoya a la bacteriología clásica para poder hacer una identificación más certera y una de

las técnicas que ha tomado relevancia es la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S que en combinación con las pruebas bioquímicas ayudarían a la identificación de bacterias de difícil identificación o no contempladas en el esquema de identificación tradicional, además se propone la realización de los cultivos cuantitativos para diferenciar las bacterias colonizantes de las bacterias que están causando la infección activa en el paciente para así hacer mas eficiente el tratamiento.

8. *Objetivos*

Objetivo General

Evaluar la incidencia y la infección activa de bacterias aerobias en pacientes sometidos a lavados bronquiales del Hospital General de México.

Objetivos Particulares

Distinguir las bacterias patógenas de las colonizantes con base a cultivos cuantitativos que superen 1×10^4 UFC/mL.

Determinar la diversidad de bacterias aerobias de pacientes de la unidad de neumología en el Hospital General de México.

Determinar mediante pruebas bioquímicas los aislamientos bacterianos.

Confirmar la identificación de los aislamientos a partir de la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S.

9. Materiales y Métodos

9.1. Obtención de Muestras

Las muestras de lavados bronquiales se obtuvieron de pacientes ambulatorios e internos mayores de 18 años, hombres y mujeres que asistieron a la unidad de neumología en el Hospital General de México para el procedimiento de lavados bronquiales en el periodo de Mayo del 2010 a Enero del 2012. Se obtuvieron 10 mL de lavado bronquial y fueron colocados en tubos con medio de transporte Stuart, rotulados con el nombre del paciente y expediente. Las muestras se mantuvieron a 4°C durante el transporte al laboratorio.

9.2. Abundancia de bacterias en lavados bronquiales

Se realizó la diferenciación entre bacterias colonizantes y bacterias responsables de la infección por medio del conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) en agar sangre de carnero 5%. En el laboratorio, a partir de 10 mL de lavado bronquial, se realizaron diluciones seriadas (Fig. 1) de las muestras en tubos con Solución Salina Fisiológica (SSF) estéril y se plaquearon 100µl en cajas petri conteniendo agar sangre de carnero al 5%, agar S110 para *Staphylococcus* y agar MacConkey para bacilos Gram negativos. Se incubó a 37°C a 24 y 48 h y después de este tiempo, se realizó la descripción de la morfología colonial y el conteo de colonias, obteniendo las UFC/mL de acuerdo a una fórmula (Figura 1):

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\# \text{ de colonias}}{\text{cantidad plaqueada} \times \text{dilución}}$$

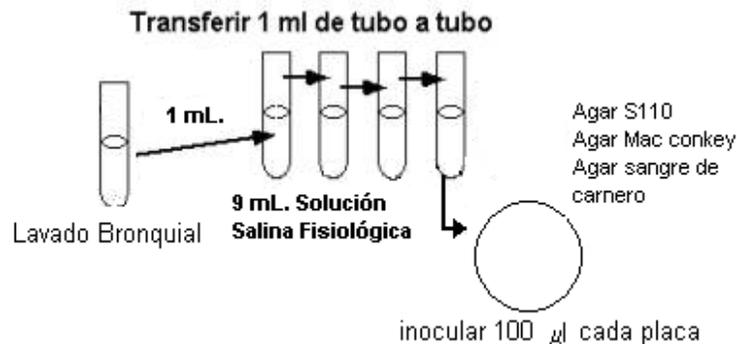


Figura 1 Dilución seriada de lavados bronquiales para el conteo de UFC/mL y formula para la obtención de las UFC/mL totales.

9.3. Aislamiento de Bacterias

Del crecimiento bacteriano obtenido a partir de las diluciones seriadas en agar S110, agar Macconkey y agar sangre de carnero al 5%, se elaboró una descripción de la morfología colonial, en el caso del agar sangre ayudo para observar algún tipo de hemólisis. Los aislados fueron etiquetados según las siglas del nombre del paciente y si esta colonia provenía de un cultivo mixto. se etiquetaban además de las siglas del paciente con números sucesivos, a lo que se le denomino código de la cepa. Los aislamientos fueron resemebrados en el medio respectivo por medio de estría cruzada con la finalidad de obtener cultivos puros.

Se realizaron tinciones de Gram con el propósito de confirmar la pureza de los cultivos, así como la morfología microscópica.

9.4. Preservación de las Cepas

Una vez que el cultivo se purificó, se procedió a la preservación de las bacterias, para lo cual una colonia fue inoculada en criobiales estériles con caldo infusión cerebro corazón y se incubo por 24 h. Posterior a esto, se agregó glicerol al 40% en una proporción 1:1, se mezclaron y se colocaron a 4°C durante 48

horas y finalmente se almacenaron a una temperatura de -20°C para posteriores ensayos.

9.4.1. Activación de las cepas bacterianas para los ensayos

Las bacterias almacenadas a -20°C se activaron por resiembra en cajas con agar infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron por 24-48 h a 37°C y estas fueron utilizadas para la identificación por pruebas bioquímicas y la secuenciación parcial de gen que codifica para el ARNr 16S.

9.5. Identificación de las Cepas Aisladas

La identificación de las bacterias se realizó mediante pruebas bioquímicas y secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S.

9.6. Identificación Por Pruebas Bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas se realizaron bajo el esquema recomendado por, Barrow y Feltham (1993), las primeras consisten en catalasa, oxidasa y movilidad (por gota suspendida) que se revisaron inmediatamente después del crecimiento de la colonia. También se determinó la producción de Ácido de lactosa y glucosa, degradación de glucosa por vía oxidativa y/o fermentativa, se revisaron a las 24 y 48 horas después del inóculo en el medio de cultivo. Estas pruebas se ocuparon para determinar hasta nivel taxonómico de género y con estos resultados se seleccionaron las características bioquímicas necesarias para la determinación de especie. En el caso de bacterias Gram negativas, se realizaron: ureasa, gelatinasa, citrato de Simmons y fermentación de carbohidratos (arabinosa, celobiosa, sacarosa, inositol, manitol y sorbitol) y para las cepas identificadas como *Staphylococcus*, la fermentación de manitol y la prueba de coagulasa.

9.7. Identificación por la secuenciación parcial del gen que codifica para ARNr 16S

La extracción de ADN se realizó por la técnica AP (Monsalvo, 2006) modificada, y se encuentra descrita en el Anexo 1.

9.7.1. Extracción de ADN Método de AP.

La concentración y calidad del ADN extraído fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se reveló con bromuro de etidio 10 mg/mL. Fueron utilizados 3 µl de la suspensión de ADN y se mezcló con 1 µl de buffer de carga (Glicerol 30%, bromofenol .25% y xylene cyanol .25%) y se sembró en los pozos del gel. La electroforesis se corrió por 25 minutos a 100 volts con amortiguador TBE 1X (Tris base .089M, ácido bórico .089M y EDTA .002M) al finalizar, el gel fue observado en un transiluminador.

9.7.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizaron dos tipos de PCR, la primera consistió en el ADN purificado mediante la técnica de AP y el segundo tipo de reacción fue a partir de la técnica “*PCR colony*”.

La técnica de *PCR colony* consistió en resembrar las cepas en agar BHI y se incubaron por 24 a 48 horas, posteriormente en un tubo para microcentrífuga fueron colocados 20 µl de agua destilada estéril y se tomaron las colonias necesarias para alcanzar una densidad óptica correspondiente al tubo número 3 en la escala de McFarland (9×10^8 UFC/mL) y se colocó en una gradilla flotante a hervir durante 15 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo hasta que se congeló la muestra. Posteriormente se centrifugó a 15 000 RPM durante 1 minuto. Dos µl del sobrenadante se utilizaron para realizar la PCR.

Para ambos tipos de reacciones, se utilizaron los iniciadores de ARNr 16S RD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) y FD1 (AGAGTTGATCCTGGCTCAG) (Louws, 1999) (Sigma, USA). La solución mix y las condiciones del termociclador se muestran en el Cuadro 2

Cuadro 2: Contenido de la mezcla por muestra y Condiciones generales del termociclador

Soluciones	Mix 1X (25 μ l)	Condiciones de termociclador
Agua inyectable	X μ l	94° 4'
Buffer 10X	2.5 μ l	} 35 Ciclos
MgCl ₂	1.25 μ l	
dNTP'S	0.5 μ l	
FD/RD	2 μ l	
Taq	0.5 μ l	72° 7"
ADN genómico	X μ l	4 ∞
Total	25 μ l	

La cantidad de ADN utilizada para la reacción fue calculada por la concentración de la banda en el gel de agarosa, con la finalidad de adicionar aproximadamente 100 ng DNA de en cada PCR. De acuerdo al contenido de ADN de cada una de las muestras, se ajustó el agua inyectable para tener 25 μ l por reacción. Se utilizaron dos controles, un control positivo (ADN de *Escherichia coli* ATCC 25922) y un control negativo (Mix ajustado con agua inyectable) y se colocaron en un termociclador *My cube* marca Antarus biotech.

El producto de la PCR se observó en un gel de agarosa al 1% corrido a 100 Volts por 35 minutos y se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb. El gel fue teñido con bromuro de etidio 0.5 mg/mL y los resultados se observaron en un transiluminador.

9.7.3. Secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S

Los productos de PCR, fueron secuenciados en el laboratorio de bioquímica molecular en la Unidad de Biología y Prototipos de la FES-I con un secuenciador modelo ABI 3100 de 16 capilares. Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias disponibles en la base de datos del banco de genes GenBank, (disponible en línea en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se compararon para la identificación de las cepas aisladas.

10. Resultados

10.1. Características de la Población Muestreada

El presente estudio se realizó durante el periodo del mes de Mayo del 2010 a Enero del 2012, se analizaron un total de 104 muestras de lavados bronquiales, correspondientes a pacientes que asistieron a la unidad de neumología del Hospital General de México, para ser sometidos al procedimiento de lavados bronquiales. El 77% (80) fue representado por hombres y el 23% (24) a mujeres entre 14 y 73 años de edad, teniendo una mediana de 42 años. Los pacientes pertenecían principalmente a las unidades de infectología, neumología y medicina interna. De la población muestreada, 73 pacientes además del padecimiento de vías respiratorias, presentaban una enfermedad crónico degenerativa: 63 con VIH y 10 presentaban algún tipo de cáncer. Del total de la población, solo se tiene el diagnóstico por el cual fueron sometidos a lavados bronquiales de 64 pacientes, los diagnósticos se describen en el cuadro 3. Se puede apreciar que el diagnóstico con mayor frecuencia fue el de Tuberculosis asociada a pacientes VIH positivos, seguido por el diagnóstico de pacientes con infección no tuberculosa o alguna sintomatología por la que se sospechaba de una infección (Pneumosis, Aspergiloma, Neumonía adquirida en la comunidad, fiebre de origen oscuro, neumonía basal, entre otros). Dentro de la categoría de diagnóstico "otros", se encuentran los casos que solo fueron reportados en una sola ocasión y que no se podían incluir en las categorías antes mencionadas, en estos se encuentran por ejemplo: atelectasia, derrame pleural y pérdida de peso sin causa aparente.

Cuadro 3. Diagnósticos en los pacientes participantes en el estudio en el periodo de muestreo Mayo 2010- Enero 2012

Diagnóstico	Casos
VIH y tuberculosis pulmonar o miliar	19
Infección no tuberculosa o síntomas de infección. (Hemoptisis, aspergiloma, pneumocistosis, neumonía basal, fiebre de origen oscuro, etc.)	14
Algún tipo de cáncer (cáncer broncogénico, linfoma, sarcoma de Kaposi, metástasis pulmonar)	10
Tuberculosis pulmonar, meníngea o miliar	9
VIH asociado a otros padecimientos (toxoplasmosis, neumocistosis, candidiasis esofágica, etc)	7
Otros (pérdida de peso sin causa aparente, atelectasia izquierda, derrame pleural derecho, nódulo pulmonar solitario y neuropatía intersticial)	5

10.2. Cultivos de lavados bronquiales de pacientes con una infección activa.

Del total de muestras obtenidas, el 45.19% (47/104) presentó crecimiento bacteriano mayor o igual a 1×10^4 UFC/mL, de los cuales el 27.65% (13/47) fueron cultivos mixtos principalmente de 2 tipos de bacterias. Por morfología colonial se lograron diferenciar 61 aislamientos que representaban ser una infección activa en el paciente, pues superaron 1×10^4 UFC/mL (Wu *et al.* en 2002). El conteo se realizó en agar sangre, para cada diferente tipo de colonia, fueron resembradas y etiquetadas con el código de cepa. Las muestras procesadas que presentaron un conteo bacteriano por debajo del criterio $>1 \times 10^4$ UFC/mL (5/104) no se contemplaron para el estudio.

Posterior a la descripción de la morfología colonial y resembró en el agar de donde se obtuvo el primo aislamiento, se determinó la morfología celular por tinciones de Gram, y se separaron de la siguiente manera: 27 bacterias fueron bacilos Gram negativos, 1 correspondió a cocos Gram negativo y 33 a cocos Gram positivos. Los resultados del total de UFC por grupo de cepas bacterianas

de acuerdo a la tinción de Gram se encuentra en la Figura 2 y 3, en estas se muestran las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mililitro en escala logarítmica de lavado bronquial por paciente de acuerdo a las morfologías coloniales. En la figura 2 se muestran los aislamientos de bacterias Gram negativas, el aislamiento etiquetado como GMO1 fue el que presentó mayor número de UFC/mL en el lavado original teniendo un total de $3.2 \text{ UFC} \times 10^9$, seguido del aislamiento ZGI2 con $2.9 \text{ UFC} \times 10^9$. El paciente con siglas LGB1 tuvo menor UFC/mL con un valor de $1 \text{ UFC} \times 10^4$. En la figura 3, donde se muestran las bacterias Gram positivas, el aislamiento ZGI1 fue la que presentó mayor número de UFC/mL en el lavado bronquial con $6 \text{ UFC} \times 10^6$, seguido del aislamiento ZFJ con $3.67 \text{ UFC} \times 10^6$. CMA1 fue la que tuvo menor abundancia con un valor de $1 \text{ UFC} \times 10^4$.

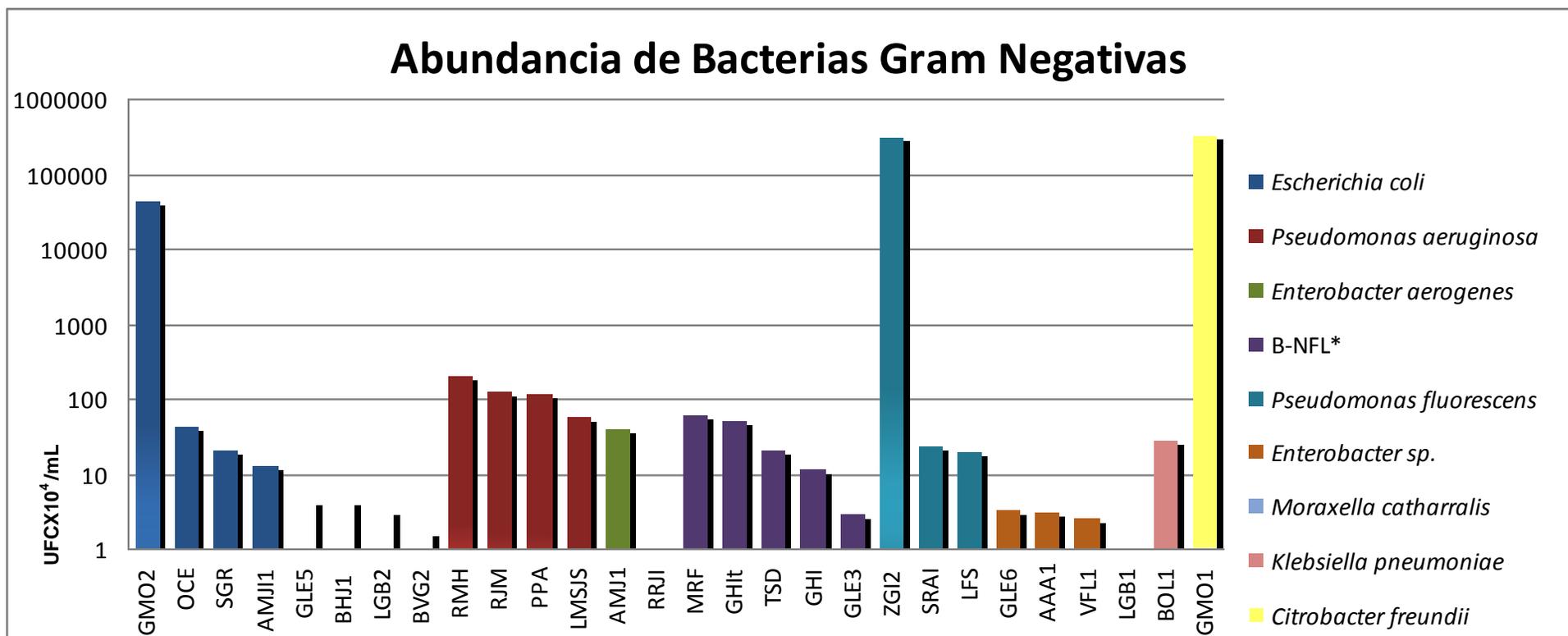
10.3. Aislamiento e identificación por morfología colonial y por pruebas bioquímicas

Con base a la morfología colonial se diferenciaron doce crecimientos bacterianos, su descripción se muestra en el Cuadro 4. Las colonias del número 1 al número 7 son descritas con base al crecimiento que se observó en agar MacConkey, mientras que las colonias restantes se describen el crecimiento en agar sangre.

Con respecto a la diversidad de especies, se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación presuntiva de los diferentes aislamientos. En el Cuadro 5, se muestran los resultados de las pruebas generales, así como de la fermentación de los carbohidratos para la identificación de bacterias Gram negativas y en el Cuadro 6, se muestran los resultados para las pruebas generales, así como de la fermentación de manitol y prueba de coagulasa para los microorganismos Gram positivos. Con base a estas pruebas se logró la determinación de 11 géneros y 15 especies bacterianas.

Dentro de la población de estudio, los pacientes con VIH fueron los más representativos que cursaban con infecciones respiratorias (63/104), el 38% de

estos pacientes (24/63) presentaban una infección activa, siendo *Streptococcus* sp. 2, *E. coli* y *P. aeruginosa* los patógenos que se presentaron con mayor frecuencia y cabe destacar que solo en pacientes seropositivos se presentaron aislamientos de *P. aeruginosa*, *C. freundii* y *K. pneumoniae* por mencionar algunas.



*Bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa

Figura 2. Unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro por paciente de bacterias Gram negativas en escala logarítmica aisladas a partir de lavados bronquiales por paciente de acuerdo a las morfologías coloniales.

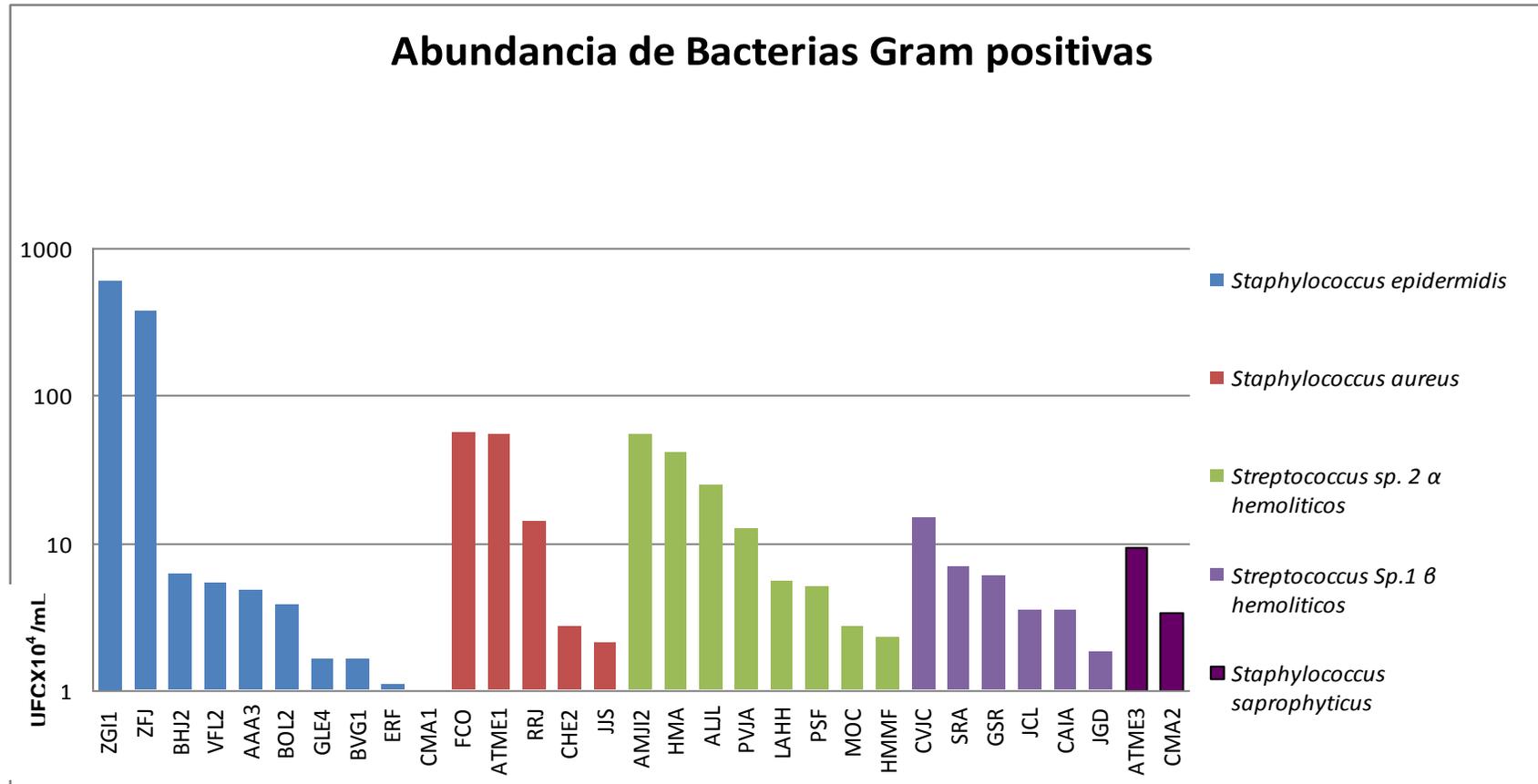


Figura 3. Unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro por paciente de bacterias Gram positivas en escala logarítmica aisladas a partir de lavados bronquiales por paciente de acuerdo a las morfologías coloniales.

Cuadro 4. Morfología colonial de las bacterias aisladas en lavados bronquiales de pacientes de la unidad de Neumología del Hospital General de México

Numero de colonia	Total de aislamientos	Color	Tamaño*	superficie	Forma	Borde	Otros Detalles
1	7	Fermentadoras de lactosa (Rosas) ●	mediana	plano-convexa	circular	redondeado	—
2	6	Fermentadoras de lactosa (Rosas) ●	grande	convexa	circular	redondeado	en el centro se presenta punta de color blanco
3	1	Fermentadoras de lactosa (Rosas) ●	Muy grande	convexa	circular	redondeado	colonia mucosa
4	1	Fermentadoras de lactosa (Rosas) ●	pequeña	convexa	irregular	Ondulado	—
5	2	No fermentadoras de lactosa (Violeta) ●	mediana	convexa	circular	redondeado	Presenta dificultad para crecer a 37° C, sin embargo a temperatura ambiente crece de manera optima.
6	6	No fermentadoras de lactosa (Violeta) ●	pequeña	convexa	circular	redondeado	—
7	4	No Fermentadoras de lactosa (Violeta) ●	mediana	aplanada	irregular	Ondulado	algunas cepas presentan pigmentos verdes y todas presentan aroma a uvas
8	1	Blanca	pequeña	convexa	circular	redondeado	—
9	10	Blanca	mediana	convexa	circular	redondeado	—
10	8	Blancas y algunas amarillas después de 24-48 horas en incubación	mediana	convexa	circular	redondeado	—
11	8	α hemolítica	Muy pequeña	convexa	puntiforme	redondeado	—
12	7	β hemolítica	Muy pequeña	convexa	puntiforme	redondeado	—

*tamaño de acuerdo a Madigan *et al.* 2003 ● Descrito de acuerdo al crecimiento característico en agar MacConkey

Cuadro 5. Pruebas bioquímicas de bacterias Gram negativas aisladas de lavados bronquiales

código de cepa	BHJ1	GHI	AMJ1	LGB!	LGB2	OCE	ZG12	SGR	GHI!	AAA1	VFL1	LFS	RRJ1	GLE3	GLE5	GLE6	TSD	BVG1	SRA1	BOL1	GMO1	GMO2	LMSJS	PPA	RMH	RJM	MRF	AMJ2	
PRUEBAS GENERALES																													
forma/ Gram	B-	B-	B-	C-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SH2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Indol	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Kligler	ac/ac	al/al	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	al/al	ac/ac	al/al	ac/al	ac/al	al/al	ac/al	al/al	ac/ac	ac/al	al/al	ac/al	al/al	ac/al	al/al	ac/al	ac/ac	ac/ac	al/al	al/al	al/al	al/al	ac/ac
Oxidativo	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fermentativo	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CARBOHIDRATOS																													
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Sorbitol	+	-	+		+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Identificación de las bacteria por pruebas bioquímicas	<i>Escherichia coli</i>	* BNFL	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Escherichia coli</i>	* BNFL	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	* BNFL	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	* BNFL	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	* BNFL	<i>Escherichia coli</i>	

* BNFL Bacilos no Fermentadores de la lactosa

Cuadro 6. Pruebas bioquímicas de bacterias Gram positivas aisladas de lavados bronquiales

código de cepa	BHJ12	AMJ2	ZG11	ZFJ	AAA3	RRJ	GSR	JGD	VFL2	CHE1	LAHH	GLE34	ATME1	ATME3	CMA1	CMA2	JJS	HMA	BVG2	CVJC	SRA	HMMF	MOC	PSF	ALJL	PVJA	BOL2	JCL	ERF	CNA1	FCO	ADLLMC	AMJ2			
PRUEBAS GENERALES																																				
forma/ Gram	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+		
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
SH2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Kligler	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	ac/ac	
Oxidativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fermentativo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Manitol	-	-	-	-	-	+	*	*	-	+	*	-	+	+	-	+	+	*	-	-	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	
Coagulasa	-	-	-	-	-	+	*	*	-	+	*	-	+	+	-	+	+	*	-	-	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	
Identificación de las bacteria por pruebas bioquímicas	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sp. 1</i>	<i>Streptococcus sp. 1</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sp. 2</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sp. 2</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus sp. 1</i>	<i>Streptococcus sp. 1</i>	<i>Streptococcus sp. 2</i>	<i>Streptococcus sp. 1</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus sp. 1</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus sp. 1</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sp. 1</i>	<i>Streptococcus sp. 2</i>										

* Prueba no realizada por perdida de viabilidad de las cepas

10.4. Identificación por secuenciación del gen que codifica para ARNr 16S.

Posterior a la identificación por bacteriología clásica, se realizaron las extracciones de ADN de las cepas con la excepción de las que tenían los códigos GSR1, JGD1, CVJC, SRA, CAIA, LAHH, HMA, MOC, PSF, ALJL y PVJA, pues no sobrevivieron a la preservación con caldo BHI y glicerol al 40%. Estas cepas solo fueron identificadas presuntivamente por morfología colonial y microscópica dentro del género *Streptococcus* cuya característica principal que se considero para la ubicación taxonómica fue la hemólisis que presentaba en agar sangre, de tal manera que se denominó como *Streptococcus sp1* si realizaban hemólisis completa y *Streptococcus sp2* si la colonia presentaba hemólisis α . Las cepas con código ADLLMC y AMJI2 fueron preservados por medio de una cosecha bacteriana que consistió en colocar 2 mL de solución salina estéril en placas de agar sangre sembradas masivamente, raspar y centrifugar la suspensión bacteriana para posteriormente ser colocada en crioviales que contenían eritrocitos de carnero y glicerol al 40% a una proporción de 1:1, estas cepas si sobrevivieron a la criopreservación, por lo tanto, se sugiere que sea utilizado este medio de preservación para otros estudios donde se tengan aislamientos del género *Streptococcus*.

Se realizó la PCR a partir de la extracción de ADN y por PCR *colony*. Se detectó el gen que codifica para el ARNr 16S por PCR punto final, utilizando los oligonucleótidos FD1 y RD1. En todas las cepas que se procesaron, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1500 pb (Figura 5).

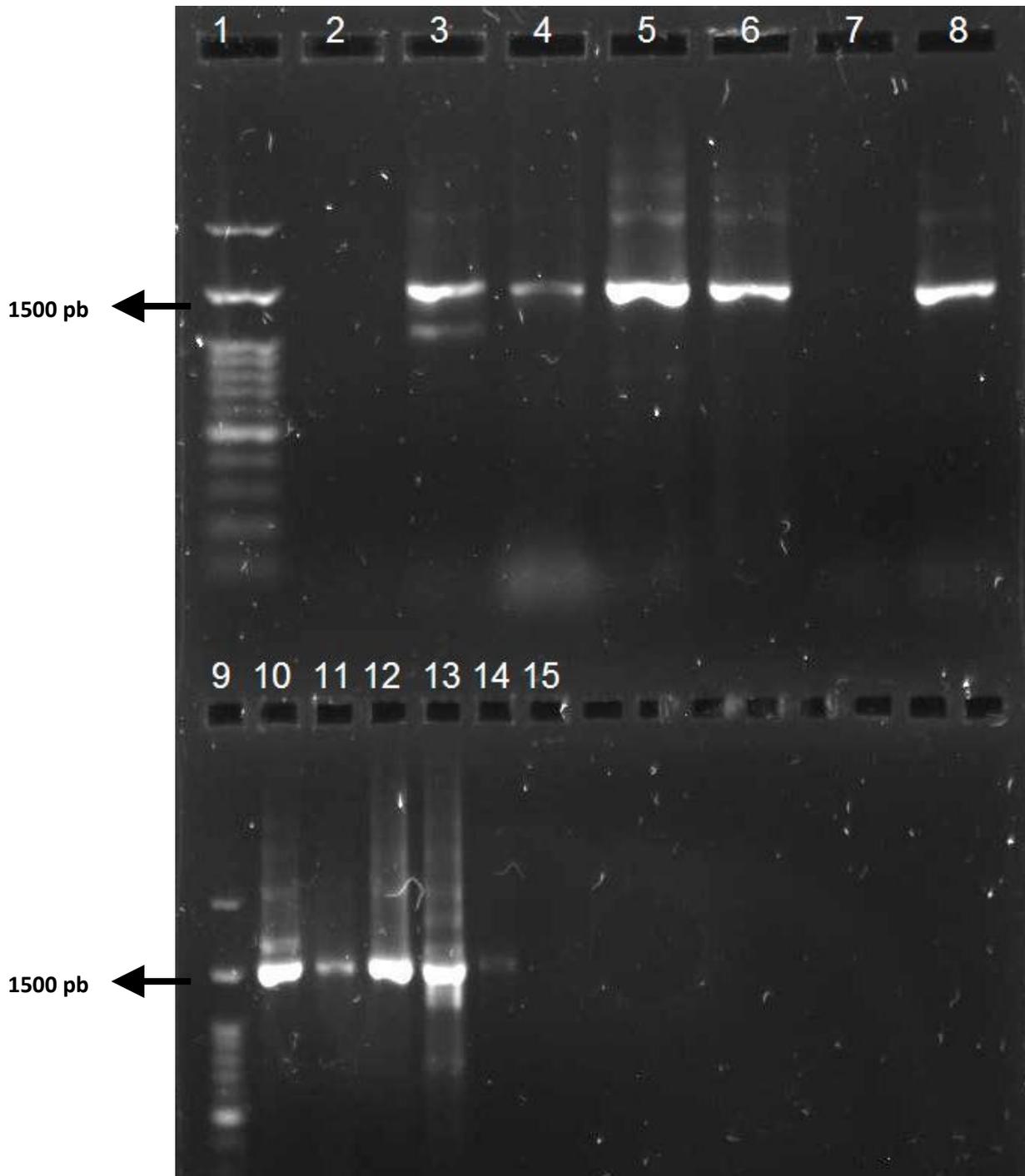


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 Volts, 35 min. Teñidos con bromuro de etidio) de los productos de la PCR con los oligonucleótidos FD1/RD1: carril 1. Marcador de peso molecular, 2. Vacío, 3. AAA1 (*Enterobacter sp.*), 4 LGB2 (*Escherichia coli*), 5.SGR (*Escherichia coli*) 6. BHJ1 (*Escherichia coli*), 7. Control negativo 8. Control positivo ADN *Escherichia coli* ATCC 25922 9. Marcador de peso molecular, 10. OCE (*Escherichia coli*) 11. PPA (*Pseudomonas aeruginosa*) 12. VFL1 (*Staphylococcus epidermidis*) 13. GLE5 (*Escherichia coli*) 14. ATME1 (*Staphylococcus aureus*) y 15. Control negativo.

El producto de la PCR se secuenció y se obtuvieron los nucleótidos que estaba constituido el gen que codifica para el ARNr 16S en cada cepa y se compararon 700 bases con mejor calidad con las secuencias que se encuentran disponibles en la base de datos del “GenBank” se seleccionó la primer bacteria que aparecía en el listado y por lo tanto la que tenia mayor porcentaje de homología (Figura 6). En el Cuadro 7, se muestra tanto la identificación por la secuenciación parcial del gen que codifica para ARNr 16S como los resultados de la identificación por pruebas bioquímicas.

Citrobacter freundii strain CL43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [gb|KM269033.1](#) Length: 1052 Number of Matches: 1

Range 1: 508 to 1044 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
987 bits(534)	0.0	536/537(99%)	0/537(0%)	Plus/Minus
Query 1	GCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGC			60
Sbjct 1044	GCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGC			985
Query 61	GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGA			120
Sbjct 984	GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGA			925
Query 121	TTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGG			180
Sbjct 924	TTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGG			865
Query 181	TCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCC			240
Sbjct 864	TCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCC			805
Query 241	CTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAATCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGG			300
Sbjct 804	CTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAATCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGG			745
Query 301	CAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTT			360
Sbjct 744	CAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTT			685
Query 361	GCGGGACTTAACCCAACATTTCAACAACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTC			420
Sbjct 684	GCGGGACTTAACCCAACATTTCAACAACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTC			625
Query 421	AGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAA			480
Sbjct 624	AGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAA			565
Query 481	GGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG			537
Sbjct 564	GGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG			508

Figura 6. Blast que correspondiente a la cepa con código GMO1, caracterizada por pruebas bioquímicas y por el análisis parcial del gen que codifica para ARNr 16S como *Citrobacter freundii*.

Cuadro 7. Identificación con base en la comparación de las secuencias obtenidas a partir de las cepas aisladas y las secuencias dadas de alta en el GenBank. Se muestra la correlación de la identificación entre secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S y las pruebas de bacteriología clásica.

Código de Cepa	Porcentaje de homología	Identificación por ARNr 16S	Identificación por pruebas Bioquímicas	Código de Cepa	Porcentaje de homología	Identificación por ARNr 16S	Identificación por pruebas Bioquímicas
BHJ1	99	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	GLE6	99	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter sp.</i>
BHJ2	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATME1	99	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
GHI	99	<i>Acinetobacter baumannii</i>	BNFL*	ATME3	98	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
AMJ1	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	TSD	99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BNFL*
AMJ2	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CMA1	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
OCE	99	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	CMA2	99	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
ZG11	93	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	JJS	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ZG12	99	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BVG1	99	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
SGR	99	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	BVG2	85	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
GHI1	99	<i>Acinetobacter baumannii</i>	BNFL*	SRA1	99	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
LGB1	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	BOL1	99	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LGB2	91	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	BOL2	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
ZFJ	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ERF	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
AAA1	98	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	GMO1	99	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
AAA3	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GMO2	99	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
RRJ	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	LMSJS	92	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
VFL1	87	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	PPA	99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
VFL2	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RMH	98	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LFS	92	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RJM	99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RRJ1	94	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	MRF	99	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	BNFL*
CHE2	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	FCO	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
GLE3	99	<i>Acromobacter xylooxidans</i>	BNFL*	ADLLMC	99	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus sp1</i>
GLE4	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AMJ11	95	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GLE5	95	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	AMJ12	99	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus sp2</i>

*BNFL Bacilos no Fermentadores de la lactosa

La identificación por medio del gen que codifica para el ARNr 16s ayudó a confirmar y en algunos casos a ubicar taxonomicamente cepas que por pruebas convencionales fueron difíciles de ubicar, las cuales correspondían principalmente a bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa.

Los criterios para determinar la identificación de una cepa dependían del porcentaje de similitud que tuvieran en el BLAST. Se determinó como especie taxonómica a aquellas bacterias que tuvieran una similitud $\geq 99\%$ y si el porcentaje es de entre 98-95%, la caracterización se quedaba hasta nivel de género y si era $< 95\%$, la ubicación taxonómica quedaba a nivel de familia. De acuerdo a esto, el 69% fueron identificadas como especie, el 14% hasta género, y el 17% se identificaron como familia.

Con base a las características de bacteriología clásica y la identificación por la secuencia parcial del ARNr 16S, se realizó una evaluación de la identificación con ambos criterios, para tomar la decisión de la identificación final y definitiva de las bacterias, y esto se muestra en la Figura 7.

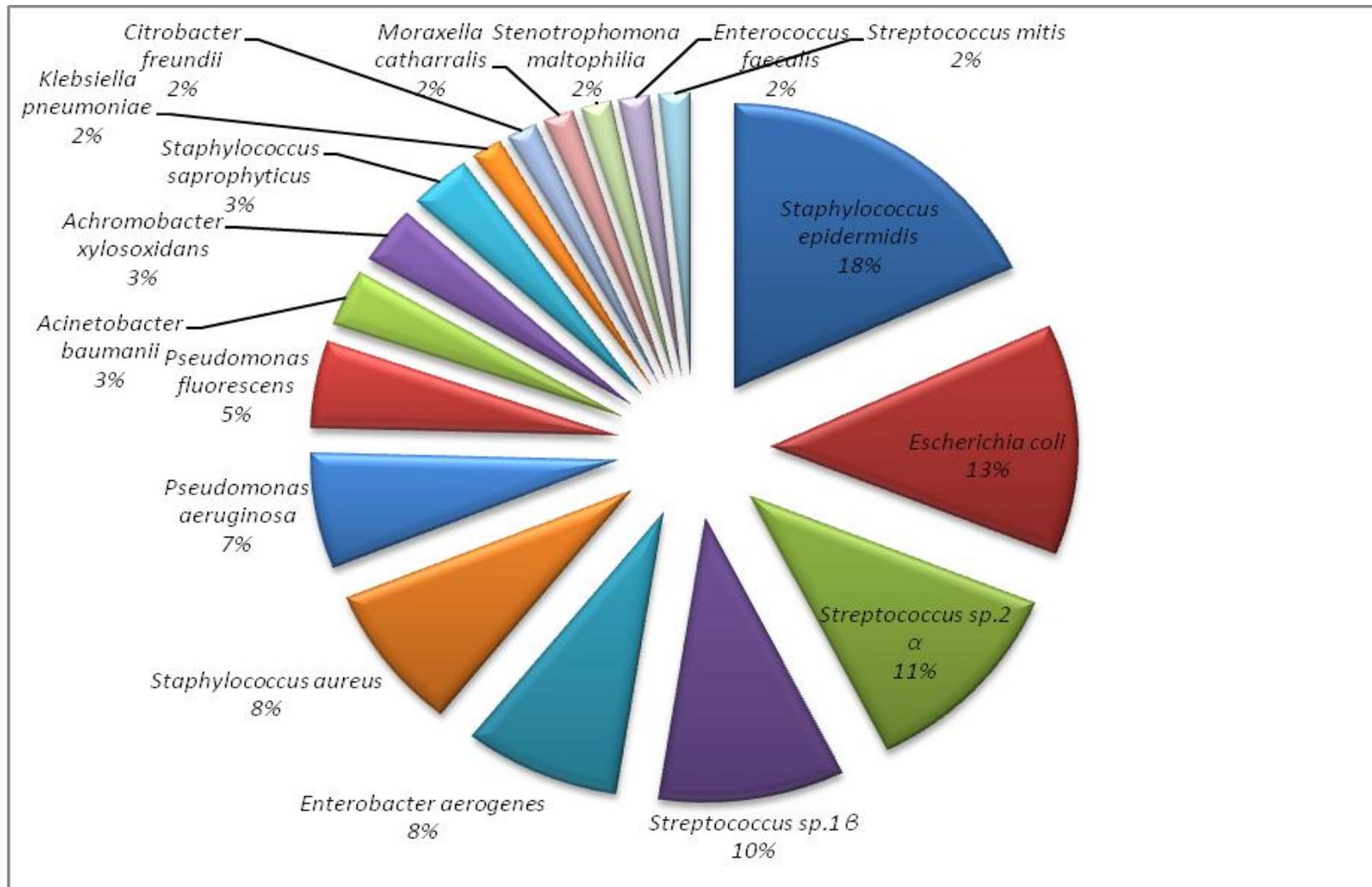


Figura 7. Frecuencia de bacterianas aisladas de lavados bronquiales de acuerdo a la evaluación hecha a partir de la identificación por pruebas bioquímicas y secuenciación del gen que codifica para la ARNr 16S.

11. *Discusión*

En el presente trabajo, se realizaron cultivos cuantitativos en lavados bronquiales de pacientes ambulatorios e internos del Hospital General de México. Las bacterias aerobias aisladas y cuantificadas a partir de los lavados bronquiales se identificaron por pruebas de bacteriología clásica y por la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S.

11.1. *Obtención de muestra y descripción de la población.*

Las técnicas fibrobroncoscópicas permiten al médico explorar el árbol bronquial, para la obtención de muestras del tracto respiratorio ya sea de lesiones tumorales, o estudios microbiológicos; para estos últimos, los lavados y cepillados bronquiales, son las técnicas utilizadas para la detección de patógenos responsables de neumonía. La principal ventaja que tiene los cepillados sobre los lavados bronquiales es que en los cepillados la probabilidad que exista una contaminación por la flora orofaríngea es menor. El cepillo está completamente protegido y es expuesto solo cuando se llega a la zona donde se encuentra la infección, mientras que en el lavado bronquial, la sonda pasa por la nariz y/o garganta, pudiendo arrastrar parte de la flora de la orofaringe (Housset, 2001).

Con la finalidad de conocer los resultados de la técnica de cepillados bronquiales, en este trabajo, 7 pacientes fueron sometidos a la toma de muestra tanto de lavado como de cepillado bronquial, las 7 muestras de los cepillados fueron negativas, mientras que los cultivos de la muestra de lavado bronquial de los pacientes con código CAIA y FCO tuvieron crecimiento bacteriano mayor a 1×10^4 . El que no se aislaron bacterias en la muestra de cepillado bronquial de los pacientes con código CAIA y FCO, se pudiera deber a que las muestras proporcionadas como cepillados, sólo presentaba la solución salina con la que se realiza el cepillado, y no la punta del cepillo con el que se tomó la muestra, ya que Wu *et al.* en 2002, para el análisis de muestras de cepillado protegido, colocaron la punta del cepillo en 1 mL de solución salina fisiológica para posteriormente realizar las diluciones seriadas, y el 48% de los

cepillados originaron cultivos positivos. Es importante considerar en hacer un estudio en donde se compare un mayor número de muestras tanto de lavados como de cepillados bronquiales.

La población fue de 104 muestras de pacientes que cursaban con algún tipo de infección pulmonar, este es un numero similar al reportado por Estella *et al.* 2008 quienes muestrearon 96 pacientes con neumonía adquirida por ventilación mecánica. Las muestras de lavados bronquiales en su mayoría (52) provenían de pacientes VIH positivos que presentaban algún trastorno respiratorio. Es bien sabido que estos pacientes son más vulnerables a la adquisición de diversas infecciones, resultando en ocasiones en neumonías. Por esto sería interesante delimitar la población a este tipo de pacientes con un mayor número de muestras para que se tuviera mas precisión en la incidencia de bacterias de este grupo de pacientes, ya que en este estudio, se aislaron bacterias como *Citrobacter freundii* que no fueron aisladas de pacientes VIH negativos. Si aumentara la población muestreada, se podrían aislar una mayor diversidad de bacterias, como es el caso de *C. freundii*, y con esto poder elaborar un mejor esquema de administración de antibióticos para así disminuir la tasa de mortalidad por neumonía de pacientes VIH positivos.

11.2. Cultivos de lavados bronquiales de pacientes con una infección activa.

Debido a la contaminación orofaríngea que pudiera ocurrir en la toma de muestra de los lavados bronquiales, los cultivos cuantitativos se han usado para diferenciar a los microorganismos contaminantes presentes en baja cantidad de organismos causantes de una infección activa que se encuentran en mayor concentración.

El límite para considerar a una bacteria como responsable de una infección activa es de 1×10^4 UFC/mL (Wu *et al.* 2002; Weyland *et al.* 2011; El Solh *et al.* 2007). En la revisión bibliográfica hecha para la realización de esta tesis, no se reportan las UFC/mL de cada uno de los aislamientos registrados, solo se sabe que esa bacteria superaba los puntos de corte para poder considerarla como responsable de la infección. El punto de corte de 1×10^4 y en ocasiones el

criterio cambia según las condiciones del paciente, por ejemplo disminuye a 1×10^3 con pacientes que están recibiendo tratamiento de antibióticos o para cepillados bronquiales, por lo que es importante realizar estudios donde se reporte tanto las bacterias causantes de neumonía por paciente, como las UFC para cada bacteria como se muestra en la Figura 2 y 3.

En el presente estudio el 5% de los lavados bronquiales se obtuvo el crecimiento de algunas colonias consideradas como contaminantes, pues las UFC/mL tuvieron un crecimiento menor a 1×10^4 . Estas colonias no fueron identificadas por pruebas bioquímicas, sin embargo por morfología colonial en agar S110 y agar MacConkey fueron caracterizadas como: *S. aureus*, Enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa, y estos mismos patógenos fueron reportados por Jourdain *et al.* en 1997, como especies contaminantes, pues se encontraban en una concentración inferior a 1×10^4 UFC/mL por lo tanto no pueden consideradas como una infección activa.

Se determinó como infección activa o cultivo positivo cuando en las placas se presentaron crecimiento $\geq 1 \times 10^4$ UFC en los lavados bronquiales. Del total de lavados bronquiales procesados, el porcentaje del crecimiento bacteriano positivo fue de 45.19%, que puede ser comparado con el que realizaron Zaccard *et al.* en 2009, quienes describieron 48.8% de cultivos positivos a partir de 798 lavados broncoalveolares, cabe destacar que la población muestreada en el presente trabajo fue siete veces menor al de Zaccard *et al.* (2009). Estella *et al.* (2008) reportaron que el 41% de los lavados bronquiales que se revisaron, originaron cultivos positivos. Aunque la mayor parte de estudios reportan un porcentaje más elevado de lavados bronquiales positivos (El Solh *et al.*, 2007, Cle'h *et al.*, 2006, Weyland, *et al.* 2011).

Las diferencias en los porcentajes de cultivos positivos se pueden deber a diferentes factores entre los que se encuentra el tamaño de muestra, la terapia antimicrobiana y el tipo de muestra, dado que las muestras procesadas fueron de lavados bronquiales y no lavados broncoalveolares como se reportan en otros estudios (Zaccard *et al.* en 2009, Weyland, *et al.* 2011, Carvalho *et al.* 2008). La diferencia que existe entre los lavados bronquiales y broncoalveolares consiste en el sitio anatómico donde es colocado la punta del

broncoscopio, en el primero es colocado en la zona afectada del árbol bronquial, mientras que el segundo la punta del broncoscopio es colocado directamente en los alvéolos de la zona afectada, y succiona pequeñas cantidades de suero fisiológico instilado en las vías respiratorias (Escribano, *et al.* 2005), a pesar de esto, en el presente estudio, se pudo ver que los lavados bronquiales pueden ser una técnica empleada para el diagnóstico de neumonías, sin embargo, no se puede hacer una comparación con otros reportes donde los lavados bronquiales sean analizados, ya que no se encontraron reportes previos.

Aunado a lo anterior, es importante considerar un estudio citológico en el que se evalúa la calidad de toma de muestra del lavado bronquial; consiste en hacer un frotis del lavado bronquial y observar a 25X la presencia de un número mayor a 25 células polimorfonucleares, menos del 1% de células ciliadas y menos de 10 células epiteliales por campo. En un lavado debe cumplir con estas características, de no ser así, se descarta y se debe realizar una nueva toma de muestra (Allaouchiche *et al.* 1999). Esto llevaría al procesamiento de muestras que no cumplían con las características mencionadas, y por lo tanto originan cultivos negativos.

La exposición previa a los antimicrobianos en los pacientes también afecta la cantidad de cultivos positivos y las UFC/mL disminuyen a 1×10^3 UFC/mL Weyland *et al.* en 2011 reportaron que los pacientes sin tratamiento antimicrobiano previo presentan cultivos positivos en el 83% de los casos, mientras que aquellos pacientes que recibían un tratamiento antimicrobiano presentaron el 74% de cultivos positivos. En la presente investigación, se desconoce si algún individuo considerado en el estudio estuvo bajo terapia antimicrobiana, lo que podría sumarse al hecho de tener cultivos positivos menor a lo reportado por otros autores.

11.3. Aislamientos bacterianos

Las bacterias que representaron una infección activa y que se aislaron en un porcentaje mayor (54%), correspondieron a bacterias Gram positivas. De acuerdo a Luna *et al.* en 2005, esto pudiera estar asociado con la etiología de neumonía adquirida en la comunidad o con la neumonía nosocomial temprana,

la cual aparece en los primeros días de ingreso al hospital y es causada por bacterias colonizadoras de la orofaringe, como *S. pneumoniae* y *S. aureus* entre otras bacterias que pudieron ser aisladas en este estudio.

11.3.1. Aislamiento de bacterias Gram positivas

Staphylococcus epidermidis fue la bacteria que se aisló con mayor frecuencia durante el tiempo en el que se realizó este trabajo, Carvalho *et al.* 2008 reportaron un solo aislamiento de *S. epidermidis* de 22 muestras, mientras que Weyland *et al.* en 2011 publicaron un aislamiento de esta bacteria, asociada a cultivos mixtos: un caso con *S. aureus*, otro con *P. aeruginosa*, y uno más con *S. maltophilia* y *Acinetobacter sp.*. En este estudio, se pudo aislar tanto en monocultivos, como en cultivos mixtos: se encontró asociada a *E. coli*, *E. aerogenes* *P. fluorescens*, a *Enterobacter sp.* en dos casos, y se aisló con *E. coli* y *A. xylosoxidans* en un paciente. Flores en 2007 reportó dos casos de *S. epidermidis* en pacientes del Hospital General de México con neumonía nosocomial.

Se considera que *S. epidermidis* es una bacteria poco frecuente en el tracto respiratorio inferior, todavía se desconoce el papel que juega *S. epidermidis* en las infecciones respiratorias o en particular si las cepas que fueron aisladas en este estudio presentan características especiales como lo es por mencionar alguna la resistencia a los antibióticos que hicieran que *S. epidermidis* fuera la bacteria más frecuentemente aislada. Pese a esto, *S. epidermidis* fue reportado como principal agente etiológico de neumonía en una paciente con linfoma de Hodgkin's (Muto, *et al.* 2006).

Otros de los patógenos Gram positivos aislados, fueron los *Streptococcus sp. 1* (β hemolíticos) y *sp2.* (α hemolítico) la identificación por las pruebas bioquímicas utilizadas ayudaron a clasificar a nivel de género, pero la identificación no se pudo completar por ARNr 16S, pues las cepas no sobrevivieron a la criopreservación y solo se ubicaron a nivel taxonómico de género y fueron caracterizadas como *sp1* (β hemolíticos) y *sp2.* (α hemolítico) de acuerdo a la hemólisis que presentaron. Para próximos estudios es necesario preservar los *Streptococcus* de la misma forma en la que fueron conservadas las cepas AMJI2 y ADLLMC que consistió en colocar en un

criobial 500 μ l de eritrocitos de carnero y 500 μ l de glicerol al 40% y almacenar a -20° C para completar las pruebas fenotípicas y genotípicas.

Dentro de los *Streptococcus* β hemolíticos que han podido recuperar de lavados bronquiales se encuentra los *Streptococcus* del grupo B, (Forsslöw *et al.*, 2010). Una especie que se encuentra dentro de este grupo es *S. agalactiae* que Dancewicz *et al.* en 2009 aisló como bacteria colonizadora y potencialmente patógena en el tracto respiratorio inferior de pacientes con cáncer pulmonar, Estella *et al.* en 2008 aislaron *S. agalactiae* en muestras de lavados broncoalveolares de pacientes sometidos a ventilación mecánica tardía y Pérez *et al.* en 2011 publicó *S. agalactiae* en lavados broncoalveolares de pacientes infectados por VIH.

Otro grupo de *Streptococcus* que presenta hemólisis completa y que ha sido aislado en lavados bronquiales son los del grupo D llamados actualmente como *Enterococcus*. Los *Enterococcus* comúnmente se encuentran como comensales en el intestino de los humanos, sin embargo en pacientes hospitalizados causa importantes infecciones, como sepsis en neonatos y en ocasiones ha estado asociado a neumonía (Brooks *et al.* 2004). Destacan las especies de *Enterococcus faecalis*, y *E. faecium* (Estella *et al.*, 2008, Forsslöw *et al.*, 2009 y Slatter *et al.*, 2007). De acuerdo al análisis de la secuencia parcial del gen que codifica para ARNr 16S, en este estudio se aisló una cepa de *E. faecalis*. El resto de cepas con pruebas de bacteriología clásica similar quedaron pendientes de identificar.

En el caso de Flores, 2007, no hace referencia de ningún aislamiento de *Streptococcus* β hemolítico, pero reporta aislamientos que podrían coincidir con los *Streptococcus sp. 2* (α hemolíticos) que se aislaron en este estudio. Los *Streptococcus* que Flores describe en sus resultados y que presentan hemólisis α son *S. pneumoniae* y *S. viridans* lo que coincide con Zhang *et al* en 2012, quienes aislaron especies de *S. viridans* en lavados bronquiales de niños con infección pulmonar en China.

Diversas publicaciones demuestran el aislamiento de *S. pneumoniae* como el principal agente etiológico de la Neumonía Adquirida en la Comunidad

(Blanquer y Sanz, 2010; Luna *et al.*, 2000). El Solh *et al.* en 2007 reportaron a *S. pneumoniae* como la segunda especie mas frecuentes en pacientes diagnosticados con neumonía relacionada a cuidados de enfermería en casa. Esto indicaría que el origen de la infección es extrahospitalaria, aunque esta bacteria también ha sido aislada en artículos de neumonía nosocomial, pero la incidencia baja según los días de hospitalización que tengan los pacientes (Weyland *et al.* en 2011).

Estella *et al.* en 2008, aisló una cepa de *S. pneumoniae* y esta correspondió a los pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica precoz. Similar a lo reportado por Weyland *et al.* en 2011, pues *S. pneumoniae* fue aislado con baja frecuencia y se relacionó con neumonía precoz. La baja frecuencia también fue reportada por Fujitani *et al.* en 2009. Esto hace pensar que los pacientes a los cuales se les aisló *Streptococcus sp2* en este estudio, presentaban pocos días de hospitalización o en su defecto fue una neumonía que adquirieron fuera del hospital.

Staphylococcus aureus es considerado uno de los patógenos con mayor número de aislamientos asociados a infecciones respiratorias, de hecho Luna *et al.*, (2005) lo describe como el principal patógeno Gram positivo causante de neumonía nosocomial en América Latina, esto coincide también con lo reportado por Weyland *et al.* en 2011 en un Hospital de Argentina, contrario a lo que se presentó en este trabajo, pues solo el 8% de los casos (5 pacientes) se les aisló esta bacteria, Flores en 2007, reporta que en el Hospital General se aisló *S. aureus* en un porcentaje superior de al de este estudio (17.3%), siendo el tamaño de muestra de 52 pacientes.

11.3.2. Aislamiento de bacterias Gram negativas

Las muestras de lavados bronquiales con crecimiento de bacterias Gram negativas $\geq 1 \times 10^4$ UFC/mL, coinciden con los reportes revisados, ya que en gran parte de ellos se han aislado Enterobacterias, bacilos no fermentadores de lactosa como *Acinetobacter sp.* o especies de *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* y en algunos casos también ha sido reportada *Moraxella catarrhalis*.

Las bacterias Gram negativas que se aislaron con mayor frecuencia durante este estudio corresponden a enterobacterias, aunque Luna *et al.* en 2005 reportaron que en Latinoamérica las neumonías nosocomiales causadas por bacterias Gram negativas son constituidas principalmente por especies de *Acinetobacter* mientras que las enterobacterias constituyen el segundo lugar dentro de los patógenos Gram negativos que causan neumonía.

En este estudio, se aislaron miembros de la familia Enterobacteriaceae con los géneros: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia* siendo este último el que se aisló con mayor frecuencia. Esto coincide con lo que reporta Flores en 2007, que sugiere que *E. coli* es uno de las principales agentes etiológicos de las infecciones respiratorias en el Hospital General de México. Sería interesante darle continuidad a este estudio, con una mayor población y tiempo para poder confirmar que *E. coli* es uno de los principales patógenos causantes de neumonía en el Hospital General de México. *E. coli* también ha sido reportada en otros estudios, por ejemplo Forslow *et al.* en 2010 tuvieron solo un paciente de 53 con neumonía causada por *E. coli*, al igual que Carvalho *et al.* en 2008 quienes publican un solo paciente de 22 al que se aisló esta enterobacteria.

El género *Enterobacter* ha sido aislado en lavados broncoalveolares de pacientes con neumonía nosocomial (Weyland *et al.*, 2011; Estella *et al.*, 2008, y Wu *et al.*, 2002), por lo tanto este patógeno se podría pensar que en este estudio, a los pacientes del Hospital General de México a los que se les aisló este género de enterobacteria padecían de neumonía nosocomial, pero sería importante tener la historia clínica completa del paciente para poder asegurar esta afirmación.

Los géneros de Enterobacterias con menos aislamientos en este estudio fueron *Klebsiella* y *Citrobacter*, ambas aisladas por Zaccard *et al.* en 2009 en un porcentaje similar al encontrado en este trabajo (2.2% y 1.4% respectivamente), pero su población fue de 798 lavados broncoalveolares, mientras que la población de este estudio solo comprendió a 104 pacientes.

Dentro de las bacterias Gram negativas que no pertenecen a las enterobacterias se aislaron *M. catarrhalis* y bacilos no fermentadores de lactosa. *M. catarrhalis* comprende uno de los principales agentes etiológicos de la neumonía adquirida en la comunidad o de la neumonía nosocomial temprana (Luna *et al.*, 2000). *M. catarrhalis*, fue aislada por Dancewicz *et al.* en 2009, quienes concluyen que esta bacteria es colonizante de vías respiratorias en pacientes con cáncer pulmonar y Zaccard *et al.* en 2009 aislaron *M. catarrhalis* en cultivos cuantitativos de lavados broncoalveolares de pacientes sometidos a ventilación mecánica. En este trabajo, *M. catarrhalis* se aisló en un cultivo mixto junto a *E. coli*, lo cual sugiere que al paciente al que le fueron aislados estos patógenos podría tener una neumonía nosocomial temprana.

En lo que respecta a los bacilos no fermentadores de lactosa, las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de estos microorganismos fueron las mismas que se usaron para las enterobacterias, y solo 7 de 12 aislamientos fueron ubicados taxonomicamente con ayuda de las pruebas bioquímicas como *P. aeruginosa* en 4 casos y 3 cepas de *P. fluorescens*, para los 5 aislamientos restantes se dificultó la identificación por características bioquímicas ya que no fermentaban ninguno de los carbohidratos probados, por lo que se tuvo que recurrir a la identificación por técnicas de biología molecular.

En el caso de *P. aeruginosa*, las pruebas que sirvieron para confirmar su identificación fue degradación por vía oxidativa de la glucosa, además de algunas características que presentaba en la morfología colonial como: la presencia de aroma parecido a uvas fermentadas y en la cepa con código LMSJS producía pigmentos y estas son características que han sido descritas en la literatura (Madigan *et al.*, 2003).

En este trabajo, se aisló *P. aeruginosa* en el 7% de los casos, porcentaje similar a lo publicado por Wu *et al.* 2002. De la misma forma Luna *et al.* en 2005 reportan que en Latinoamérica *P. aeruginosa* solo se presenta en el 11.1% de los casos de neumonía nosocomial. Las 4 cepas ubicadas como *P. aeruginosa* en este estudio fueron recuperadas a partir de pacientes VIH positivos, en el 2000 Afessa y Green, describen aislamientos de *P. aeruginosa* en pacientes infectados por VIH.

El aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* es poco frecuente en muestras clínicas, en este estudio fue identificada principalmente por la oxidación la glucosa, y por la dificultad de crecimiento a 37° C, pero cuando se incubo a temperatura ambiente tuvo un óptimo crecimiento. Sperandio *et al.* 2012 describe que el crecimiento optimo de esta bacteria se encuentra en un rango entre 25-30°C. La cepa de *P. fluorescens* MFN1032, es un aislamiento clínico que fue recuperado de un paciente que cursaba con una infección pulmonar y está presenta crecimiento a 37° C (Sperandio *et al.* 2012), misma característica que tienen las cepas que se aislaron en el presente estudio, cabe señalar que en las tres cepas el primoaislamiento fue hecho a 37°C y posterior a la resiembra estas cepas dejaron de crecer a esta temperatura o su crecimiento era escaso y lento.

Comúnmente *Pseudomonas fluorescens* es una bacteria saprofita que se encuentra asociada principalmente con plantas, también se ha descrito su uso en la rama de la biotecnología, pues ha sido reportada como degradadora de compuestos orgánicos como el petróleo, además se ha reportado que cepas *P. fluorescens* son consideras como patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, como: sepsis por transfusión sanguínea, bacteremia relacionada a catéter y peritonitis en pacientes con diálisis intraperitoneal (Wong *et al.* 2011).

En cuanto a las vías respiratorias Bahrani-Mougeot *et al.* en 2007 demostraron que dentro de las bacterias potencialmente patógenas que se encuentran colonizando la boca y los pulmones de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos por trauma se encuentra *P. fluorescens*, detectada por medio de técnicas de biología molecular y no por cultivo.

Una vez caracterizados los aislamientos por pruebas bioquímicas se realizó la identificación por medio de la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16s. En algunos casos ayudó a confirmar y en otros a determinar cepas que fueron difíciles de caracterizar por las pruebas bioquímicas y no se llegó a su identificación.

11.4. Análisis parcial del gen que codifica para ARN16S.

Actualmente se han desarrollado diversas técnicas de biología molecular para la detección de bacterias causantes de neumonías, por ejemplo, la PCR multiplex, que es una variante de la PCR, en la cual dos o más loci son amplificados simultáneamente en la misma reacción (Henegariu *et al.*, 1997). En el diagnóstico de neumonía, se han desarrollado protocolos para la determinación de serotipos y serogrupos de *S. pneumoniae*, además también se ha desarrollado protocolos para la detección de *Chlamydomphila pneumoniae*, *C. psittaci* o *Mycoplasma pneumoniae* (Méndez-Álvarez *et al.*, 2004).

La PCR multiplex se ha implementado en el caso principalmente de la Neumonía Adquirida en la Comunidad para identificar: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* (Tarp *et al.*, 1998; Stralin *et al.*, 2006) a pesar de esto, tiene cierta limitación para la detección de patógenos raros causantes de Neumonía Adquirida en la Comunidad o para Neumonía Nosocomial, ya que la etiología es mas diversa.

Por otra parte la secuenciación del gen que codifica para ARNr 16S, ha sido utilizado para la identificación de diferentes tipos de bacterias, incluidas las bacterias de origen clínico y esto es debido a la precisión que tiene esta técnica. El ARNr 16S es un polirribonucleotido de aproximadamente 1500 pb; a partir de su secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica de los aislamientos bacterianos, ya que es una molécula de tamaño relativamente largo, muy antigua y que se encuentra en todas las bacterias actuales, además que tienen la suficiente variabilidad para diferenciar no solo los organismos mas alejados, si no también los mas próximos a la cepa por tipificar (Rodicio y Mendoza, 2004).

Los aislamientos de lavados bronquiales se identificaron por amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, las secuencias se compararon con la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Se asignó la taxonomía de la bacteria, con base a la primera opción que aparecía en la base de datos. Los criterios para determinar la identificación de los aislados dependieron del porcentaje de similitud que tuvieron. Se determinó como especie bacteriana a aquellas que tuvieran una

similitud $\geq 99\%$ y si el porcentaje es de entre 98-95%, la caracterización se quedaba hasta nivel de género y si era $< 95\%$, la ubicación taxonómica quedaba a nivel de familia (Bosshard *et al.* 2006).

Existen microorganismos considerados como fastidiosos o de difícil identificación los cuales muestran características bioquímicas ambiguas, un ejemplo de estos microorganismos son los bacilos no fermentadores de lactosa. En este estudio, las cepas con código GHI, GHIt, GLE3, TSD y MRF no fermentaron ninguno de los ocho carbohidratos que se probaron y esto hizo difícil su caracterización. De acuerdo a la base de datos del NCBI, las cepas que correspondieron a bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa y que no fueron identificados por pruebas bioquímicas, son cepas de *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter sp.* y *Acinetobacter baumannii*. Esto coincide con lo que publica Bosch *et al.* en 2008 quienes reportan diversas especies de bacilos no fermentadores, y entre estas, que se encuentran *Acinetobacter spp.* y *A. xylosoxidans* y que también han sido aisladas por distintos autores (Weyland *et al.* 2011; Wu *et al.* 2002; Zaccard *et al.* 2009).

En el caso de los *Streptococcus*, la cepa con código ADLLMC identificada como *Streptococcus sp1* (β hemolítico) de acuerdo a la comparación con la bases de datos (Cuadro 7), fue identificada como *Enterococcus faecalis* y la cepa con código AMJ12 (*Streptococcus sp2* α hemolítico) fue identificada como *Streptococcus mitis* y este ha sido agrupado dentro de los *Streptococcus viridans*, que se aisló de pacientes con neumonía nosocomial en Hospital General de acuerdo a lo publicado por Flores en 2007.

La identificación por pruebas bioquímicas y la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S, coincide en el 84% de las cepas, el 19% de cepas restante se encuentra en el Cuadro 8, donde se muestran los resultados de las cepas que no fueron identificadas con el mismo género y especie por pruebas bioquímicas comparados con el resultado que mostró el GenBank, además del porcentaje de similitud que existía entre la secuencia obtenida y la bacteria determinada por pruebas bioquímicas.

Cuadro 8. Relación de las cepas que difieren de la identificación por pruebas bioquímicas y el análisis del gen que codifica para el ARNr 16S

Código de la cepa	Identificación por la secuenciación parcial del gen que codifica para ARNr 16S	porcentaje de homología	Similitud de las secuencias respecto a las pruebas bioquímicas	porcentaje de homología
AMJ1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96	<i>Enterobacter aerogenes</i>	96
LGB1	<i>Acinetobacter sp.</i>	99	<i>Moraxella catarrhalis</i>	89
AAA1	<i>Klebsiella sp.</i>	98	<i>Enterobacter aerogenes</i>	98
RRJI	<i>Klebsiella sp.</i>	94	<i>Enterobacter aerogenes</i>	94
GLE5	<i>Enterobacter cloacae</i>	95	<i>Escherichia coli</i>	94
GLE6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99
GMO2	<i>Klebsiella sp.</i>	99	<i>Escherichia coli</i>	96

Las bacterias que no coinciden con la identificación por pruebas bioquímicas realizadas y las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S en el GenBank fueron principalmente miembros de la familia Enterobacteriaceae (Cuadro 10), las cepas que fueron identificadas como *Enterobacter*, en comparación con el BLAST que resultaron ser del género *Klebsiella*; sin embargo, todas estas cepas son móviles, y esta característica no es representativa de ninguna especie del género *Klebsiella*, ya que según Barrow y Feltham en 1993 *Klebsiella* son bacilos Gram negativos carentes de flagelos.

La razón por la cual pudiera ser que el género *Enterobacter* sea tan similar genótipicamente a las bacterias del género *Klebsiella*, es porque *Enterobacter* ha sido considerado como un organismo polifilético, es decir que sus especies están compuestas por diferentes clados, y por lo tanto pudieran tener similitudes entre otros géneros (Clarridge, 2004).

De la misma forma, la cepa con código GMO2, fue identificada por el BLAST como *Klebsiella sp.* que es un bacilo Gram negativo no móvil, que aprovecha el citrato como única fuente de carbono, sin embargo la cepa aislada en este estudio si presenta movilidad, pero no es capaz degradar el citrato como única fuente de carbono (Barrow y Feltham 1993).

Por otra parte la cepa ubicada como *Moraxella* por sus características metabólicas no coincidió con el resultado que arroja el BLAST que fue identificada como *Acinetobacter oleivorans*. El género *Acinetobacter* es capaz de desarrollar crecimiento en agar MacConkey, lo que *M. catharrhalis* no realiza, además de otras características bioquímicas (Cuadro 5). Las razones por las cuales *A. oleivorans* fuera la primer opción al realizar el BLAST pudiera ser porque ambas especies pertenecen a la familia Moraxellaceae.

Las pruebas de bacteriología clásica y las pruebas de biología molecular como el análisis del gen que codifica para el ARNr 16S son pruebas hasta hoy complementarias para la adecuada identificación de los aislamientos bacterianos, ya que a pesar que en el 16% de los casos, no se identifico de igual forma los resultados de las pruebas bioquímicas, comparados con los resultados de la secuenciación parcial del gen que codifica para ARN16s. Es por esto que en la actualidad, las técnicas de bacteriología clásica siguen siendo las técnicas de elección en los laboratorios de microbiología para la identificación de bacterias, ya que el costo de realizar estas pruebas es bajo comparado con una identificación por biología molecular, además al realizarse un cultivo, se permite el aislamiento de la bacteria causante de la infección para realizar la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para ese organismo, y que se puede distinguir a organismos colonizadores de los que realmente están ocasionando la infección. A pesar de esto, la experiencia del microbiólogo para la elección de las pruebas bioquímicas, así como la interpretación de resultados es necesaria para llegar a la correcta determinación de la bacteria.

En algunos casos, cuando la identificación por bacteriología clásica no concluye, o el aislamiento corresponde a una bacteria fastidiosa, las técnicas de biología molecular han ayudado para el diagnóstico oportuno del paciente. Así, se han desarrollado técnicas como la PCR *multiplex* que permiten la detección de algunos patógenos con mayor rapidez que el tiempo que ofrece un cultivo, sin embargo, al realizar esta técnica, se hace la identificación solo del organismo patógeno, pero no se hace la susceptibilidad a los antimicrobianos de la bacteria, además que con esta técnica no se puede diferenciar entre organismos colonizantes de los realmente patógenos.

12. Conclusiones

El 45.19% de los pacientes padecía una infección activa, ya que en los cultivos cuantitativos presentó crecimiento \geq a 1×10^4 UFC/mL.

En cuanto a la población, el diagnóstico mas frecuente fue tuberculosis asociada a pacientes con VIH, seguido por las infecciones no tuberculosas y pacientes que presentaban algún tipo de cáncer.

La bacteria Gram negativa que presentó mayor abundancia durante el estudio fue la cepa con código GMO1 (*Citrobacter freundii*) con 3.2×10^9 UFC/mL, mientras que la cepa con código LGB1 identificada como *Moraxella catarrhalis* tuvo la menor abundancia con 1×10^4 UFC/mL.

Staphylococcus epidermidis fue la bacteria Gram positiva con mayor abundancia con la cepa con código ZG11, con crecimiento de 6×10^6 UFC/mL. La cepa que menor abundancia presentó durante el estudio fue la cepa con código CMA1 (*S. epidermidis*) con 1×10^4 UFC/mL.

Se tuvieron 61 aislamientos que fueron caracterizados por pruebas bioquímicas, pero solo 48 se pudieron caracterizar por la secuenciación parcial del gen que codifica para ARNr 16S.

La bacteria que se aisló con mayor frecuencia corresponde a *S. epidermidis* con un 18% de los casos, seguida por *E. coli* que fue aislada en un 13% de los pacientes sometidos a lavados bronquiales. Las bacterias que se aislaron con menor frecuencia corresponden a: *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *M. catarrhalis*, *S. maltophilia*, *E. faecalis* y *S. mitis* con el 1% respectivamente.

Los pacientes mas representativos del estudio fueron los pacientes infectados por VIH, el 40% de los cultivos cuantitativos de estos pacientes presentó una infección activa, *Streptococcus sp. 2*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron los patógenos que se presentaron con mayor frecuencia.

La identificación por pruebas bioquímicas y por la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S coincidió en un 84% de las cepas analizadas, lo cual sugiere que a pesar del desarrollo de técnicas como las de biología molecular, las pruebas de bacteriología clásica no pueden ser descartadas, y las técnicas de biología molecular son complementarias a estas.

13. Bibliografía

Afessa, B. y Green, B. 2000. Bacterial pneumonia in hospitalized patients with HIV infection. *CHEST*. 117: 1017-1022.

Allaouchiche, B., Jaumain, Chassard, Boulétreau. 1999. Gram strain of bronchoalveolar lavage fluid in the early diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *British Journal of Anaesthesia*. 83 (6): 845-849.

Bahram-Mougeot, F., Paster, Coleman, Barbuto, Brennan, Noll, Kennedy, Fox y Lockhart. 2007. Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia. *Journal of Clinical microbiology*. 45 (5): 1588-1593.

Bangham, C. 1991. Methods in molecular biology. *protocol in human molecular genetics*. 9: 1-7.

Barreiro-López, B., Tricas, Mauri, Quintana y Gerau. 2005. Factores de riesgo y pronósticos de la neumonía nosocomial en los pacientes no ingresados en unidades de cuidados intensivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 23 (9): 519-524.

Barrow G. y Feltham R. 1993. *Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacteria*. 3ra ed. Nueva York: Cambridge University Press: 331 p.

Blanquer, J. y Sanz F. 2010. Neumonía adquirida en la comunidad. *Archivos de Bronconeumología*. 46 (7): 26-30.

Bosch, A., Miñán, Vescina, Defrossi, Gatti, Montanaro, Messina, Franco, Vay, Schmitt, Naumann y Yantorno. 2008. Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting Gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (8): 2535-2546.

Bosshard, P., Zbiden, Abels, Boddinhaus, Altwegg y Böttger. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB Card for Identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (4): 1359-1366.

Bou, G., Fernández-Olmos, García, Sáenz-Nieto y Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 29 (8): 601-608.

Brooks, G., Butel y Morse. (2004). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelbe* (18 ed.). México: El manual moderno: 786 p.

Carmona, J. 2009. Infección respiratoria aguda en relación con la contaminación atmosférica y otros factores ambientales. *Archivos de Medicina*. 9 (1): 69-79.

Carvalho, E., Bosco, Levin, Montenegro, Leite, Abdala, Rossi y Mies. 2008. Comparative study of etiological diagnosis of nosocomial pneumonia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 12: 67-74.

Chumpitaz, J., Medina, Huamán, Ocsas, Pareja, Valencia, Machorro y Valencia. 2004. Bacterias resistentes de las mucosas de vías respiratorias altas de familiares de pacientes hospitalizados. *Revista peruana de medicina tropical*. 1 (9): 19-25.

Clarridge J. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 17 (4): 840-862.

Clec'h, C., Jauréguy, Hamza, Karoubi, Fosse, Hamdi, Vincent, Gonzalez y Cohen. 2006. Agreement between quantitative cultures of postintubation tracheal aspiration and plugged telescoping catheter, protected specimen brush, or BAL for the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Critical Care Medicine*. 130: 956-961.

Cota, J., Gutieérrez, Lule y Alexandre. 2003. VIH-SIDA en niños: experiencia de 10 años en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*. 16 (3): 145-149.

Dancewicz, M., Szymankiewicz, Bella, Swiniarska y Kowalewski. (2009). Bronchial bacterial colonization in patients with lung cancer. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 77, 242-247.

El Solh, A., Akinnusi, Pineda y Mankowski. 2007. Diagnostic yield of quantitative endotracheal aspirates in patients with severe nursing home-acquired pneumonia. *Critical Care*. 11 (3): 57-62

Escribano, A., Moreno y Grupo de Técnicas de la Sociedad Española de Neumología pediátrica. (2005). Técnicas fibrobroncoscópicas especiales: lavado broncoalveolar, biopsia bronquial y biopsiatransbronquial. *Anales de pediatría*, 62 (4), 352-366.

Estella, A., Monge, Pérez, Sainz, Galán y Moreno. 2008. Lavado broncoalveolar para el diagnóstico de neumonía en enfermos en ventilación mecánica. *Medicina intensiva*. 32 (9): 419-423.

Ferreira-Guerrero, E., Báez-Saldaña, Trejo-Valdivia, Ferreyta-Reyes, Delgado-Spanchez, Chilián-Herrera, Mendoza-Alvarado y García-García. 2013. Infecciones respiratorias agudas en niños y signos de alarma identificados por padres y cuidadores en México. *Salud Pública de México*. 55 (2): 307-313.

Flores, L. 2007. *Neumonía nosocomial en el Hospital General de México. Tesis de posgrado para obtener el título de la especialidad en medicina interna*. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México: 39 p.

Forslöv, U. Remberger, Nordlander y Mattsson. 2010. The clinical importance of bronchoalveolar lavage in allogeneic SCT patients with pneumonia. *Bone Marrow Transplantation*. 45: 945-950.

Fujitani, S., Cohen-Melamed, Tuttle, Delgado, Taira y Darby. 2009. Comparison of semi-quantitative endotracheal aspirates to quantitative non-

bronchoscopic bronchoalveolar lavage in diagnosing ventilator-associated pneumonia. *Respiratory Care*. 54 (11): 1453-1460.

García, J. y Aspa, J. 2005. *Neumonías*. Madrid, España: neumomadrid: 9-28.

Hansen, W., Beuving, Bruggeman, Wolffs. 2010. Molecular probes for diagnosis of clinically relevant bacterial infections in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (12): 4432-4438.

Henegariu, O. Heerema, Dlouhy, Vance y Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*. 23 (3): 504-511.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2011. Consultado en Enero 22 del 2012, en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/aee11/estatal/ags/default.htm>

Housset, B. 2001. *Neumología*. Barcelona, España: Masson: 52-54.

Hospital General de México. 2014. consultado el 20 de mayo del 2014, en: http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/neumo/guias10/tres.pdf

Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica. 2013. Consultado en noviembre 8 del 2013, y disponible en: www.indre.salud.gob.mx/sites/indre/descargas/pdf/lineamientos_Programas_de_Evaluacion_Externa_del_Desempeno_RNLSP.pdf <http://>

Jamison, D., Breman, Measham, Alleyne, Claeson, Evans, Jha, Mills y Musgrove. 2006. *Disease control priorities in developing countries* 2da. ed. Washington DC: World Banc: 483-497.

Jourdain, B., Joly-Guillou, Dombret, Calvat, Trouillet, Gibert y Chastre. 1997. Usefulness of Quantitative cultures of BAL fluid for diagnosing nosocomial Pneumonia in Ventilated Patients. *CHEST*. 111: 411-418.

Loeb, M. 2003. Pneumonia in older persons. *Clinical infectious diseases*. 37 (10): 1335-1339.

Louws, F., Rademaker y Bruijn. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Reviews Phytopathology*. 37: 81-125.

Luna, C., Famiglietti, Absi, Videla, Nogueira, Díaz y Gené. 2000. Etiology, epidemiology and outcome at a teaching hospital in Argentina. *CHEST*. 118: 1344-1354.

Luna, C., Monteverde, Rodríguez, Apezteguia, Zabert, Ilutovich, Menga, Vasen, Díez y Mera. 2005. Neumonía intrahospitalaria: Guía Clínica aplicable a latinoamérica preparada en común por diferentes especialistas. *Archivos de Bronconeumología*. 41 (8): 439-456.

Macfaddin, J. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Argentina: Panamericana: 850 p.

Madigan, M., Martinko y Parker. 2003. *Brock Biología de los microorganismos* 10ma. ed. Upper Saddle River NJ: Prentice Hall.

Maldonado-Ortiz, A., Niederman, Arancibia, Osorio, Regalado, Sereno, Nañez y Guerrero. 2005. Informe de la conferencia de consenso interamericano sobre neumonía nosocomial y asociada a la ventilación mecánica. *REvista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 41 (8): 198-307.

Márquez, J. 2002. Estudio de pacientes sometidos a broncofibroscopía en el hospital nacional Daniel Alcides Carrión. Tesis para obtener el título de neumólogo. *Facultad de Medicina de San Fernando*: 57p.

Méndez-Álvarez, S. y Pérez-Roth, E. 2004. La PCR en múltiple en microbiología clínica. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22 (3): 72-80.

Meseguer, M., Camacho, Oliver y Puig. 2007. Diagnostico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Procedimientos en microbiología clínica*: 1-59

Monsalvo, A. 2006. Caracterización biológica y molecular de una especie de Geminivirus asociado con los síntomas de moteado amarillo de la Okra (*Abelmoschus esculentus*) en México. Tesis de maestría en ciencias biológicas y experimentales. *Universidad Nacional Autónoma de México*. 31 p.

Morejon, M. 1998. Neumonía adquirida en la comunidad. Enfoque actualizado. *RESUMED*. 11 (2): 109-115.

Morris, P. 2009. Infecciones de la vía respiratoria superior (incluida la otitis media). *Clínicas Pediátricas de Norteamérica*. 56 (1): 101-117.

Muto, H., Kaneko, Machino, Okoshi, Mukai, Suzukawa, Hasegawa, Imagawa, Kojima, Ishii, Hitomi y Nagasawa. 2006. Quinupristin/dalfopristin and voriconazole controlled *Staphylococcus epidermidis* pneumonia and chronic necrotizing aspergillosis in a patient with severe lung degradation consequent to multiple treatments for Hodgkin's lymphoma. *Journal of Infection Chemotherapy*. 12: 391-395.

Olsen, G. y Woese, C. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB journal*. 7: 113-123.

Organización Panamericana de la Salud. 1995. Infecciones agudas respiratorias en las Américas. *Boletín epidemiológico de la Organización Panamericana de la Salud*. 16 (4): 109-115.

Paladino, J., Holmes y Schmitz. 2002. *Appropriate use of antimicrobials: a practical guide for physicians*. Londres: Libra: 63 p.

Pérez, C., García, Calvo, Labarca, Bustos, Beroiza, Gaete, Moreno, Acuña y Vial. 2011. Etiología de la neumonía en pacientes chilenos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Chilena de Infectología*. 28 (4): 343-348.

Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22 (4): 238-245.

Rodriguez, I. y Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 3 (7): 223-235.

Rudkjobing, V., Thomsen, Alhede, Kragh, Nielsen, Johansen, Givskov, Hoiby y Bjarnsholt. 2011. True microbiota involved in chronic lung infection of cystic fibrosis patients found by culturing and 16s rRNA gene analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 49 (12): 4352-4355.

Sacsquispe, R. y Ventura, G. 2001. *Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias*. Lima, Perú: Ministerio de Salud: 85 p.

Saldias, F., y Pérez, C. 2005. manejo de la neumonía del adulto adquirida en la comunidad. Resumen del consenso nacional. *Revista Médica de Chile*. 133: 953-967.

Sistema Nacional de Información en Salud (2008). enero 22, 2012, en www.sinais.salud.gub.mx/descargas/xls/m_005.xls

Shenep, J. 2000. Viridans-group Streptococcal infections in immunocompromised host. *International journal of antimicrobial agents*. 14: 129-135.

Slatter, M., Rogerson, Taylor, Galloway, Clark, Flood, Abinun, Cant y Gennery. 2007. Value of bronchoalveolar lavage before haematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency or autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplantation*. 40: 529-533.

Sperandio, D., Decoin, Latour, Mijouin, Hillion, Feuilloley, Orange y Merieau. 2012. Virulence of the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN 1032 towards *Dictyostelium discoideum* and macrophages in relation with type III secretion system. *BMC microbiology*. 12: 223-233.

Stralin K., Korsgaard y Olcen. 2006. Evaluation of multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. *European Respiratory Journal*, 28 (3): 568-575.

Tarp B., Jensen, Ostergaard y Andersen. 1998. Search for agents causing atypical pneumonia in HIV-positive patients by unhibitor-controlled PCR assays. *European Respiratory Journal* . 13: 175-179.

Valero, N., Larreal, Arocha, Gotera, Mavarez, Bermudez, Moran, Maldonado y Espina. 2009. Etiología viral de las infecciones respiratorias agudas. *Investigacion Clínica*. 50 (3): 259-368.

Vaz, A., Amorim, Espinar, Oliveira, Pereira, Paiva. 2011. Positive bronchoalveolar lavage and quantitative cultures results on suspected late-onset ventilator associated pneumonia evaluation- retrospective study. *Revista portuguesa de pneumonologia*. 17 (3): 117-123.

Weyland, B., Perazzi, García, Rodríguez, Vay y Famiglietti. 2011. Etiología bacteriana de la neumonía nosocomial y resistencia a los antimicrobianos en pacientes con y sin tratamiento antimicrobiano previo. *Revista Argentina de Microbiología*. 43: 18-23.

Wong, V., Levi, Baddal, Turton, Boswell. 2011. Spread of *Pseudomonas fluorescens* due to contaminated drinking water in a bone marrow transplant unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 49 (6): 2093-2096.

Wu, C., Yanh, Wang, Kuo y Chen. 2002. Quantitative culture of endotracheal aspirates in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia in patients with treatment failure. *CHEST*. 122: 662-668.

Yang, S., Ramachandran, Hardick, Hsieh, Quianzon, Kuroki, Hardick, Kecojevic, Abeygunawardena, Zenilman, Melendez, Doshi, Gaydos y Rothman. 2008. Rapid PCR-Based diagnosis of septic arthritis by early Gram-type classification and pathogen identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (4): 1386-1390.

Zaccard, C., Schell y Spiegel. 2009. Efficacy of bilateral bronchoalveolar lavage for diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Journal of clinical microbiology*. 47 (9): 2918-2824.

Zhang, G., Chen, Liu, Chou, Yu, Lu, Li, Zhu, Wu, Li, Hu, DU y Li. 2012. Application of bacterial cultures of bronchoalveolar lavage fluids in children with pulmonary infection. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*. 14 (5): 350-352.

14. Anexo

Extracción de ADN por la técnica AP modificada.

1. Resembrar las cepas en caldo BHI a partir de una colonia aislada en agar BHI.
2. Incubar a 37° C durante 24 h o hasta alcanzar la densidad óptica correspondiente a 5 en escala de McFarland. Tomar 1000 µl de esta suspensión, y centrifugar a 12 000 rpm por 2 minutos.
3. Desechar el sobrenadante y agregar 250 µl de amortiguador AP (Urea 7M, NaCl .35M, Tris base .05M, EDTA .02M y N-Lauroylsarcosine 1%), macerar con puntas de teflón estériles y ajustar la mezcla con 750 µl del mismo amortiguador. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar por 2 minutos y colocar 500 µl del sobrenadante en un tubo limpio.
5. Limpiar el sobrenadante con 500 µl de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), agitar con un vortex y centrifugar por 3 minutos a 12 000 rpm, recuperar la fase acuosa en un tubo limpio y repetir la agitación y centrifugar a 12 000 rpm por 3 minutos.
6. Rescatar la fase acuosa, y colocar 500µl de Isopropanol y agitar suavemente, posteriormente agregar 50µl de acetato de amonio 10M.
7. Centrifugar a 12 000 rpm por 10 minutos y resuspender la pastilla con 50 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 12 000 rpm durante 3 minutos. Esto se repite en una ocasión.
8. Desechar el sobrenadante y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente. Colocar 30µl de agua inyectable (PISA) y etiquetar con el nombre de la cepa, método de extracción y la fecha y fue almacenada a -20°C hasta su utilización.