


**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA
LA INVESTIGACIÓN DE BROTES DE
INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS
PRODUCIDAS POR BACTERIAS
MEDIANTE MÉTODOS DE
BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Serie de Normas
Técnicas N° 35**

Lima - 2002



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA
LA INVESTIGACIÓN DE BROTES DE
INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS
PRODUCIDAS POR BACTERIAS
MEDIANTE MÉTODOS DE
BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Serie de Normas
Técnicas N° 35**

Lima - 2002

MINISTERIO DE SALUD
Ministro
Dr. Fernando Carbone Campoverde

Vice-Ministro
Dr. Oscar Ugarte Ubillúz

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Jefe
Dr. Luis Fernando Llanos Zavalaga

Sub-Jefe
Dra. Aída Cecilia Palacios Ramírez

Centro Nacional de Salud Pública
Dra. Susana Zurita Macalupú
Directora General

**Centro Nacional de Alimentación
y Nutrición**
Dr. Napoleón Chávez Campoverde
Director General

Centro Nacional de Control de Calidad
Dra. Rosa Guevara Ormeño
Directora General

Centro Nacional de Producción de Biológicos
Q. F. Ricardo Valera Sánchez
Director General

Sub-Comité Editor
Instituto Nacional de Salud

Presidente
Dra. Aída Palacios Ramírez

Secretario Técnico
Dr. César Cabezas Sánchez

Miembros
Dr. Jorge Alarcón Villaverde
Q.F. Zulema Arévalo Chong
Dr. Jorge Barnaby Rodríguez
Dr. Zuño Burstein Alva
Lic. Iván Gómez-Sánchez Prieto
Dra. Ivonne Guerrero Alva
Dr. Alfredo Guillén Oneeglio
Dr. César Náquira Velarde
Dr. Enrique Pérez Ramos
Lic. Margarita Rodríguez Gutarra
Dr. Víctor Suárez Moreno

Editor
Dr. Leonid Lecca García

Portada: Frontis del local central del Instituto Nacional de Salud.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE BROTOS DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS MEDIANTE MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ELABORACIÓN:

*Róger Iván Calderón Espinoza
Biólogo
División de Biología Molecular
Centro Nacional de Salud Pública
Instituto Nacional de Salud*

*Martín Javier Alfredo Yagui Moscoso
Médico - Patólogo Clínico
Proyecto VIGIA
Ministerio de Salud*

Revisores:

Jazmina Beraun
Tecnólogo Médico
Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen-EsSalud

Rafael Ramírez
Médico
Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen-EsSalud

Patricia Caballero Ñopo
Médico Infectólogo
Instituto Nacional de Salud

Javier Soto Pastrana
Tecnólogo Médico
Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé

Alfredo Guillén Oneeglio
Médico Microbiólogo
Clínica San Borja

Victor Suárez Moreno
Médico Infectólogo
Instituto Nacional de Salud

Luis Fernando Llanos Zavalaga
Médico, MSc (Econ)
Instituto Nacional De Salud

Augusto Valencia Ramírez
Médico Patólogo - Clínico
Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé

Ysabel Montoya Piedra
Doctor en Biología Molecular
Centro Nacional de Salud Pública

Rito Zerpa
Médico Microbiólogo
Instituto de Salud del Niño

Cecilia Morón Cortijo
Médico Patólogo
Instituto Nacional de Salud

Catalogación hecha por el Centro de Documentación e Información del INS

Calderón Espinoza, Roger Iván ; Yagui Moscoso, Martín Javier Alfredo
Manual de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones
intrahospitalarias producidas por bacterias mediante métodos de biología molecular /
Elaborado por Roger Iván Calderón Espinoza y Martín Javier Alfredo Yagui Moscoso. -
Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.
29 p. : 30 cm. - (Serie de Normas Técnicas; 35)

1. INFECCION HOSPITALARIA /diagnóstico
2. INFECCIONES BACTERIANAS
3. BIOLOGIA MOLECULAR/métodos
 - I. Calderón Espinoza, Roger Iván
 - II. Yagui Moscoso, Martín Javier Alfredo
 - III. Instituto Nacional de Salud (Perú)
 - IV. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972 - 857 - 26 - 3 (O.C.)

ISSN 9972 - 857 - 28 - X (Nº 35)

ISSN 1607 - 4904

Hecho el Depósito Legal Nº 1501012002-3960

©Ministerio de Salud, 2002

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú
Telf.: 431-0410

©Instituto Nacional de Salud, 2002

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Telf.: 471-9920 Fax 471-0179

e-mail: postmaster@ins.sld.pe

Página Web: www.ins.sld.pe

Publicación aprobada con R.J. Nº 323-2002-J-OPD/INS

Se autoriza su reproducción total o parcial siempre y cuando se cite la fuente.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	V
SECCIÓN 1: GENERALIDADES	1
1.1 Objetivos	1
1.2 Campo de aplicación	1
1.3 Responsabilidades	1
1.3.1 Responsabilidades del equipo hospitalario	1
1.3.2 Responsabilidades del Instituto Nacional de Salud	1
1.4 Documentos de referencia	2
1.5 Definiciones	2
1.5.1 Infección intrahospitalaria	2
1.5.2 Brote	2
SECCIÓN 2: MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	4
2.1 Disposiciones	4
SECCIÓN 3: OBTENCIÓN DE MUESTRAS	4
SECCIÓN 4: CONSERVACIÓN, EMBALAJE, TRANSPORTE Y REMISIÓN DE CEPAS	5
4.1 Conservación de cepas	5
4.1.1 Conservación por períodos cortos	5
4.1.2 Conservación por períodos prolongados	5
4.1.3 Recuperación de cultivos conservados	5
4.2 Embalaje	6
4.3 Transporte y remisión de cepas	6
SECCIÓN 5: ENSAYO O ANÁLISIS EN LABORATORIO	7
5.1 Análisis plasmídico	7
5.2 Análisis de diversidad clonal	8
5.2.1 Ribotipificación	8
5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa	10
5.2.3 Electroferesis en gel de campo pulsado	11
5.2.4 Análisis de los perfiles generados por métodos de diversidad clonal	11
5.3 Procedimientos	12
5.3.1 Análisis plasmídico	12
5.3.2 Ribotipificación	14
5.3.3 PCR	19
SECCIÓN 6: DIAGNÓSTICO	20
6.1 Condiciones previas	20
6.2 Confirmación de la identificación bacteriana	21
6.3 Confirmación por biología molecular	21
6.4 Análisis de la información	22

BIBLIOGRAFÍA	23
---------------------------	-----------

ANEXOS

ANEXO A: FLUJOGRAMA DE INVESTIGACIÓN DE BROTES DE IIH	25
ANEXO B: DIAGRAMA DE TRABAJO PARA LA CONFIRMACIÓN DE BROTES DE IIH	26
ANEXO C: FORMULARIO PARA EL ENVÍO DE CEPAS PARA LA CONFIRMACIÓN DE BROTES DE IIH POR BIOLOGÍA MOLECULAR	27
ANEXO D: RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL BROTE DE IIH	28

INTRODUCCIÓN

Las infecciones intrahospitalarias (IIH) han sido reconocidas en los últimos años como un problema de salud pública, tanto por su impacto en la morbilidad como en la mortalidad hospitalaria. Por otro lado, es reconocida como un buen indicador para medir la calidad de atención en los hospitales.

A finales de 1998, el Ministerio de Salud inició los esfuerzos para promover en forma sistemática la vigilancia, prevención y control de las IIH con la finalidad de mejorar la calidad de atención y por consiguiente disminuir la morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios.

Actualmente más de 40 hospitales a nivel nacional cuentan con un sistema de vigilancia epidemiológica de las IIH, esto ha motivado la detección cada vez más frecuente de brotes intrahospitalarios. Sin embargo, el nivel de identificación se limita en el nivel hospitalario hasta la determinación del germen y su patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Estudios de la dinámica de la transmisión intrahospitalaria revelan los factores que contribuyen a la infección con el fin de aportar en el desarrollo de medidas preventivas más eficientes. La detección, biodiversidad y grados de adaptación son ahora las variables que pueden ser analizadas gracias al uso de las técnicas y criterios de la biología molecular, que ayudarán al Instituto Nacional de Salud y a los establecimientos de salud a contribuir con la vigilancia, prevención y control de las distintas infecciones.

Los métodos convencionales de caracterización bacteriana, no ofrecen suficiente información sobre el origen y/o las distintas vías de transmisión de microorganismos patógenos entre los pacientes internados en los hospitales. Sin embargo, con el aporte adicional de las técnicas moleculares, y la información clínico-epidemiológico, se logra exponer en muchos casos el origen y las posibles rutas que han tomado para diseminarse en el ambiente hospitalario. Estos sistemas moleculares alternativos aportan mayor información sobre las características de los brotes, lo cual puede ser útil para un control eficiente de las infecciones intrahospitalarias.

Las técnicas de biología molecular para la investigación de brotes incluyen entre otras: el análisis de restricción de ácido desoxiribonucleico (ADN) plasmídico, la ribotipificación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aleatoria y de secuencias repetitivas de ADN. Mediante las metodologías mencionadas, se podrá discriminar las variantes de los distintos aislamientos, se determinará la interrelación entre variantes mediante el análisis de sus perfiles, calculándose el grado de similitud para generar diagramas de asociación entre los agentes bacterianos responsables del brote intrahospitalario, determinando así la dinámica de transmisión y diseminación bacteriana en los brotes.

Es en este contexto que el presente manual tiene por objetivo orientar a los equipos hospitalarios en las potencialidades de la biología molecular para la confirmación de brotes de IIH, la forma de conservar y enviar las cepas aisladas y dar a conocer los diferentes métodos moleculares aplicados en estos casos.

SECCIÓN 1

GENERALIDADES

1.1 OBJETIVO

Establecer los procedimientos para la investigación diagnóstica de los brotes de infecciones intrahospitalarias (IIH) producidos por bacterias mediante métodos de biología molecular.

1.2 CAMPO DE APLICACIÓN

Tiene alcance a todas las instituciones y establecimientos pertenecientes al sector salud.

1.3 RESPONSABILIDADES

Para fines de un adecuado diagnóstico y confirmación de los brotes de IIH mediante técnicas de biología molecular es necesario definir claramente las responsabilidades de los diferentes profesionales que intervienen en la investigación del brote, en el diagnóstico microbiológico primario, envío y transporte de cepas, confirmación por métodos convencionales y mediante técnicas de biología molecular. Estas actividades involucran al personal de microbiología de los hospitales, establecimientos de salud y del Instituto Nacional de Salud.

1.3.1 Responsabilidades del equipo hospitalario

1.3.1.1 Realizar la vigilancia epidemiológica de las IIH en forma activa con la finalidad de detectar en forma oportuna la ocurrencia de brotes de IIH.

1.3.1.2 Realizar el muestreo e identificación de acuerdo a lo establecido en el Manual de Procedimientos bacteriológicos en IIH - Serie de Normas Técnicas N° 28, editado por el Instituto Nacional de Salud (INS).

1.3.1.3 Realizar el antibiograma de acuerdo a lo establecido en el Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión - Serie de Normas Técnicas N° 30, editado por el INS.

1.3.1.4 Realizar el control de calidad interno de sus procedimientos, insumos y reactivos de laboratorio de acuerdo a lo estipulado por el INS.

1.3.1.5 Notificar la existencia de un brote intrahospitalario al INS para el control de calidad de la identificación y patrones de susceptibilidad y solicitar la confirmación mediante técnicas de biología molecular.

1.3.1.6 Remitir al INS los aislamientos bacterianos dentro de los primeros 3 días de sospecha del brote adjuntando el formulario para el envío de cepas y el resumen de la investigación epidemiológica del brote (ver Anexos A - D).

1.3.2 Responsabilidades del Instituto Nacional de Salud

1.3.2.1 Realizar la confirmación diagnóstica y la susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos responsables del brote intrahospitalario identificado y notificado.

- 1.3.2.2 Realizar el control de calidad externo de los laboratorios hospitalarios.
- 1.3.2.3 Aplicar los métodos moleculares altamente reproducibles y confiables para la identificación y discriminación de especies y variantes bacterianas.
- 1.3.2.4 Determinar las variantes moleculares de cada especie de microorganismo involucrado.
- 1.3.2.5 Establecer en conjunto con el equipo hospitalario las relaciones epidemiológicas entre las variantes moleculares detectadas, esquematizando el grado de similitud entre las cepas aisladas.
- 1.3.2.6 Notificar al hospital los resultados del control de calidad de la identificación y susceptibilidad bacteriana, así como los resultados de las pruebas de biología molecular.
- 1.3.2.7 Publicar el consolidado de los brotes intrahospitalarios estudiados en el año en conjunto con el equipo hospitalario.

1.4 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- 1.4.1 **Sacsquispe R, Ventura G.** Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima: INS; 2001. Serie de Normas Técnicas N°28.
- 1.4.2 **Sacsquispe R, Velasquez J.** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: INS; 2001. Serie de Normas Técnicas N°30.
- 1.4.3 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de Normas de Bioseguridad. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N°18.
- 1.4.4 **Oficina General de Epidemiología - RENACE - Proyecto VIGIA.** Manual de prevención y control de infecciones intrahospitalarias. Lima: OGE/RENACE/Proyecto VIGIA; 2000.
- 1.4.5 **Oficina General de Epidemiología - RENACE - Proyecto VIGIA.** Manual de vigilancia epidemiológica de las infecciones intrahospitalarias. Lima: OGE/RENACE/Proyecto VIGIA; 2000.
- 1.4.6 **Oficina General de Epidemiología - RENACE - Proyecto VIGIA.** Protocolo: Estudio de prevalencia de infecciones intrahospitalarias. Lima: OGE/RENACE/Proyecto VIGIA; 1999.
- 1.4.7 **Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ.** Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. In: Molecular Typing methods: ribotyping in molecular epidemiology. Washington DC: American Society for Microbiology; 1993.
- 1.4.8 **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres; 1989.

1.5 DEFINICIONES

- 1.5.1 **infección intrahospitalaria:** Es toda condición sistémica o localizada que resulta de la reacción adversa a la presencia de microorganismos o sus toxinas. Se considera intrahospitalaria, si existe

evidencia que no estaba presente o en incubación al momento del ingreso del paciente al hospital. Para muchas infecciones intrahospitalarias bacterianas eso significa que la infección usualmente se hace evidente 48 horas o más, luego de la admisión al hospital.

- 1.5.2 **brote:** Es el aumento inusual, por encima del nivel esperado (tasas del período pre-epidémico) de la incidencia de una determinada enfermedad, en general en un corto período de tiempo, en una sola población o grupo de pacientes. Por principio, cualquier acúmulo de infecciones en una localización determinada producida por un mismo agente etiológico debe ser estudiado a fin de descartar un brote.

SECCIÓN 2

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

2.1 DISPOSICIONES

- 2.1.1 Las disposiciones contenidas en el Manual de Normas de Bioseguridad - Serie de Normas Técnicas N°18, editado por el INS son aplicables para el cumplimiento de las disposiciones del presente manual.
- 2.1.2 La bioseguridad es un conjunto de medidas preventivas de sentido común para proteger la salud y la seguridad del personal que trabaja en el laboratorio, frente a diferentes riesgos producidos por agentes.
- 2.1.3 La administración del establecimiento de salud debe dar las facilidades para que las normas de bioseguridad se cumplan.

SECCIÓN 3

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las disposiciones contenidas en el Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias-Serie de Normas Técnicas N°28, editado por el INS son aplicables para el cumplimiento de las disposiciones relacionadas a la toma de muestras del presente manual.

SECCIÓN 4

CONSERVACIÓN, EMBALAJE, TRANSPORTE Y REMISIÓN DE CEPAS

4.1 CONSERVACIÓN DE CEPAS

4.1.1 Conservación por períodos cortos

4.1.1.1 Se recomienda que las cepas de trabajo se conserven en medio agar tripticasa soya en plano inclinado, pH 7,2 - 7,4.

4.1.1.2 Procedimiento

- a. Preparar el medio de cultivo adicionando agar (1,5%) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- b. Distribuir en tubos 13 x 100 con tapa rosca o en tubos de 1,5 mL hasta 2/3 de la capacidad total.
- c. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C. Dejar solidificar en posición vertical.
- d. Sembrar a partir de las cepas sospechosas, mediante 3 o 4 punciones hasta el fondo.
- e. Incubar a 35°C - 37°C durante 18 a 24 horas.
- f. Cerrar o sellar con parafilm para evitar evaporación.
- g. Conservar a 4°C - 8°C.

NOTA: Para microorganismos exigentes o fastidiosos sembrar por estrías en agar chocolate enriquecido.

4.1.2 Conservación por períodos prolongados

La crioconservación es considerada el método casi ideal y al alcance de los laboratorios. Pueden mantenerse liofilizados en nitrógeno líquido o con crioprotectores. Los crioprotectores más comunes que pueden ser usados son la leche descremada, glicerol, sacarosa, sangre de carnero desfibrinada o suero fetal bovino.

4.1.2.1 Procedimiento

- a. Preparar caldo tripticasa soya con glicerol al 20% v/v.
- b. Distribuir en tubos 13 x 100 con tapa rosca o en tubos de 1,5 mL hasta 2/3 de la capacidad total. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos y dejar enfriar.
- c. Hacer una suspensión bacteriana directamente en el caldo glicerol a partir de la cepa sospechosa de causar el brote.
- d. Congelar inmediatamente a -20°C o -70°C.

4.1.3 Recuperación de cultivos conservados

4.1.3.1 *Congelados:* Descongelar los tubos conteniendo las bacterias criopreservadas en baño de agua entre 36°C a 37°C. Transferir una alícuota del tubo a un medio apropiado como agar tripticasa soya e incubar entre 35°C a 37°C durante 18 - 24 horas.

- 4.1.3.2 *Cultivos en agar*: Con un asa de siembra estéril romper el agar y tomar una asada para sembrar en medio sólido o caldo tripticosa soya que deberá sembrarse en agar si no se obtuviera desarrollo en las placas. Incubar entre 35°C a 37°C durante 18 - 24 horas y realizar otro subcultivo obteniendo colonias aisladas antes de ser utilizadas.

4.2 EMBALAJE

- 4.2.1 Se recomienda el uso de contenedores individuales, resistentes a fisuras, golpes y rupturas y deben tener tapa de rosca.
- 4.2.2 Deben tener sus tapas selladas con cinta de seguridad (parafina) y envueltos en papel toalla o material absorbente e introducidos preferentemente en una funda plástica resistente.
- 4.2.3 El tubo conteniendo a la cepa debe ser colocado en otro envase metálico o de plástico, igualmente resistente a las fisuras y rupturas. Colocar suficiente material absorbente a su alrededor para que resista y amortigüe los golpes.
- 4.2.4 Este segundo envase debe empacarse con suficiente seguridad, para protegerlo contra daños físicos y agua.
- 4.2.5 Además, se coloca en un paquete de envío que lo protege de los elementos externos, tales como daño físico, mientras se encuentra en tránsito.
- 4.2.6 Después de cerrarlos, limpiar cada envase por fuera con un desinfectante (Ejemplo: solución de cloro al 0,1%) y luego secarlos completamente.
- 4.2.7 Al recibir y antes de abrir los envases, éstos deben limpiarse con un desinfectante (Ejemplo: solución de cloro al 0,1%) y luego colocarse en gradillas de metal o plástico resistentes a fisuras.

4.3 TRANSPORTE Y REMISIÓN DE CEPAS

- 4.3.1 Las cepas no deben enviarse si antes no se han realizado las coordinaciones entre el servicio de transporte y la persona que ha de recibirlas, indicando la fecha de envío, el número de guía, el itinerario y el número de vuelo.
- 4.3.2 Debe elegirse el itinerario más directo, con el menor número de transbordos y esperas de tránsito. Se procurará que el envío no llegue sábado, domingo o días feriados.
- 4.3.3 Todas las cepas deben enviarse rotuladas, indicando el código del paciente y la fecha de obtención de la muestra escritos con lápiz en la cinta adhesiva (tipo maskingtape) o esparadrapo. No debe emplearse tinta ni cinta de papel, pues son vulnerables a la humedad. Esta información deberá protegerse de todo daño o humedad y deberá colocarse en la parte exterior de la caja de embalaje protegida, de preferencia cubierta por una envoltura plástica.
- 4.3.4 La caja debe poseer exteriormente flechas, una leyenda acerca de la posición en que debe manejarse, y con las indicaciones de **"URGENTE, FRAGIL, MATERIAL BIOLÓGICO, POSICIÓN VERTICAL, ENTREGA INMEDIATA, NO ABRIR SIN AUTORIZACIÓN, MATERIAL CONTAMINANTE y PELIGROSO"**. Incluir además una etiqueta de bioseguridad, el teléfono y la dirección del destinatario.

SECCIÓN 5

ENSAYO O ANÁLISIS EN LABORATORIO

El advenimiento y desarrollo de la tecnología molecular nos permite contar con nuevos métodos que colaboran con la epidemiología de las infecciones dado su gran poder de subtipificación de microorganismos. A continuación se describirán los fundamentos de los métodos a utilizarse en la confirmación de brotes mediante diferentes técnicas de biología molecular:

5.1 ANÁLISIS PLASMÍDICO

5.1.1 Es una metodología sencilla usada en muchos patógenos microbianos y que en la actualidad cuenta con protocolos simplificados y equipos y materiales de uso estándar en los laboratorios.

5.1.2 Los plásmidos son descritos como elementos extracromosomales hereditarios móviles, los cuales pueden replicarse autónomamente y sus tamaños se encuentran en el rango de 1 a 200 Kb (Figura N° 1). Aunque ellos no son esenciales para la vida de las bacterias, los plásmidos muchas veces codifican factores (resistencia a antimicrobianos, resistencia a desinfectantes, tolerancia al estrés, etc.) que le permiten sobrevivir en ambientes selectivos y adversos o competir frente a otros microorganismos que ocupan el mismo nicho ecológico.

5.1.3 El análisis del perfil plasmídico es un método ampliamente aplicado en la investigación epidemiológica y muchas veces ofrece información diferente y complementaria a la obtenida por metodologías de análisis de diversidad, cuando la aplicación de éstas últimas no generan suficiente información.

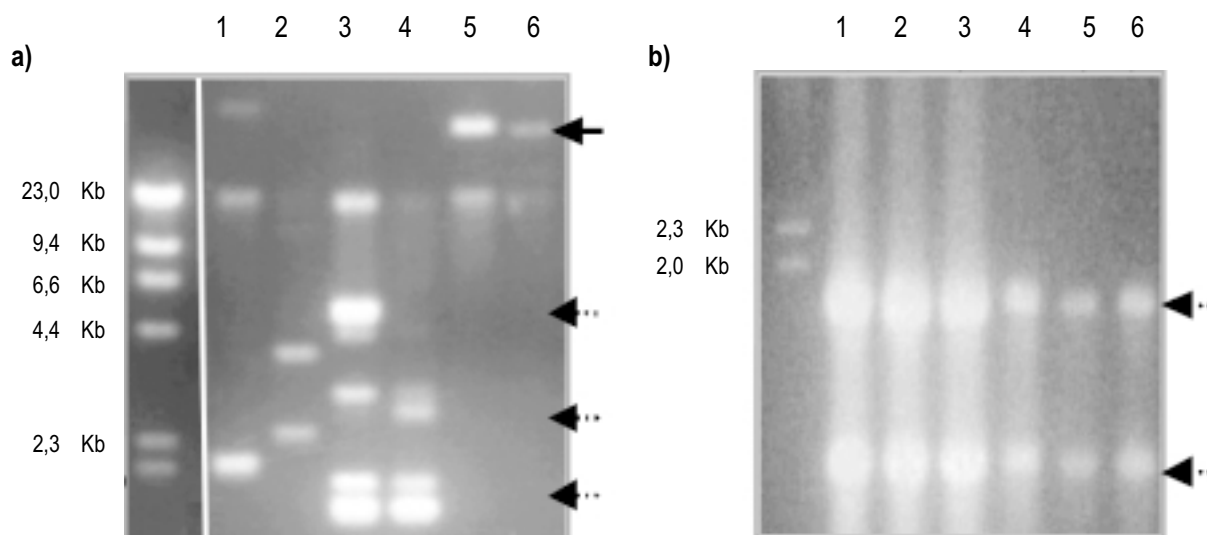


Figura N° 1. a) Perfiles plasmídicos distintos obtenidos entre aislamientos intrahospitalarios de *Salmonella typhimurium* (1-2) y *Klebsiella pneumoniae* (3-6) que aparecieron en un mismo período. b) Perfiles plasmídicos similares obtenidos a partir de aislamientos intrahospitalarios de *Enterobacter cloacae* (1-3) y *Klebsiella pneumoniae* (4-6) que aparecieron en un mismo período. Se observa el ADN genómico (g) y además diferentes plásmidos de alto (→) y bajo peso molecular (· · ▶).

5.1.4 Ventajas y Limitantes

- 5.1.4.1 Los plásmidos pueden adoptar diferentes estructuras conformacionales (enrollados, relajados circulares y lineales), lo cual puede ser exitosamente resuelto mediante la digestión con endonucleasas de restricción, pudiéndose utilizar estas enzimas también en casos de existir un único plásmido, como en algunas cepas de *Staphylococcus aureus*.
- 5.1.4.2 La limitante que presenta este análisis es que las bacterias pueden perder o transferir sus plásmidos, de ser así, la oportunidad de realizar este análisis podría ser perdido. El riesgo de que las bacterias pierdan sus plásmidos se ve incrementado cuando las bacterias son replicadas en medios de cultivos. Por ello, se recomienda que este análisis debería realizarse en bacterias con el menor número de subcultivos.
- 5.1.5 El ADN plasmídico de cada cepa es aislado mediante un protocolo sencillo, que se basa en una drástica lisis a pH alcalino, seguida por una precipitación del material proteico y el ADN genómico gracias a la adición de sales. Luego el perfil plasmídico es evaluado en geles mediante electroforesis convencional y en caso exista similitud entre ellos se procede a una purificación y digestión con enzimas de restricción para una nueva evaluación.
- 5.1.6 El análisis del perfil plasmídico se basa en examinar y comparar el número y tamaño de bandas entre los aislamientos, permitiéndolos agrupar de acuerdo a la coincidencia de sus bandas. Asimismo, se busca la existencia de uno o varios factores genéticos que podrían favorecer la diseminación de las especies o variantes circulantes.

5.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD CLONAL

Para evaluar si los aislamientos del brote corresponden a una misma variante, se analizará el ADN genómico mediante el uso de metodologías moleculares, tales como:

5.2.1 Ribotipificación

- 5.2.1.1 Es un sistema de tipificación por RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción de ADN) el cual consiste en cortar secuencias específicas de ADN usando enzimas de restricción, generando múltiples fragmentos. La ribotipificación está basada en la técnica de hibridación, en donde un determinado gen referencial (el ADN ribosomal) se unirá a las secuencias complementarias ubicadas en el ADN genómico del microorganismo evaluado. En casos aplicados como el presente, cada una de las señales producidas por la hibridación representa una copia del gen referencial ubicado en el genoma del microorganismo evaluado. Por lo tanto el número y la ubicación de las copias serán representativos para cada aislamiento y para cada especie, proporcionando un perfil característico denominado ribotipo (ver Figura N° 2).
- 5.2.1.2 El análisis de ribotipificación se fundamenta en la diversidad de los genes que codifican el ARN ribosomal entre las especies. Estos genes se encuentran presentes en el genoma bacteriano en múltiples copias, cuyo número y localización depende de la especie. Sin embargo, existen especies que tienen un número de copias muy limitado, para las cuales este sistema de tipificación no está recomendado (Ejemplo: *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, *Borrelia burgdorferi*).

5.2.1.3 Al igual que el análisis plasmídico, el análisis del perfil ribotípico se basa en examinar y comparar el número y tamaño de bandas entre los aislamientos, permitiéndolos agrupar de acuerdo a la coincidencia de sus bandas. La cantidad de información genética existente entre y dentro de los genes ribosomales es heterogénea en diferentes aislamientos a lo largo de un período de tiempo, se pueden perder o insertar copias de los genes ribosomales o secuencias diferentes, lo que genera que los perfiles sean similares o distintos, según sea el caso. Todo ello explica la posibilidad de diferenciar aislamientos epidemiológicamente relacionados mediante la ribotipificación, lo cual se resume en la gran diversidad inter y extra especies que existen entre los genes ribosomales.

5.2.1.4 Finalmente, el procedimiento de la ribotipificación consiste en purificar el ADN total o genómico de cada aislamiento bacteriano para subsecuentemente digerirlo con una endonucleasa de restricción. Los fragmentos de ADN son separados por electroforesis y luego transferidos a una membrana de nylon. Después, la membrana conteniendo el ADN es hibridizada con una sonda de ADN ribosomal, para finalmente revelar las uniones de la sonda mediante reacciones quimioluminiscentes. Esto permite el desarrollo de un patrón que será característico y similar en aquellos aislamientos bacterianos epidemiológicamente relacionados, y distinto en aquellos no relacionados.

5.2.1.5 *Ventajas*

- a. Esta técnica proporciona resultados ampliamente reproducibles
- b. Para algunas especies, esta técnica tiene un moderado poder discriminativo
- c. Es aplicable a cualquier tipo de microorganismo bacteriano

5.2.1.6 *Desventajas*

- a. Su costo es medianamente alto frente a otras metodologías
- b. Depende del marcaje de la sonda por lo que normalmente no se encuentra disponible en muchos centros de investigación.

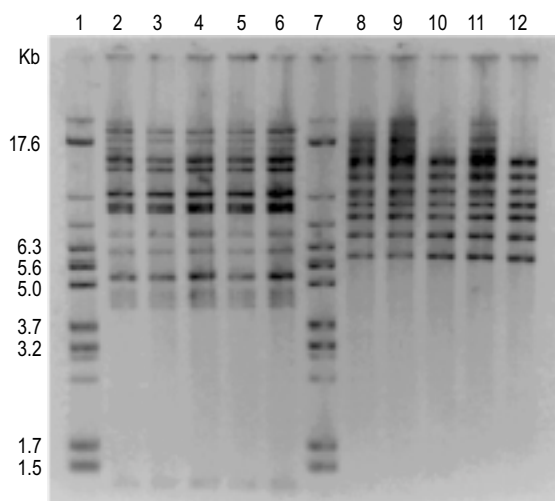


Figura N° 2. Patrones de ribotipificación de *E. cloacae* (líneas 2 al 6) y *E. agglomerans* (líneas 8 al 12) provenientes de aislamientos obtenidos de hemocultivos y soluciones administradas a pacientes (Tomado de Gonçalves y col., 2000). Los patrones ribotípicos similares, compuestos por 13 bandas en *E. cloacae* confirman que los aislamientos están epidemiológicamente relacionados. En cambio, los patrones ribotípicos distintos, compuestos por 7 a 13 bandas en *E. agglomerans* confirman que los aislamientos se encuentran epidemiológicamente poco relacionados.

5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) es una metodología que se basa en la amplificación enzimática de una región de ADN que corresponden a un gen o parte de él. Las porciones de ADN que sirven de molde para la amplificación son flanqueadas por dos oligonucleótidos que inician la reacción de polimerización, usando una enzima denominada ADN polimerasa. Además, son usados desoxinucleótidos trifosfato, para la construcción del ADN, el cloruro de magnesio donde el ión Mg^{+2} es necesario como cofactor de la enzima y un buffer que le proporcionarán al sistema las condiciones de salinidad y pH que favorecerán la actividad enzimática.

5.2.2.1 RAPD

a. El RAPD (Polimorfismo de la amplificación aleatoria de ADN) es una variante de PCR, generalmente usado para tipificación de microorganismos. Está basado en el uso de oligonucleótidos pequeños (≤ 20 pb) que se unen inespecíficamente y aleatoriamente al genoma del microorganismo generando la amplificación de muchas secuencias de diversos tamaños. Al igual que el análisis plasmídico y la ribotipificación, el análisis de los perfiles producidos por el RAPD se basan en examinar y comparar el número y tamaño de bandas entre los aislamientos, permitiéndolos agrupar de acuerdo a la coincidencia. Si los oligonucleótidos se unen al genoma en regiones cercanas resultarán varios productos que serán particulares para cada aislamiento y su aparición dependerá de alguna forma de la secuencia genética del microorganismo. Por ello las distintas variantes de cada especie presentarán patrones distinguibles entre ellas (Figura N° 3).

b. Ventajas

- Esta técnica no requiere una gran cantidad de ADN, además puede realizarse a partir de una preparación de ADN cruda
- Es rápidos y mayormente fácil de realizar, aunque susceptible a contaminación
- Tiene un gran poder discriminativo entre especies epidemiológicamente no relacionadas

c. Desventajas

- Esta técnica genera un perfil de cada aislamiento bacteriano, pero con reducida reproducibilidad

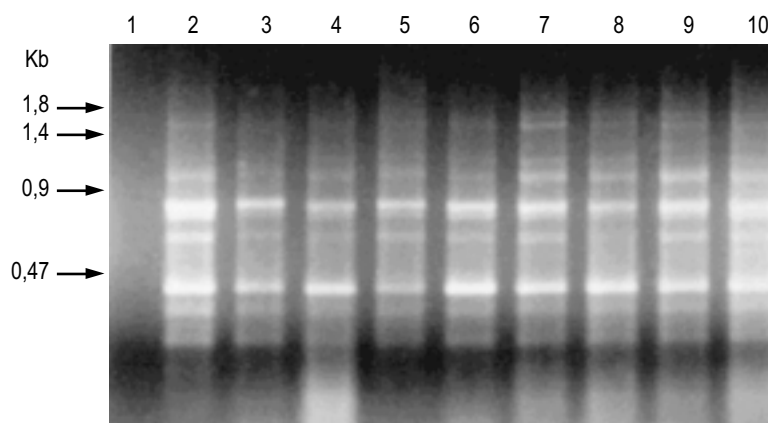


Figura N° 3. Patrones de RAPD-PCR de aislamientos distintos de *Klebsiella pneumoniae*, pero epidemiológicamente relacionados (Tomado de Eisen y col., 1995), dada la alta coincidencia mostrada en el tamaño y número de las bandas.

5.2.2.2 *Rep PCR*

- a. Otra variante de PCR aplicado a la tipificación de microorganismos es el Rep-PCR, que amplifican secuencias repetitivas dispuestas a lo largo del genoma, permitiendo obtener una secuencia de bandas semejantes al RAPD-PCR.
- b. Su lectura e interpretación son similares que el RAPD.
- c. La reproducibilidad y aplicabilidad de éstas metodologías son mayores que el RAPD-PCR, pero sólo en algunas especies su poder discriminativo es similar o menor que la técnica mencionada anteriormente. Existen muchos sistemas basados en el Rep-PCR, entre los cuáles se mencionan:
 - ERIC-PCR, que amplifica las secuencias enterobacterianas repetitivas intergénicas consenso.
 - REP-PCR, que amplifica elementos repetitivos palindrómicos.

5.2.3 **Electroforesis en gel de campo pulsado**

5.2.3.1 La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es una metodología que, en forma similar a la ribotipificación, utiliza al RFLP, con la diferencia que utiliza endonucleasas de restricción de ADN de clivaje o corte infrecuente, obteniéndose de 5 hasta 20 fragmentos de ADN de gran tamaño, mayores de 20 Kilobases. Estos fragmentos no pueden ser separados en geles de electroforesis convencionales, como en el caso de la ribotipificación, por lo que se usa un sistema de separación electroforética de pulsos alternos de corriente multidireccional. Es así, como los grandes fragmentos son separados permitiendo obtener un patrón de ADN cuya interpretación es sencilla.

5.2.3.2 Al igual que los sistemas anteriores, el análisis de los perfiles producidos por el PFGE se basan en examinar y comparar el número y tamaño de bandas entre los aislamientos, permitiéndolos agrupar de acuerdo a la coincidencia. Si las secuencias de restricción están dispersas en el genoma, en determinadas regiones resultarán varios fragmentos que serán particulares para cada aislamiento y su aparición dependerá de alguna forma de la secuencia genética del microorganismo.

5.2.3.3 Los eventos genéticos denominados mutaciones constan de deleciones (eliminación de secuencias), inserciones (inclusiones de secuencias) o cambios de nucleótidos, pudiendo generar la pérdida o la ganancia de un sitio de restricción, lo que generaría un nuevo perfil y en la medida que ello ocurra, disminuiría la similitud del perfil genético.

5.2.4 **Análisis de los perfiles generados por métodos de diversidad clonal**

Un perfil de fingerprint es la secuencia de una serie de fragmentos (bandas) que caracterizan a un aislamiento determinado. Tomando como patrón el análisis usado en los sistemas de tipificación (Ribotipificación, PCR-RAPD, PCR-REP, PFGE), los perfiles de cada aislamiento son comparados buscando algún grado de relación entre ellos, examinando y comparando el número y tamaño de bandas, así como la ubicación o desaparición de fragmentos entre sus perfiles. Basándose en ello se construye un patrón de fingerprint que reúne todas las posiciones en las que se encuentran las bandas. Luego de ello, se determina un valor numérico para cada aislamiento, determinado por la razón entre el número de bandas compartidas entre las no compartidas en cada uno de los casos. Ese número es comparado entre todos los aislamientos, dándonos finalmente una idea gráfica y numérica de la interrelación de los aislamientos. Además, para describir gráficamente las relaciones epidemiológicas entre los aislamientos se construirá un árbol utilizando el programa Kitsch Phylip 3,5v o Gel Compar II (Figura N° 4).

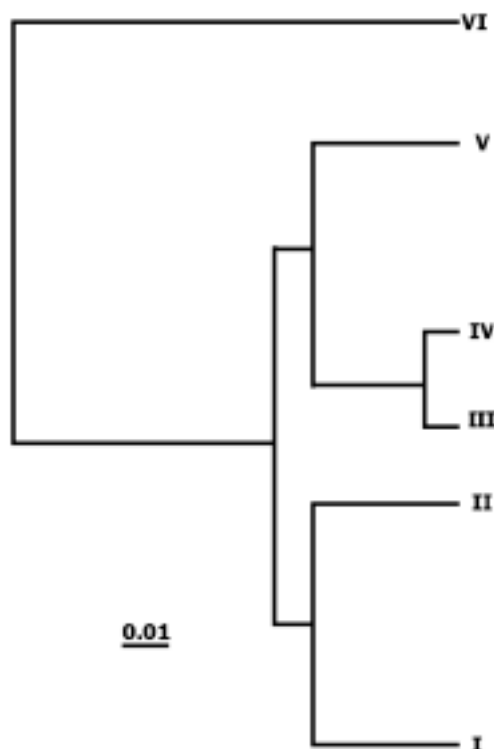


Figura N° 4. Interrelación entre aislamientos bacterianos pertenecientes a un brote intrahospitalario: Árbol que muestra la similitud que existe entre los ribotipos encontrados al analizar los aislamientos bacterianos provenientes de un brote. El software agrupa a los aislamientos o conjunto de aislamientos relacionados, lo que ayuda a establecer posibles vías o rutas de transmisión.

5.2.4.2 Rangos

Al analizar los aislamientos bacterianos se deberán considerar los siguientes rangos:

- a. Cepas indistinguibles: aislamientos que pertenecen a la misma cepa. Existe una coincidencia del 100% entre sus fragmentos.
- b. Cepas cercanamente relacionadas: aislamientos que han sufrido un simple cambio genético, en los que dos a tres bandas pueden no ser coincidentes, existiendo una coincidencia de 80% ó más.
- c. Cepas posiblemente relacionadas: aislamientos en los que han ocurrido dos eventos genéticos independientes y cuyos fragmentos coinciden hasta en 50% o hasta 4 ó 6 bandas de diferencia.
- d. Cepas no relacionadas: aislamientos que han sufrido cambios consistentes en tres o más eventos genéticos, implicando que la similaridad entre los aislamientos es menor de 50%.

5.3 PROCEDIMIENTOS

5.3.1 Análisis plasmídico

5.3.1.1 Extracción de ADN plasmídico de bajo y mediano peso molecular

- a. Inocular el microorganismo en 3 mL de caldo nutritivo (cerebro-corazón, tripticasa soya, etc.) y mantener en agitación durante toda la noche.
- b. Transferir el caldo incubado a tubos de centrifuga de 1,5 mL y concentrar las células por centrifugación a 10000xg durante 30 segundos, eliminar el caldo y secar el sedimento.
- c. Agregar 100 µL de solución de resuspensión (glucosa 50 mM, Tris HCl pH 8,25 mM, EDTA pH 8 10 mM), agitar y resuspender vigorosamente mediante vórtex.
- d. Agregar 200 µL de solución de lisis (NaOH 0,2N, SDS 1%) y mezclar el contenido por inversión del tubo unas pocas veces. No mezclar por vórtex y mantener el tubo en hielo.
- e. Agregar 150 µL de solución de precipitación (acetato de sodio 3M pH 5,2), mezclar el contenido por inversión del tubo por unas pocas veces e incubar durante 3-5 minutos a temperatura ambiente.
- f. Centrifugar a 10000xg a 4 °C durante 5 minutos.
- g. Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclar con el vórtex e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos y centrifugar a 10000xg a 4°C durante 5 minutos.
- h. Remover totalmente el sobrenadante lavar el precipitado dos veces con etanol 70% (el cual se eliminará por aspiración) y dejar secar durante 5 minutos a 42°C (No excederse en tiempo en la estufa).
- i. Finalmente rehidratar el ADN con agua libre de nucleasas, calentar a 65°C durante 10 minutos (buscando eliminar cualquier actividad nucleasa en su contenido) y guardar a -20°C .

5.3.1.2 *Extracción de plásmidos de alto peso molecular*

- a. Inocular el microorganismo en 10 mL de caldo nutritivo (cerebro-corazón, tripticasa soya, etc.) y mantener en agitación durante toda la noche.
- b. Transferir el caldo incubado a tubos de centrifuga de 15 mL, concentrar las células por centrifugación a 10000xg durante 30 segundos y eliminar el sobrenadante.
- c. Resuspender el sedimento en 1 mL de Buffer TAE 1X(0,04 M Tris, 0,04 M ácido acético, 1mM EDTA).
- d. Agregar 2 mL de solución de lisis (NaOH 0,2N, SDS 1% pH 12,6-13,5) y agitar suavemente por inversión unas pocas veces. No mezclar con el vórtex.
- e. Incubar a 55°C durante una hora y agitar suavemente cada 20 minutos por inversión.
- f. Agregar 2 volúmenes de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y emulsificar el contenido por inversión del tubo unas pocas veces y centrifugar a 6000xg a 4°C durante 20 minutos.
- g. Extraer la fase superior acuosa, colocarlos en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y almacenarlos a 4°C.

5.2.1.3 *Evaluación de los perfiles plasmídicos*

- a. Preparar un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Confeccionar el gel de acuerdo a la cámara de electroforesis y colocar un peine para generar pocillos en el gel.

- b. Colocar 5 - 100 μ L de cada extracción de ADN plasmídico en los pocillos preparados en la agarosa. Si se requiere digerir los plásmidos usando endonucleasas de restricción se procederá como en la sección
- c. Iniciar la electroforesis a 100V durante 60 minutos.
- d. Remover el gel y teñirlo con bromuro de etidio 0,1% durante 5-10 minutos. Colocar en un transiluminador UV.
- e. Registrar fotográficamente los perfiles.

5.3.2 Ribotipificación

5.3.2.1 Extracción de ADN genómico

- a. Inocular el microorganismo en 10 mL de caldo nutritivo (cerebro-corazón, tripticasa soya, etc.) y mantener en agitación durante toda la noche (18 horas).
- b. Transferir el caldo incubado a tubos de centrifuga de 15-50 mL, concentrar las células por centrifugación a 2000xg a 4°C durante 20 minutos y eliminar el caldo de cultivo.
- c. Agregar 10 mL de Buffer STE (100mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 150mM NaCl), resuspender el precipitado totalmente y centrifugar a 2000xg a 4°C durante 20 minutos.
- d. Resuspender el precipitado en 2 mL de buffer TE 10X (100mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8)
- e. Agregar lisozima hasta conseguir una concentración de 200 μ g/mL e incubar a 37°C durante 30 minutos en baño María. Esta enzima permite la disgregación de la pared celular ya que rompe los enlaces glicopeptídicos, confiriendo al lisado celular una apariencia turbia y mucoide.
- f. Agregar SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) hasta conseguir una concentración final de 1% e incubar a 65°C durante 15 minutos hasta clarificar el contenido. Las membranas celulares serán disueltas por acción del detergente.
- g. Agregar proteinasa K hasta conseguir una concentración de 200 μ g/mL e incubar a 65°C durante 2 - 4 horas. Esta enzima produce la digestión de proteínas y disgregación de las proteínas asociadas al ADN.
- h. Agregar 2 volúmenes de solución de tiocianato de guanidina 6M, EDTA 20 mM y 0,5% Tween 20, agitar total, minuciosa y suavemente, e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- i. Agregar 300 μ L de acetato de amonio 7,5 M y agitar por inversión hasta homogenizar.
- j. Emulsificar totalmente durante 5 minutos con cloroformo alcohol isoamílico (24:1 v/v).
- k. Centrifugar a 6000xg a 4°C durante 25 minutos. Las estructuras celulares remanentes de la lisis son rápidamente disueltas por agentes denaturantes, tales como las sales guanidina y detergentes; las asociaciones nucleoproteicas son desintegradas al igual que las estructuras secundarias de las proteínas; inactivando las nucleasas para mantener el ADN intacto.

- l. Extraer el sobrenadante a un tubo nuevo, cuidando de no extraer la interfase
- m. Agregar NaCl hasta conseguir una concentración final de 0,3 M y mezclar totalmente por suave inversión.
- n. Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto y mezclar cuidadosamente la solución hasta la formación de un precipitado de aspecto nuboso. El ADN deshidratado toma la apariencia de fibras blancas muy lábiles, las cuáles son cuidadosamente extraídos con una pipeta Pasteur.
- o. Lavar dos veces con etanol 70%, eliminar el renamente por aspirado con pipeta y secar durante 5 minutos a 42°C. No exceder ese tiempo en la estufa.
- p. Resuspender el ADN en 100 - 500 μ L de buffer TE y calentar a 65°C durante 10 minutos para eliminar alguna actividad endonucleasa en su contenido.
- q. Guardar a 4°C para mantener por períodos largos evitando que ocurra degradación y ruptura de las fibras de ADN. Además, manipularlo con tips de extremos romos.

5.3.2.2 *Cuantificación de ADN*

- a. La cantidad de ADN presente en una solución puede ser determinada mediante la absorción de la radiación ultravioleta a 260 nm de longitud de onda.
- b. Agregar 1895 μ L de agua, disolver 100 μ L de cloruro de sodio (NaCl) 2M, agregar 5 μ L de ADN y mezclar en vórtex.
- c. Colocar el contenido en una cubeta de cuarzo limpia y leer la densidad óptica a 260 nm y posteriormente 280 nm.
- d. El ADN necesita ser denaturado con una solución de NaCl. La luz UV es absorbida por las bases nitrogenadas expuestas en las hebras libres del ADN en proporción directa a su concentración en la solución. Así, la incidencia de luz UV servirá para determinar la cantidad de ADN que existe en una solución, teniendo en cuenta la siguiente relación: 1 Unidad de Densidad óptica (1 DO) que corresponde aproximadamente a 50 μ g/mL de ADN.
- e. Para determinar el grado de pureza que existe en una solución de ADN se realiza una lectura de la absorbancia a 280 nm. La relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (DO260/DO280) proveen un valor de estimación del grado de pureza del los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras de ADN tienen un valor de 1,8. Si existe contaminación con solventes (fenol) o proteínas, la relación DO260/DO280 es menor, indicando la existencia de impurezas.

5.3.2.3 *Control de calidad del ADN por electroforesis en geles de agarosa*

- a. Preparar un gel de agarosa 1% en TAE 1X y colocar un peine para generar pocillos en donde se puedan colocar las muestras sobre el gel.
- b. Luego de la solidificación del gel, colocar 5-10 μ L de ADN. Iniciar la electroforesis a 50V durante 30-60 minutos.

- c. Desmantelar el gel, teñirlo con bromuro de etidio 0,1% durante 5-10 minutos y colocarlo en un transiluminador UV. El ADN debe observarse como una banda que migre alrededor de un peso molecular de 20 Kb.

5.3.2.4 *Obtención de ADN ribosomal mediante PCR*

- a. Amplificar una región de 1490 pb correspondiente al gen 16S de ADN ribosomal usando ADN genómico de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Para ello, se utilizarán los siguientes oligonucleótidos: PC5: 5'-TAC CTT GTT ACG ACT T 3' y PO: 5'-AGA GTT GAT CMT GG-3'.

- b. La mezcla de la reacción contendrá:

Primers	20 pmoles	Buffer PCR (10X)	1X
Desoxinucleótidos trifosfato	5 nmoles	Taq ADN Polimerasa	1U
MgCl ₂	1,5 mM	ADN molde	5 ng

- c. El programa de PCR en el termociclador consistirá en: denaturación a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 33°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos; y extensión final a 72°C durante 10 minutos.

- d. Luego, separar el producto de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa low melting point, verificando el tamaño molecular del fragmento de ADN; ubicar la molécula y extraer la porción de agarosa que la contenga.

- e. Colocar el fragmento de agarosa en un tubo de 1,5 mL e incubar en baño María a 65°C mediante 10 minutos para fundir la agarosa.

- f. Agregar 1 mL de resina (Wizard PCR prep., PROMEGA) y agitar minuciosamente mediante pipeteo suave.

- g. Colocar la mezcla dentro de una columna que contiene una membrana de sílica y usando una bomba de vacío, vaciar la mezcla a través de ella.

- h. Lavar 2 veces la columna con 1 mL de isopropanol al 80% y mantener en la bomba de vacío durante 20 segundos, para extraer la mayor cantidad posible de isopropanol.

- i. Eliminar el remanente de isopropanol mediante centrifugación de la columna a 10000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente.

- j. Agregar 50 µL de agua estéril, incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 10000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente.

- k. Cuantificar la cantidad de ADN purificado usando el protocolo descrito en la sección 5.3.2.2.

5.3.2.5 *Preparación de la sonda*

- a. Tomar 100 ng de ADN ribosomal purificado y someter a denaturación por calor a 95°C durante 5 minutos.

- b. Retirarla del calor y colocarla rápidamente en un baño helado a -20°C durante 5 minutos.
- c. Adicionar $10\ \mu\text{L}$ de reactivo de marcaje (kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling, Amersham Pharmacia Biotech[®]) que consta de la enzima peroxidasa positivamente cargada y mezclar minuciosamente por pipeteo suave.
- d. Agregar glutaraldehído e incubar a 37°C en baño maría durante 10 minutos. La enzima se unirá aleatoriamente a las simples hebras de ADN.

5.3.2.6 *Restricción de ADN genómico*

Utilizando $1-2\ \mu\text{g}$ de ADN plasmídico. Luego, colocar todo el volumen producto de la restricción enzimática de ADN en el gel.

- a. Incubar $1-10\ \mu\text{g}$ de ADN genómico a 37°C durante 2 a 4 horas con la respectiva enzima de restricción, que será escogida de acuerdo a la especie bacteriana analizada, en una razón de $5\text{U}/\mu\text{g}$ de ADN y utilizando las especificaciones del fabricante de la enzima.
- b. Luego incubar a 65°C durante 10 minutos con el fin de detener la actividad de la enzima de restricción.

5.3.2.7 *Electroforesis*

Los fragmentos que se generarán por la digestión enzimática serán separados por electroforesis en agarosa.

- a. Preparar un gel de agarosa al 1% en TAE 1X, confeccionar el gel de acuerdo a la cámara de electroforesis y colocar un peine para generar pocillos en el gel
- b. Colocar el volumen producto de la restricción enzimática de ADN en el gel
- c. Iniciar la electroforesis a 25V durante toda la noche
- d. Desmantelar el gel, teñirlo con bromuro de etidio 0,1% durante 5 - 10 minutos y colocarlo en un transiluminador UV. El ADN digerido debe observarse como muchas bandas subsecuentes que migran desde un peso molecular de 20 Kb hasta el final del gel.
- e. Registrar fotográficamente los perfiles.

5.3.2.8 *Transferencia capilar*

- a. Colocar el gel en una bandeja, agregar HCl 0,25 N e incubar en agitación constante a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Luego, retirar la solución y enjuagar dos o tres veces con agua destilada durante 20 segundos.
- b. Agregar una solución de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M e incubar durante 25 minutos. Luego, retirar la solución y enjuagar dos o tres veces con agua destilada durante 20 segundos.
- c. Neutralizar con una solución de Tris HCl 0,5 M pH 8,0 y NaCl 1,5 M durante 30 minutos.

- d. Cortar piezas de papel filtro Whatman 3MM del mismo tamaño del gel y cortar la membrana de nylon y papel secante (papel toalla).
- e. En una bandeja plástica, colocar un soporte plástico y sobre este último, colocar una hoja de papel filtro dos o tres veces más ancho que el gel, pero de la misma longitud. Agregar solución salino citrato-20X (SSC-20X: NaCl 3 M y citrato de sodio 0,3M) a la bandeja.
- f. Colocar un papel Whatman 3MM y sobre él, colocar el gel cara abajo.
- g. Colocar la membrana de nylon previamente saturada en buffer SSC 10 X.
- h. Colocar el papel secante encima de la membrana como un sandwich y mantenerlo fijo durante 16 a 24 horas. Se generará una migración de iones desde el buffer, los cuales atravesarán el gel hacia la membrana mediante el uso de papel secante apilado con un peso de 0,5 - 1 kg.
- i. Desmontar el sandwich, retirar la membrana, lavar con buffer SSC 5X para retirar los restos de agarosa y secar la membrana a 37 °C.
- j. Fijar los fragmentos de ADN covalentemente a la membrana de Nylon, por incidencia directa de luz UV durante 5 minutos.

5.3.2.9 *Hibridación*

- a. Colocar la membrana en buffer de hibridación (kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling, Amersham Pharmacia Biotech®) a 42°C durante media hora, el cual bloqueará las zonas no cubiertas por ADN. Luego, agregar la sonda de ADN ribosomal al mismo buffer y, en agitación constante durante toda una noche (18-24h), esperar que se una a las secuencias existentes.
- b. Lavar 2 veces la membrana con úrea 6M, SDS 0,4% y SSC 0,5X a 42°C durante 20 minutos y con SSC 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos cada uno. Estos lavados son los responsables de la especificidad de la hibridación ya que permiten que sólo se detecten las copias de ADN ribosomal presentes en cada microorganismo.
- c. Colocar la membrana sobre un papel plástico lo suficientemente grande que permita envolverla.
- d. Agregar 1 a 3 mL del sustrato (kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling, Amersham Pharmacia Biotech®) y dispersar por toda la superficie de la membrana.
- e. Cubrir totalmente la membrana con el papel plástico.
- f. En oscuridad, colocar una película de radiografía sobre la membrana envuelta. Incubar por 30-60 minutos.
- g. Posteriormente y también en oscuridad, retirar la película, tratar con una solución reveladora (Kodak®) e incubar por 3-5 minutos.
- h. Tratar la película con una solución fijadora (Kodak®), incubar por 3-5 minutos, lavar con agua corriente y dejar secar.

- i. Registrar los patrones en un software.

5.3.3 PCR

5.3.3.1 Inocular el microorganismo en 10 mL de caldo nutritivo (cerebro-corazón, tripticasa soya, etc.) y mantener en agitación durante toda la noche (18 horas).

5.3.3.2 Realizar diluciones 1:10 en agua destilada y verificar la concentración de los cultivos por densidad óptica (OD) a 600 nm hasta obtener un valor de 0,75. Usar 2,5 µL como ADN molde o en caso contrario se usarán 200 ng de ADN purificado según el protocolo descrito anteriormente.

5.3.3.3 La mezcla de la reacción contendrá:

Primers	20 pmoles	Buffer PCR (10X)	1X
Desoxinucleótidos trifosfato	5 nmoles	Taq ADN Polimerasa	2U
MgCl ₂	5 mM	ADN molde	2 µL

5.3.3.4 El programa de PCR en el termociclador consiste en lo siguiente:

RAPD

Denaturación a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 35°C durante 20 segundos con una extensión en el tiempo de 1 segundo y un incremento en la temperatura de 0,3°C durante cada ciclo y 72°C durante 2 minutos; y extensión final a 72°C durante 10 minutos

REP

Denaturación a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 95 durante 30 segundos, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos; y extensión final a 72°C durante 10 minutos.

5.3.3.5 *Evaluación de los perfiles PCR*

- Preparar un gel de agarosa al 1,5% en TAE 1X. Confeccionar el gel de acuerdo a la cámara de electroforesis y colocar un peine para generar pocillos en el gel.
- Colocar 5-10 µL de cada producto de amplificación en los pocillos preparados en la agarosa e iniciar la electroforesis a 100V durante 60 minutos.
- Remover el gel, teñirlo con bromuro de etidio 0,1% durante 5-10 minutos y luego colocarlo en un transiluminador UV.
- Registrar fotográficamente los perfiles y evaluar en un software

SECCIÓN 6

DIAGNÓSTICO

6.1 CONDICIONES PREVIAS (Anexos A y B)

Al solicitar la confirmación del brote intrahospitalario mediante métodos de biología molecular es necesario tener en cuenta varios aspectos:

- 6.1.1 Es importante que el hospital cuente con un sistema de vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias que permita la identificación oportuna de un potencial brote intrahospitalario y que facilite la investigación del mismo.
- 6.1.2 Un apoyo importante para las labores de vigilancia epidemiológica lo brinda el laboratorio de microbiología mediante la identificación bacteriana y la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos.
- 6.1.3 El laboratorio de microbiología debe realizar el control de calidad interno y externo de sus procedimientos que garantice la idoneidad de sus resultados.
- 6.1.4 Es importante la coordinación entre los servicios de microbiología y epidemiología y el comité de control de IIH.
- 6.1.5 Detectado el incremento inusual del número de casos para un tipo de IIH en un servicio y período determinado, se debe correlacionar esta información con el servicio de microbiología.
- 6.1.6 En caso que estos pacientes posean resultados de cultivos positivos a un mismo germen y patrón de sensibilidad semejantes, entonces el servicio de microbiología procederá a notificar dicho hallazgo a la unidad de epidemiología y al comité de control de IIH de su hospital.
- 6.1.7 Posteriormente, a través de la dirección del hospital se solicitará al Instituto Nacional de Salud (INS) la confirmación del brote por métodos de biología molecular.
- 6.1.8 Los aislamientos que ingresen al Laboratorio de Referencia para la investigación molecular de brotes intrahospitalarios, deberán necesariamente estar acompañados de lo siguiente:
 - 6.1.8.1 Formulario para el envío de cepas para la confirmación de brotes infecciosos intrahospitalarios (Anexo C).
 - 6.1.8.2 Resumen de la investigación epidemiológica realizada hasta la fecha del envío de las cepas sospechosas (Anexo D). Dicho resumen deberá constar de las siguientes partes:
 - a. Tipo de IIH
 - b. Fecha de inicio
 - c. Servicio

- d. Germen
- e. Número de casos
- f. Número de fallecidos
- g. Gráfica de incremento de casos
- h. Hipótesis de causa probable

6.2 CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Una vez recibidas las cepas por el INS, se procederá de la siguiente forma:

- 6.2.1 Se verificará las condiciones de las cepas enviadas (deseccación del medio de transporte, contaminación, rotura o apertura del envase de envío). En caso de encontrarse en buenas condiciones, se procederá con el siguiente paso.
- 6.2.2 El Laboratorio de Bacteriología Especial del Centro Nacional de Salud Pública del INS procederá a realizar la identificación y sensibilidad de los aislamientos, siguiendo las pautas dadas en el Manual de Procedimientos Bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias - serie de Normas Técnicas N° 28 (2001) y en el Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión - Serie de Normas Técnicas N° 30 (2002) con fines de control de calidad y confirmación de la identificación y sensibilidad.
- 6.2.3 Independientemente de los resultados, el INS emitirá un primer informe, pudiendo presentar varias posibilidades:
 - 6.2.3.1 Se confirma que todas las cepas son de igual especie y patrón de susceptibilidad notificada por el hospital. En este caso, se notificará al hospital y se remitirá dichas cepas a la división de Biología Molecular del INS para que proceda con los exámenes correspondientes.
 - 6.2.3.2 Se confirma que algunas cepas son de igual especie y patrón de susceptibilidad, mientras que otras cepas son diferentes en ambos casos. Se notifica al hospital y se remitirán las cepas concordantes a la unidad de biología molecular del INS para que proceda con los exámenes correspondientes.
 - 6.2.3.3 Se confirma que todas las cepas tienen igual especie, pero se difiere marcadamente en cuanto al patrón de susceptibilidad notificada por el hospital. En este caso, se procederá a notificar los hallazgos al hospital.
 - 6.2.3.4 Se confirma que todas las cepas tienen diferente especie. En este caso se procederá a notificar los hallazgos al hospital.

6.3 CONFIRMACIÓN POR BIOLOGÍA MOLECULAR

- 6.3.1 Una vez recibidas las cepas que han pasado el control de calidad, la unidad de biología molecular del INS procederá a realizar los ensayos correspondientes según especie (ver tabla adjunta).

- 6.3.2 Estas metodologías son recomendadas de acuerdo a su reproducibilidad y poder discriminativo que tienen éstas sobre las especies y la utilidad de la información que proporcionan acerca de sus características fisiológicas de impacto epidemiológico, principalmente resistencia antimicrobiana, entre otras.
- 6.3.3 El ensayo de PFGE es reconocido como patrón de oro de los sistemas de tipificación molecular aún se encuentra en proceso de implementación en el Instituto Nacional de Salud, razón por la cual no será utilizado para los fines del presente manual.
- 6.3.4 Otras bacterias pueden ser incluidas para la investigación molecular siempre y cuando constituyan brotes intrahospitalarios.

TABLA DE DESCRIPCIÓN DE DIFERENTES ANÁLISIS MOLECULARES POR ESPECIE BACTERIANA

ESPECIE BACTERIANA	METODO DE TIPIFICACIÓN	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 16S Ribotipificación • PCR • PFGE 	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis plasmídico • Factores genéticos de resistencia antimicrobiana
<i>Serratia marcescens</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Enterobacter</i> spp.		
<i>Salmonella</i> spp.		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 16S Ribotipificación • PFGE 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>mec</i> PCR • Factores genéticos de resistencia antimicrobiana
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • PFGE • RAPD - PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Factores genéticos de resistencia antimicrobiana
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Enterococcus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • PFGE • PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>van</i> PCR

6.4 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

- 6.4.1 La información clínica, epidemiológica, microbiológica y molecular será analizada para determinar la similitud de los aislamientos que constituyeron el brote de manera conjunta con el equipo hospitalario.
- 6.4.2 Además, en caso existan aislamientos procedentes de muestras ambientales, se determinarán las fuentes y vías de transmisión potenciales que generaron la ocurrencia de infección intrahospitalaria.

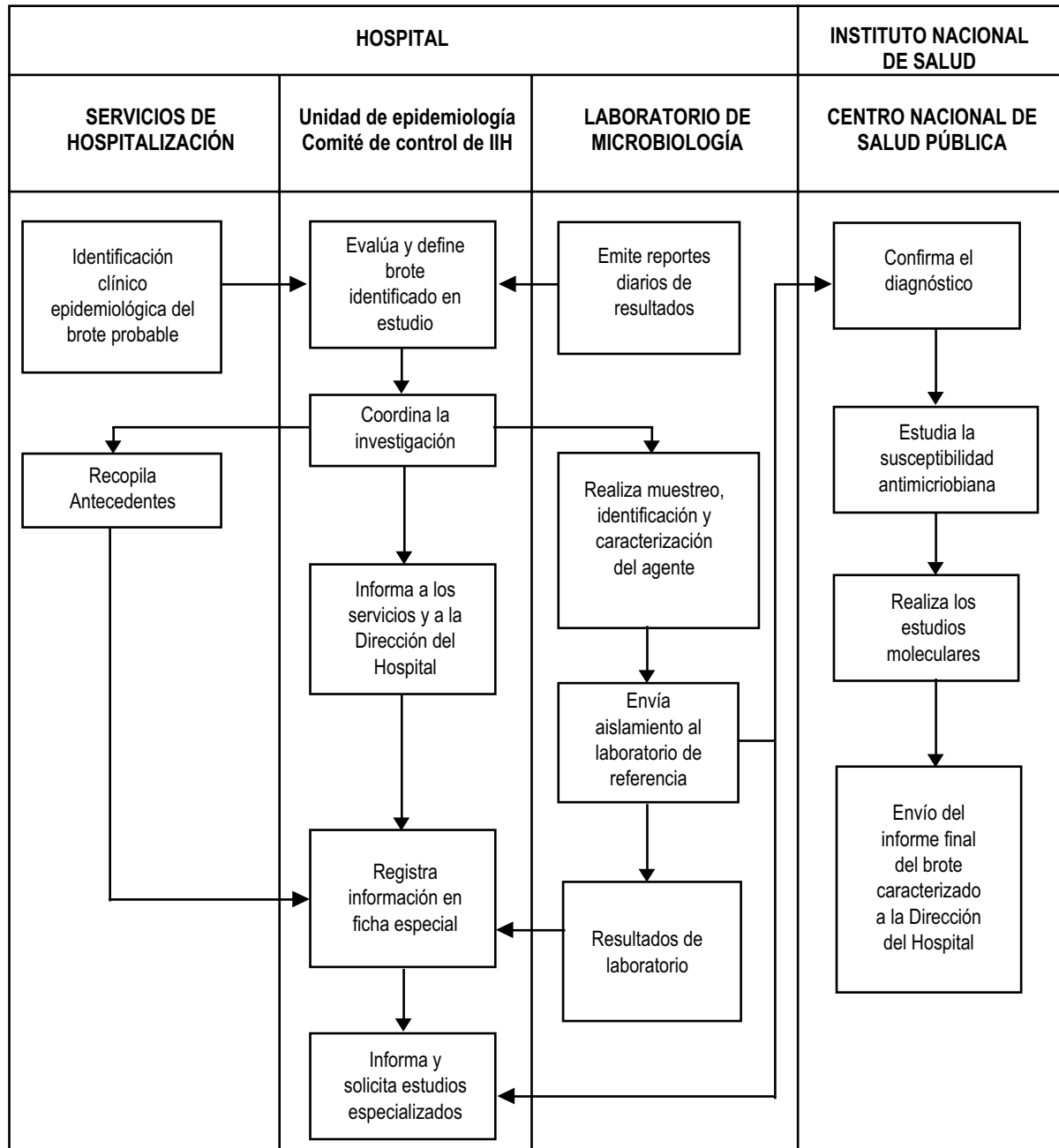
BIBLIOGRAFÍA

- **Bingen EH, Denamur E, Elion J.** Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *J Clin Microb* 1994; 7(3):311-27.
- **Chetoui H, Delhalle E, Melin P, Struelens MJ, De Ryck R, Osterrieth P, et al.** Typing nosocomial strains of *Serratia marcescens*: comparison of pulsed field gel electrophoresis of macrorestriction fragments with biotyping, esterase typing and ribotyping. *Res Microbiol* 1998; 149(2):137-43.
- **Gonçalves CR, Vaz Tmi, Leite D, Pisani B, Simões M, Prandi MA, et al.** Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000; 42 (1): 1-7.
- **Darlini ALC, Magalhães VD, Levy CL, Barth AL, Coscina AL.** Phenotyping and genotyping methods applied to investigate the relatedness of Brazilian isolates of *Enterobacter cloacae*. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 1077-81.
- **Dasen SE, Lipuma JJ, Kostman JR, Stull TL.** Characterization of PCR-ribotyping for *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J Clin Microbiol* 1994; 32(10) 2422-4.
- **Eisen D, Russell EG, Tymms M, Roper EJ, Grayson ML, Turnidge J.** Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(3):713-7.
- **Gustafarro CA, Persing DH.** Chemiluminiscent universal probe for bacterial ribotyping. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (4): 1039-41.
- **Instituto Nacional De Salud.** Manual de normas de bioseguridad. Lima; 1997. Serie de Normas Técnicas N°18.
- **Lew AE, Desmarchelier PM.** (1993) Molecular typing of *Pseudomonas pseudomallei*: Restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1993; 31(3): 533-9.
- **Oficina General de Epidemiología - RENACE - Proyecto VIGIA.** Manual de prevención y control de infecciones intrahospitalarias. Lima: OGE/RENACE/Proyecto VIGIA; 2000.
- **Oficina General de Epidemiología - RENACE - Proyecto VIGIA.** Manual de vigilancia epidemiológica de las infecciones intrahospitalarias. Lima: OGE/RENACE/Proyecto VIGIA; 2000.
- **Oficina General de Epidemiología - RENACE - Proyecto VIGIA.** Protocolo: Estudio de prevalencia de infecciones intrahospitalarias. Lima: OGE/RENACE/Proyecto VIGIA; 1999.
- **Ouchi K, Abe M, Karita M, Oguri T, Igari J, Nakazawa T.** Analysis of strains of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolated in a nosocomial outbreak by biochemical and genomic typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9):2353-7.
- **Peters SM, Bryan J, Cole MF.** Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction typing of isolates of *Enterobacter cloacae* from outbreak of infection in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 2000; 28(2):123-9.

- **Reingold AL.** Outbreak investigations - A perspective. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(1): 21-7.
- **Rutala WA, Weber DJ.** *Nosocomial Infections*. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11(2):
- **Sacsquispe R, Ventura G.** Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima: INS; 2001. Serie de Normas Técnicas N°28.
- **Sacsquispe R, Velasquez J.** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: INS; 2002. Serie de Normas Técnicas N°30.
- **Sechi LA, Zanetti S, Dupré I, Delogu G, Fadda G.** Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1):128-32.
- **Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G.** Differentiation of Burkholderia species by PCR-Restriction fragments length polymorfism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2201-8.
- **Van Belkum A.** DNA fingerprinting of medically important microorganism by use of PCR. *Clin Microbiol Reviews* 7(2): 174-84.
- **Wilson KH, Blichington RB, Greene RC.** Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (9): 1942.

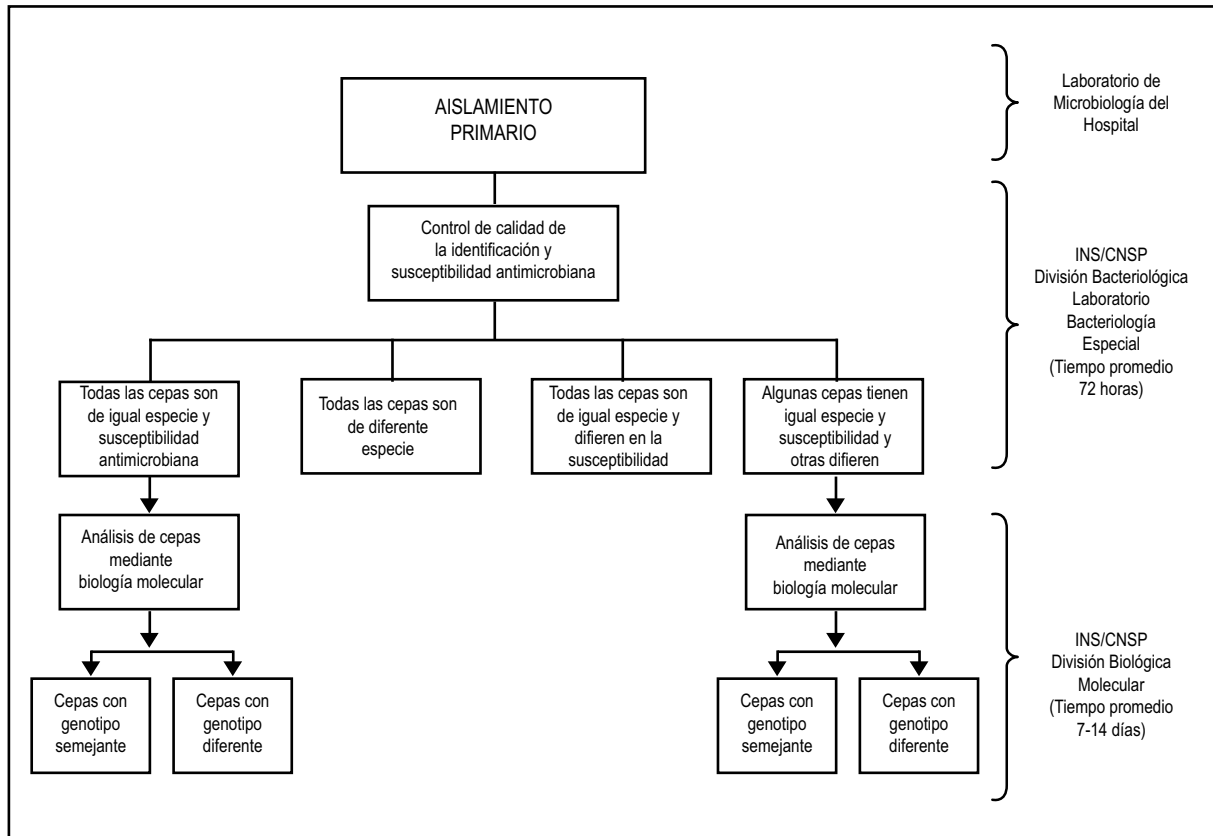
ANEXO A

FLUJOGRAMA DE INVESTIGACIÓN DE BROTES DE IIH



ANEXO B

DIAGRAMA DE TRABAJO PARA LA CONFIRMACIÓN DE BROTES DE IIH



ANEXO C

FORMULARIO PARA EL ENVÍO DE CEPAS PARA LA CONFIRMACIÓN DE
BROTOS IIH POR BIOLOGÍA MOLECULAR

Hospital:		Servicio:			
Nombre*:		Apellido Paterno		Apellido Materno	
Sexo:		Edad:		Fecha Ingreso:	
Procedimientos Hospitalarios:					
Dx IIH:				Fecha Dx:	
Dx Laborat Microb:					
RESULTADO MICROBIOLÓGICO:				Código INS:	
Microorganismo:			Tipo Muestra:		
ANTIBIOGRAMA (método):					
Antimicrobiano	(mm)	Interpretación	Antimicrobiano	(mm)	Interpretación
Fenotipo principal:					
RESULTADO MOLECULAR:					
Análisis plasmídico:					
Diversidad cepas (Método)					

Nota: En el acápite «procedimientos hospitalarios» detallar aquellas intervenciones asistenciales (médicas, de enfermería, etc.) que se hayan realizado al paciente. Ejemplo: instalación o retiro de catéter, colocación de sondas o drenes, limpieza de heridas, intervenciones quirúrgicas, intubaciones, ventilación mecánica, procedimientos diagnósticos invasivos y otros.

* En caso de cepas procedentes de soluciones, superficies u otros objetos directamente relacionadas a una puerta de entrada del paciente, colocar la procedencia de la cepa.

ANEXO D

RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL BROTE DE IIH

TIPO DE IIH :

FECHA DE INICIO :

SERVICIO(S) AFECTADOS :

MICROORGANISMO :

NÚMERO DE CASOS :

NÚMERO DE FALLECIDOS :

FACTOR DE RIESGO :

HIPÓTESIS DE CAUSA PROBABLE :

GRÁFICA DE CASOS: (lineal)

Fecha: _____

RESPONSABLE DEL INFORME

ARTES Y DISEÑOS LASER S.R.Ltda.

Teodoro Cárdenas 124 - B
Santa Beatriz
Lima 01 - Perú
Telf.: 470-6172 Telefax: 472-4525

Setiembre 2002
Tiraje: 3,000 ejemplares