

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO Y ESTANDARIZACION DE UN  
METODO PARA DETECCION Y  
CUANTIFICACION DE LAS BACTERIAS  
MAS FRECUENTES CAUSANTES DE  
NEUMONIA ASOCIADA A VENTILADOR**

**POR**

**QCB MERAB MAGALY RIOS LICEA**

**COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

**AGOSTO DE 2006**

TM

RC771

.R56

2006

c.1



1080146382

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO Y ESTANDARIZACION DE UN  
METODO PARA DETECCION Y  
CUANTIFICACION DE LAS BACTERIAS  
MAS FRECUENTES CAUSANTES DE  
NEUMONIA ASOCIADA A VENTILADOR

POR

QCB MERAB MAGALY RIOS LICEA

COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA MEDICA

AGOSTO DE 2006



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETECCIÓN  
Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS MÁS FRECUENTES CAUSANTES  
DE NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILADOR

Por  
QCB MERAB MAGALY RIOS LICEA

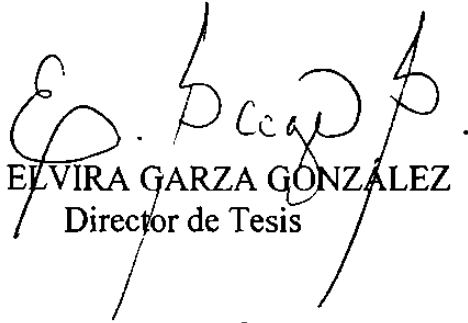
Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Agosto 2006

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILADOR

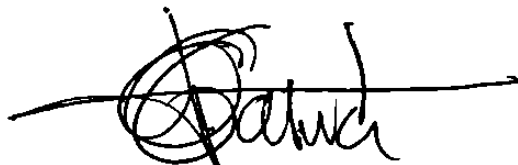
Aprobación de Tesis:



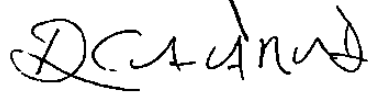
DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ  
Director de Tesis



DR. FRANCISCO JAVIER BOSQUES PADILLA  
Comisión de Tesis



DR. JUAN O GALINDO GALINDO  
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

Jesús dijo: "...el que permanece en mí, y yo en él, éste lleva mucho fruto, porque separados de mí nada podéis hacer". Juan 15:5 y 7

A Dios, porque separada de ti nunca hubiera logrado esto, ni hubiera llegado a ningún lado...nunca hubiera avanzado...gracias por abrir camino delante de mí, por guiar mis pasos, por enseñarme a esperar, por estar conmigo, por ser fiel a tus promesas, por tu cuidado, te amo Señor.

A mi familia, por apoyarme en todo tiempo, por permitirme vivir esta experiencia, especialmente a mis padres, por su amor y comprensión, por llevarme y traerme, por animarme a todas horas...por creer en mí.

A la Doctora Elvira Garza, por su asesoría, ayuda, por sus consejos, por sus palabras fuertes, por enseñarme el valor de las palabras "paciencia y perseverancia"...por darle dirección a este proyecto que está de lujo...gracias por todo...por ser un ejemplo para mí, es la mejor asesora que alguien puede tener.

Al Doctor Francisco Bosques y al Doctor Juan Galindo por su valiosa asesoría en este proyecto.

A la QCB Marcela Mas y a la TLC Ivón Samaniego por recordarme todo lo que un día aprendí en el laboratorio de Bacteriología, gracias por su tiempo y dedicación a mí, por su paciencia y entera disposición sin recibir nada a cambio.

Al Doctor Virgilio, por sus consejos y su ayuda en el final de este proyecto...oro molido...mil gracias.

A la TLC Lucy Acevedo y a la QFB Sandra Mendoza por su amistad y apoyo en el laboratorio de HP, las quiero!!!



A Hazael Jiménez y a Adrián Rentería por su amistad y valiosa aportación en los experimentos de este proyecto, gracias por todo...son los mejores compañeros que pude tener, los de HP son un verdadero equipo de trabajo...

A todo el personal del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por las palabras de ánimo que nunca faltaron y por su apoyo...especialmente a la Dra. Gloria González, a la QCB Alma Hernández, a la QCB Lydia Oviedo y a mis compañeros HP tesistas: Hazael, Adrián, Maria Luisa, Gloria, Omar, Emmanuel, Sandra...mil gracias a todos.

A mis mejores amigas, Olivia y Kiki, no se qué hubiera hecho sin ustedes, fueron un apoyo en todo tiempo...las quiero mucho...

A las doctoras Eva Palacios y Magda Adame por su amistad...las mañanas sin ustedes serían demasiado simples...gracias por todo...las quiero...

A Jim, por haber llegado a mi vida cuando creí que estaba estancada en muchos aspectos, gracias por tu amor, apoyo, comprensión, ayuda, por levantarme cuando me sentía en el suelo, por hacer brillar mis ojos otra vez y por tus palabras que me impulsan a seguir adelante hasta llegar al final de todo...gracias por estar conmigo...no olvido el "ven, te necesito para que le des sentido a este corazón que no encuentra reposo si no es contigo"...te amo...

## **SITIO DE ESTUDIO**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Servicio de Neumología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León.

Director de tesis: Dra. Elvira Garza González

Co-director de tesis: Dr. Francisco Javier Bosques Padilla

Co-director de tesis: Dr. Juan Galindo Galindo

## TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Generalidades de la neumonía	1
1.2. Clasificación de la neumonía	1
1.3. Antecedentes de la neumonía asociada a ventilador	2
1.3.1. Clasificación de la NAV	2
1.4. Incidencia de NAV	3
1.4.1. NAV y Síndrome de distrés respiratorio agudo	4
1.5. Mortalidad asociada a NAV	5
1.6. Factores de riesgo asociados a NAV	5
1.6.1. Enfermedades predisponentes y NAV	5
1.6.2. Procedimientos invasivos y NAV	6
1.6.3. Agentes biológicos y NAV	6
1.6.4. Antibiótico terapia y NAV	6
1.6.5. Tubo gastrointestinal y NAV	7
1.7. Patogenia de la NAV	7
1.8. Agentes causales de NAV	8
1.8.1. Ventilación mecánica y NAV	9
1.8.2. Patógenos multidrogoresistentes y NAV	10
1.9. Características de patógenos frecuentes causantes de NAV	10
1.9.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.9.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.9.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>	12
1.9.4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12
1.10. Métodos de diagnóstico de NAV	13
1.10.1. Criterios clínicos y radiológicos	14
1.10.2. Terapia empírica y NAV	14
1.10.3. Diagnóstico microbiológico	15
1.11. Cultivo cuantitativo	16

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1.11.1. Muestras para cultivo cuantitativo	16
1.11.2. Valor de la cuantificación	17
1.11.3. Limitaciones del cultivo cuantitativo	18
1.12. PCR en tiempo real	18
1.12.1. Ventajas de la PCR en tiempo real	20
<b>2. OBJETIVO</b>	
2.1. Objetivo general	21
2.2. Objetivos específicos	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	22
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1. Estrategia general	23
4.2. Población en estudio	25
4.3. Selección de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV	25
4.3.1. Cultivo cualitativo	25
4.3.2. Cultivo cuantitativo	26
4.3.3. Tinción de Gram	26
4.4. Diseño de una PCR en tiempo real para detección y cuantificación de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV	27
4.4.1. Diseño teórico de la PCR	27
4.4.2. Extracción de DNA de cepas	28
4.4.3. Diseño experimental de la PCR	28
4.5. Elaboración de curvas de calibración	28
4.6. Análisis estadístico	29
4.7. Aplicación del método desarrollado	31
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1. Características demográficas de la población de estudio	32
5.2. Aislamientos de la población de estudio	32
5.3. Cultivos	34
5.4. Diseño teórico de la PCR	35

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
5.5. Diseño experimental de la PCR	36
5.5.1. Condiciones de la PCR	39
5.5.2. Curvas de calibración	40
5.6. Análisis estadístico	41
5.7. Comparación de resultados del cultivo y de PCR en tiempo real	46
<b>6. DISCUSIÓN</b>	51
<b>7. CONCLUSIONES</b>	55
<b>8. REFERENCIAS</b>	56
<b>9. APÉNDICES</b>	69
A Pruebas bioquímicas y sistemas de identificación	69
B Tinciones	71
C Preparación de reactivos y soluciones	72

## LISTA DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
Tabla 1. Incidencia y mortalidad atribuible a NAV en pacientes de UCI y pacientes con SDRA.	4
Tabla 2. Valores de sensibilidad y especificidad del cultivo cuantitativo para diagnóstico de NAV empleando muestras de vías respiratorias inferiores.	17
Tabla 3. Características de la población estudiada.	32
Tabla 4. Resultado de los cultivos cuantitativos.	34
Tabla 5. Cultivos positivos para cada una de las bacterias.	34
Tabla 6. Porcentaje de las muestras con al menos 1, 2 o 3 de las bacterias seleccionadas.	35
Tabla 7. Iniciadores y sondas específicos para cada bacteria.	36
Tabla 8. Concentraciones óptimas de los componentes de reacción para el ensayo de PCR en tiempo real múltiple para la detección simultánea de las 4 bacterias.	38
Tabla 9. Condiciones de amplificación.	39
Tabla 10. Ensayo de reproducibilidad.	44
Tabla 11. Media, desviación estándar y coeficiente de variación de los resultados obtenidos por los 2 operadores.	45
Tabla 12. Organismos utilizados para el ensayo de especificidad de la PCR en tiempo real múltiple.	45
Tabla 13. Características de la población estudiada.	48
Tabla 14. Comparación de resultados del cultivo y de PCR en tiempo real.	49
Tabla 15. Comparación de los hallazgos significativos con cultivo y PCR en tiempo real.	50

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
Figura 1. Agentes causales de NAV.	9
Figura 2. Estrategia general seguida para desarrollar y estandarizar un método para detección y cuantificación de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV por una metodología molecular	24
Figura 3. Aislamientos de la población estudiada	33
Figura 4. Ensayo en tiempo real	40
Figura 5. Curva de calibración para <i>P. aeruginosa</i>	42
Figura 6. Curva de calibración para <i>S. maltophilia</i>	42
Figura 7. Curva de calibración para <i>A. baumannii</i>	43
Figura 8. Curva de calibración para <i>S. aureus</i>	43

## NOMENCLATURA

A	Absorbancia
BHQ	Black hole quencher
CRCEI	Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas
Ct	Ciclo umbral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
F-	Iniciador derecho
g	gramos
HCl	ácido clorhídrico
IC	Intervalo de confianza
l	litro
LBA	Lavado broncoalveolar
LD	Límite de detección
LPMN	leucocitos polimorfonucleares
MDR	multidrogorresistentes
mg	miligramos
min	minuto
ml	mililitros
mM	milimoles
n	número
NAC	neumonía adquirida en la comunidad
NAV	neumonía asociada a ventilador
NC	No cuantificable
NIH	neumonía intrahospitalaria
nm	nanómetros
nM	nanomoles
pb	Pares de bases



## NOMENCLATURA

(continuación)

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Qx	Quemadura
R-	Iniciador reverso
R2	Coefficiente de correlación
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RX	Radiografía
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
s	segundo
SubU	Subunidad
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidad
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonia
μL	microlitros

# RESUMEN

QCB Merab Magaly Rios Licea

Fecha de graduación: Agosto, 2006

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

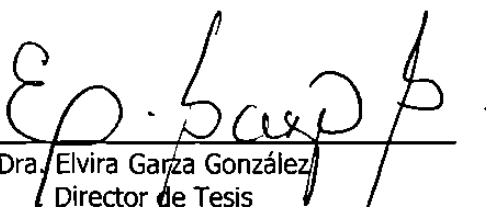
**Título del Estudio:** Desarrollo y estandarización de un método para la detección y cuantificación de las bacterias más frecuentes causantes de neumonía asociada a ventilador.

**Número de páginas:** Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología Médica

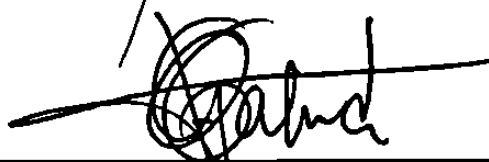
**Área de Estudio:** Microbiología Médica

**Propósito y Método del Estudio:** En este estudio, se diseñó una prueba de PCR en tiempo real para detección y cuantificación de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV. Se estudiaron 23 pacientes de UCI con sospecha clínica de NAV. Se obtuvieron lavados broncoalveolares para realizar el cultivo cuantitativo, tinción de Gram, cultivo cualitativo para la selección de las bacterias más frecuentes y extracción de DNA a partir de las muestras para la detección y cuantificación de bacterias. Se obtuvo la prevalencia de las bacterias mediante el criterio microbiológico. Se determinaron parámetros como: Sensibilidad, límite de detección, reproducibilidad, coeficiente de variación y especificidad, para evaluar la utilidad diagnóstica de la prueba molecular desarrollada y se correlacionaron los resultados obtenidos mediante el cultivo y la PCR en tiempo real cuantitativa.

**Contribuciones y Conclusiones:** La PCR en tiempo real permite detectar y cuantificar simultáneamente a *A. baumannii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, los cuales son los agentes causales más frecuentes de NAV, si están presentes en concentraciones superiores al límite de detección. Mediante la prueba desarrollada: Se confirmó la presencia de NAV en la población estudiada, fue posible realizar la cuenta de bacterias sin el inconveniente del efecto swarming por la presencia de especies de *Proteus*, se identificó a *A. baumannii* como el principal agente causal de NAV en la población estudiada y se obtuvieron resultados en 6 horas, por lo que la detección oportuna de estas bacterias causantes de NAV facilitará la toma de medidas específicas en el control de la enfermedad.

  
Dra. Elvira Garza González  
Director de Tesis

  
Dr. Francisco Javier Bosques Padilla  
Co-director de Tesis

  
Dr. Juan Galindo Galindo  
Co-director de Tesis

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Generalidades de la neumonía**

La neumonía es un proceso inflamatorio del tejido pulmonar causado por una infección, que se caracteriza por la presencia de un infiltrado exudativo y celular en el parénquima pulmonar. Puede ser ocasionada por agentes infecciosos como bacterias, virus y hongos, cuya puerta de entrada suele ser la vía aérea. La severidad de esta condición depende del microorganismo que la ocasione, de la edad, y de la salud subyacente de la persona afectada.

La neumonía se produce por infección exógena y por activación de bacterias colonizantes, por ejemplo, de vías respiratorias superiores [1]. Se presenta en 5 a 10 casos por 1000 admisiones al hospital [2, 3].

### **1.2. Clasificación de la neumonía**

La neumonía suelen clasificarse en 2 grandes grupos: neumonía adquirida en la comunidad (o extrahospitalaria) y neumonías intrahospitalaria, que tiende a ser mucho más complicada que la extrahospitalaria, ya que los mecanismos de defensa del hospedero suelen estar afectados durante la estancia en el hospital y los microorganismos causantes de la infección suelen ser mucho más resistentes a los antimicrobianos empleados comúnmente, además de que difieren en la evolución y pronóstico de la enfermedad. Los casos de neumonía intrahospitalaria pueden presentarse de forma leve o ser potencialmente mortales [1].

La neumonía intrahospitalaria (NIH) es la neumonía que se presenta 48 horas o más después de la admisión de un paciente al hospital [4]. La NIH ocupa el segundo lugar en los Estados Unidos a nivel intrahospitalario después de las infecciones de tubo urinario, con un alto grado de mortalidad y morbilidad [5].

### **1.3. Antecedentes de la Neumonía asociada a ventilador (NAV)**

La neumonía asociada al ventilador (NAV) es la neumonía que se presenta en un paciente después de 48 horas o más de recibir ventilación mecánica a través de traqueostomía o intubación endotraqueal para soporte durante un fallo respiratorio agudo [1, 4, 25].

La NAV se distingue de la neumonía adquirida en la comunidad porque resulta de un fallo respiratorio agudo, y de la neumonía intrahospitalaria, porque la mayoría de los pacientes no reciben ventilación mecánica, además, por el rápido acceso de los microorganismos al tubo respiratorio inferior y la alta mortalidad descrita en esos pacientes [4].

#### **1.3.1. Clasificación de la NAV**

La ventilación mecánica prolongada (más de 48 horas) es el factor más importante asociado con neumonía intrahospitalaria. La NAV puede presentarse dentro de las primeras 48 horas después de la intubación endotraqueal [6].

Langer y colaboradores dividieron a la neumonía en dos grandes grupos: 1) neumonía de inicio temprano, cuando se presenta dentro de los primeros 4 días de ventilación mecánica, y 2) neumonía de inicio tardío cuando se desarrolla 5 días o más después del inicio de la ventilación mecánica [7]. No solo los patógenos causantes de neumonía según el tiempo de ventilación mecánica son diferentes, pero la enfermedad es usualmente menos severa y el pronóstico es mejor en la neumonía de inicio temprano que en la neumonía de inicio tardío [8, 9].

En un estudio de 244 pacientes médicos, quirúrgicos y traumatizados con ventilación mecánica, Prod'hom y colaboradores definieron como neumonía de inicio tardío cuando se presentaba durante los primeros 4 días de ventilación mecánica, observando que 53 (22%) de los episodios de neumonía eran de inicio temprano, representando el 45% de todos los episodios de neumonía [10]. Cook y colaboradores demostraron en un estudio de 1,014 pacientes mecánicamente

ventilados, que el riesgo para desarrollar NAV se incrementa de acuerdo al tiempo de ventilación. El riesgo diario para desarrollar NAV depende de las características de la población de estudio y de muchos otros factores, particularmente del número de pacientes en una población dada que reciben antibióticos inmediatamente después de su admisión a UCI [11], así como también de la duración de hospitalización y la ventilación mecánica previa al inicio de la neumonía, exposición previa a los antibióticos y de los métodos y criterios diagnósticos empleados para el diagnóstico [2].

#### **1.4. Incidencia de la NAV**

En la mayoría de los reportes, la frecuencia de NAV varía entre el 8 y el 28% [12, 13, 14].

El índice de neumonía es considerablemente más alto en pacientes hospitalizados en UCI comparado con aquellos en sala de hospital y el riesgo de neumonía se incrementa de 6 a 20 veces en pacientes intubados que reciben ventilación mecánica [2, 15].

La NAV se presenta de un 9% a 27% de todos los pacientes intubados [2, 16] y en pacientes de UCI cerca del 90% de los episodios de neumonía se presentan durante la ventilación mecánica [17], es por esto, que la NAV es la infección más frecuente adquirida en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) en Europa y América Latina [6], representando casi el 50% de todas las infecciones intrahospitalarias. En un estudio del EPIC (European Prevalence of Infection in the Intensive Care), la NAV fue la infección más frecuente adquirida en UCI, causante del 45% de todas las infecciones en las UCIs de Europa [5,6].

La presencia de NAV incrementa la estancia en el hospital de 7 a 9 días por paciente y se han reportado que produce costos excesivos por más de 40 000 dólares por paciente [2, 15]. En la tabla 1 se muestra la incidencia de NAV en pacientes de UCI.

<b>Autor</b>	<b>Pacientes (n)</b>	<b>Incidencia (%)</b>	<b>Mortalidad (%)</b>
<b>Pacientes en UCI</b>			
Torres (1990)	322	24	33
Kollef (1993)	277	16	37
Fagon (1996)	1118	28	53
<b>Pacientes con SDRA</b>			
Chastre (1998)	56	55	78
Meduri (1998)	94	43	52
Markowicz (2000)	134	37	57

**Tabla 1.** Incidencia y mortalidad atribuible a NAV en pacientes de UCI y pacientes con SDRA

#### **1.4.1. NAV y Síndrome de distrés respiratorio agudo**

Se considera que la NAV es una complicación común del Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA). La mayoría de los estudios clínicos han encontrado que la infección pulmonar afecta entre el 34 y más del 70% de los pacientes con SDRA, conduciendo al desarrollo de sepsis, fallo múltiple de órganos y muerte [18, 19].

La alta incidencia de NAV observada en estos pacientes es, probablemente, el resultado de que ellos necesitan mucho más tiempo la ventilación mecánica que otros pacientes, por eso el riesgo de desarrollar NAV es alto.

Cuando los pulmones de estos pacientes que murieron de SDRA son examinados histológicamente en la autopsia, la neumonía es demostrada en más del 73% de ellos [2]. En la tabla 1 se muestra la incidencia de NAV en pacientes con SDRA.

## **1.5. Mortalidad asociada a NAV**

La mortalidad en la NAV es el resultado de una interacción compleja entre las defensas del huésped, la virulencia del patógeno, y la terapia con antibióticos administrada.

Los pacientes ventilados en UCI con NAV tienen un riesgo de muerte de 2 a 10 veces mayor comparado con los pacientes hospitalizados sin neumonía. [6]

En contraste a las infecciones de mayor frecuencia y que involucran otros órganos (tubo urinario y piel), donde la mortalidad es baja, con rangos del 1 al 4%, el índice de mortalidad en pacientes con NAV varía del 33% al 71% cuando la infección pulmonar es causada por patógenos de alto riesgo [1, 20, 21].

Es clara la evidencia de que los episodios causados por patógenos de alto riesgo como *S. aureus* resistente a meticilina, *P. aeruginosa* o *A. baumannii* presentan una mortalidad excesiva comparada con las predicciones hechas sobre la severidad de la enfermedad en la admisión a UCI. [2, 22, 23].

El rango de mortalidad en pacientes a los que se les administra terapia antibiótica inapropiada es aproximadamente del 50% [24]. En la tabla 1 se muestra la mortalidad asociada a NAV en pacientes de UCI y en pacientes con SDRA.

## **1.6. Factores de riesgo asociados a NAV**

### **1.6.1. Enfermedades predisponentes y NAV**

Muchos pacientes con NAV pueden tener otras infecciones al mismo tiempo en que se presenta la neumonía y esas infecciones pueden ser sobreestimadas. Numerosos estudios han demostrado que pacientes con enfermedad base en UCI predisponen al desarrollo de neumonía, y los índices de mortalidad, son consecuentemente altos, por ejemplo, en pacientes críticos, los que son sometidos a cirugías cardíacas o torácico abdominales, presencia de lesiones pulmonares o inmunosupresión (leucemia, trasplante de pulmón o médula ósea) [2].

### **1.6.2. Procedimientos invasivos y NAV**

En pacientes en los que se les ha colocado un dispositivo invasivo (tubo endotraqueal, sonda nasogástrica) el riesgo de desarrollar NAV es hasta 20 veces mayor que en otros pacientes hospitalizados no ventilados [2, 26, 27].

### **1.6.3. Agentes biológicos y NAV**

En muchos casos, la infección es causada por microorganismos multidrogorresistentes (MDR) [28, 29]. Los factores de riesgo para esos microorganismos resistentes son: La duración de la ventilación mecánica, el tiempo de hospitalización previo al comienzo de NAV y el tratamiento previo con antibióticos, ya que el tratamiento inapropiado en pacientes con verdadera neumonía bacteriana ocasiona: la selección de microorganismos patógenos resistentes, la supresión de la flora bacteriana normal por los antibióticos, así como la emergencia de flora resistente de bacilos Gram negativos [30, 31].

### **1.6.4. Terapia inicial con antibióticos y NAV**

La duración de la antibiótico terapia para NAV nunca ha sido definida de manera clara. La mayoría de los estudios muestran una duración alrededor de 10 días, esto es influenciado por la inclusión de pacientes que muere en etapas tempranas en el curso de la neumonía, y la mayoría de los regimenes de antibióticos son planeados para 14 días. Cursos largos pueden conducir no solo a la selección de microorganismos resistentes a nivel individual, sino también a nivel hospitalario [2], así como al incremento del riesgo de efectos adversos conocidos por los medicamentos empleados y el incremento substancial de costos para la mayoría de los antibióticos empleados, principalmente para la NAV de inicio tardío [29, 30, 31].



### **1.6.5. Tubo gastrointestinal y NAV**

Se considera que el tubo gastrointestinal juega un papel importante en el desarrollo de NAV, ya que durante enfermedades críticas, el estómago es colonizado por bacterias entéricas Gram negativas, y son las mismas bacterias que frecuentemente son aisladas de muestras de vías respiratorias inferiores de pacientes con NAV. La colonización del estómago puede originarse también por una fuente exógena, como la contaminación de equipo médico o de otros pacientes colonizados con microorganismos multidrogosresistentes [32, 33].

Torres y colaboradores demostraron que el empeoramiento del fallo respiratorio agudo, la presencia de una condición base fatal, la presencia de choque, la terapia antibiótica inapropiada y el tipo de UCI son factores que afectan negativamente el pronóstico de NAV.

### **1.7. Patogenia de la NAV**

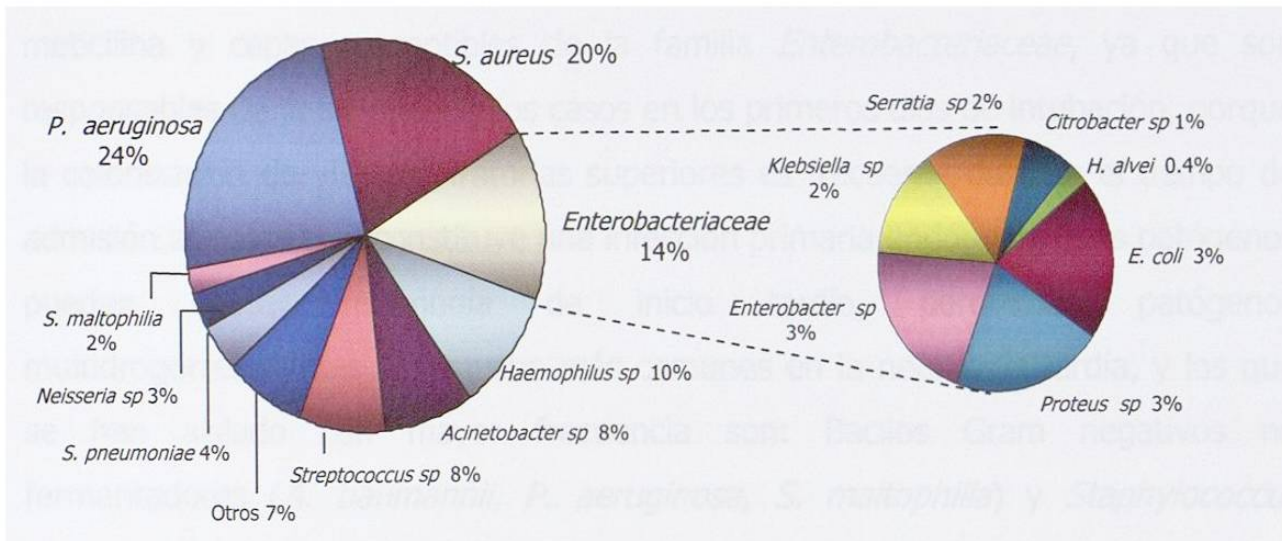
La mayoría de las neumonías intrahospitalarias se presentan por aspiración de las bacterias que colonizan la orofaringe o el tubo gastrointestinal. A causa que la intubación endotraqueal y la ventilación mecánica pasan la primera línea de defensa, esos pacientes tienen alto riesgo de desarrollar NAV. Las bacterias pueden invadir tubo respiratorio inferior por aspiración de microorganismos presentes en orofaringe, por inhalación de aerosoles que contienen bacterias, o con menor frecuencia, por diseminación hematógena [34-37]. En adición, la translocación bacteriana de tubo gastrointestinal ha sido considerada como un mecanismo de infección, ya que se postula que la translocación se presenta en pacientes inmunosuprimidos, pacientes con cáncer o pacientes quemados, aun así, los datos son insuficientes para describir este mecanismo en humanos [38, 39].

De esas vías de acceso, se considera a la aspiración como la más frecuente para el desarrollo de NAV, ya que la repetida aspiración de secreciones se considera un mecanismo patogénico ya que la orofaringe puede ser colonizada previamente con microorganismos potencialmente patógenos [40].

La colonización del tubo respiratorio de pacientes en UCI es muy compleja, corresponde a una mezcla de colonización propia del paciente y de transmisión cruzada. La probabilidad de colonización aumenta en pacientes comatosos, factores como acidosis, alcoholismo, diabetes mellitus, leucocitosis, leucopenia o enfermedad pulmonar [41].

### **1.8. Agentes causales de NAV**

La relativa prevalencia de los patógenos específicos responsables de NAV varían considerablemente, dependiendo de las características de la población de estudio, la duración de hospitalización, y la ventilación mecánica previo al inicio de neumonía, a la exposición de antibiótico terapia y los métodos y criterios usados para el diagnóstico [2]. Los microorganismos identificados por métodos broncoscópicos y microbiológicos parecen ser verdaderos patógenos causantes de NAV y no meramente colonizantes de tubo respiratorio superior. Fagon y Chastre recopilaron datos microbiológicos de 24 estudios publicados en los que se utilizaron métodos de diagnóstico con broncoscopio para confirmar episodios de NAV en los que se aislaron 2490 patógenos. Los microorganismos causantes de NAV reportados se muestran en la figura 1.



**Figura 1. Agentes causales de NAV.** La proporción relativa de los agentes causales comunes que causan NAV se obtuvieron de 1689 casos confirmados por métodos broncoscópicos, que involucraron 2490 aislamientos, en datos reportados en 24 estudios publicados.

Otra característica importante de la microbiología de NAV, reportada por Coombes en el 2002, es que del 38 al 48% de los casos presentados son polimicrobianos [42].

### 1.8.1. Ventilación mecánica y NAV

El determinante más importante en la etiología de NAV y la probabilidad de que se presenten patógenos multidrogorresistentes, es la duración de la ventilación mecánica previo al comienzo de la neumonía. La neumonía es de inicio temprano si se presenta dentro de los 4 a 7 días después de la intubación endotraqueal, o es de inicio tardío si se presenta después de que el paciente es ventilado por más de 7 días [28].

La neumonía de inicio temprano es típicamente causada por: especies de *Haemophilus*, estreptococos; incluyendo *S. pneumoniae*, *S. aureus* sensible a meticilina y cepas susceptibles de la familia *Enterobacteriaceae*, ya que son responsables de la mayoría de los casos en los primeros días de intubación, porque la colonización de vías respiratorias superiores es frecuente durante el tiempo de admisión al hospital, y constituye una infección primaria endógena. Esos patógenos pueden causar neumonía de inicio tardío, pero los patógenos multidrogosresistentes son mucho más comunes en la neumonía tardía, y los que se han aislado con mayor frecuencia son: Bacilos Gram negativos no fermentadores (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina [28].

### **1.8.2. Patógenos multidrogosresistentes y NAV**

La hospitalización prolongada previa al inicio de la ventilación mecánica es probablemente un factor de riesgo subestimado para infecciones por patógenos multidrogosresistentes en pacientes con período temprano de NAV, en término a los días de ventilación mecánica [28, 43, 44]. Una enfermedad preexistente, incluyendo la infección causada por virus de inmunodeficiencia humana, cáncer, EPOC y la intubación endotraqueal predisponen a la infección con patógenos multidrogosresistentes en una serie de pacientes traumáticos [31].

La terapia antibiótica para problemas no infecciosos puede incrementar el riesgo de infección subsiguiente con organismos multidrogosresistentes.

La NAV asociada con esos microorganismos letales puede ser una importante causa de muerte.

## **1.9. Características de patógenos frecuentes causantes de NAV**

### **1.9.1. *Staphylococcus aureus***

Son cocos Gram positivos que frecuentemente coloniza nasofaringe y es uno de los

agentes causales más importantes de infección intrahospitalaria y de NAV [2, 45]. Tradicionalmente, la mayoría de las cepas han sido susceptibles a antibióticos B-lactámicos (sensibles a meticilina) y resistentes a penicilina, pero la prevalencia de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina se ha incrementado [46]. Los factores de riesgo para *S. aureus* resistentes a meticilina incluyen: EPOC, prolongada duración de la ventilación mecánica, terapia previa con antibióticos, tratamiento previo con esteroides y broncoscopia previa [47, 48]. Se asume que la broncoscopia previa es un marcador para algunas otras condiciones pulmonares o tratamiento, o mejor dicho, un indicador de contaminación cruzada entre pacientes. La probabilidad de que se presente NAV por un *S. aureus* que sea resistente a meticilina será casi seguro si el paciente ha recibido tratamiento con antibióticos y si el inicio de NAV es tardío en su curso hospitalario [48]. Muchos casos de neumonía han sido adquiridos en la comunidad [49, 50] pero el potencial de diseminación en las unidades hospitalarias y de los brotes letales intrahospitalarios es sobreestimado.

### **1.9.2. *Pseudomonas aeruginosa***

Es un bacilo Gram negativo, no fermentador, aerobio, y es intrínsecamente resistente a muchas clases de antibióticos. Es el patógeno resistente a antibióticos más frecuente que causa NAV [2], y el agente causal más común de episodios fatales de NAV [50]. Se le atribuye ser causante de mortalidad elevada. La NAV causada por *P. aeruginosa* es inusualmente temprana en el curso hospitalario en personas previamente sanas. Típicamente se presenta solo si los factores de riesgo están presentes, incluyendo: EPOC, duración prolongada de la ventilación mecánica y terapia previa con antibióticos [50, 51]. Es difícil erradicar *Pseudomonas* de las vías respiratorias [52]. Se presentan con frecuencia episodios persistentes o recurrentes de neumonía [53, 54] especialmente en pacientes con Síndrome de distrés respiratorio agudo [54].

### **1.9.3. *Acinetobacter baumannii***

Es un bacilo Gram negativo no fermentador, aerobio, se distribuye ampliamente en fuentes como tierra y agua. Tradicionalmente ha sido asociada a baja virulencia, y se ha considerado que los aislamientos clínicos representan colonización en lugar de infección [55]. Recientemente se ha incrementado el reconocimiento de las especies de *Acinetobacter* como agentes causales de infección intrahospitalaria importantes, particularmente en pacientes críticos de UCI [55, 56, 57]. *Acinetobacter* es un importante agente causal de brotes intrahospitalarios y es diseminado con facilidad de un paciente a otro. Esto parece ser la causa de su habilidad para sobrevivir, por ejemplo, en las manos de los trabajadores del hospital y en las superficies inanimadas del ambiente [58] y la resistencia intrínseca a muchos antibióticos comunes [59], sin que haya un factor de virulencia importante. Los factores de riesgo para NAV causada por *Acinetobacter* incluye: Neurocirugías, SDRA, trauma craneoencefálico, terapia previa con ceftazidime y aseo inadecuado de manos [60].

### **1.9.4. *Stenotrophomonas maltophilia***

Son bacilos Gram negativos, no fermentadores, aerobios, cuyo hábitat principal es el agua, también se encuentran en el suelo, en plantas y animales. En la actualidad se considera como un patógeno intrahospitalario emergente. Se ha aislado de una gran variedad de superficies y objetos hospitalarios, como monitores de presión, máquinas de diálisis, soluciones desinfectantes, tubos para recolección de muestras de sangre, piscinas de hidroterapia, máquinas de hielo, equipos de terapia para inhalación, nebulizadores, humidificadores, circuitos de aparatos de ventilación mecánica, así como de las manos del personal sanitario. Aunque es un microorganismo con limitada virulencia, presenta resistencia intrínseca a múltiples agentes antimicrobianos y puede producir un amplio espectro clínico de infecciones, principalmente en pacientes inmunocomprometidos.

Puede estar implicado en numerosos procesos infecciosos, siendo los más frecuentes los de vías respiratorias. Las infecciones por *S. maltophilia* se describen principalmente en pacientes con fibrosis quística, en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, en unidades neonatales y en pacientes con neoplasias.

Se han descrito como potenciales factores predisponentes para la adquisición de *S. maltophilia* la utilización previa de agentes antimicrobianos, como carbapenemas, fluoroquinolonas o ceftazidima, presencia de catéteres venosos centrales, neutropenia, quimioterapia, corticosteroides, hospitalización prolongada, estancia prolongada en unidades de cuidados intensivos o de neonatología, ventilación mecánica, traqueostomía, neoplasias y enfermedades respiratorias. Se considera que la hospitalización prolongada y la antibioterapia de amplio espectro podrían seleccionar este microorganismo en las vías respiratorias [25].

#### **1.10. Métodos de diagnóstico de NAV**

El diagnóstico de neumonía se hace en base a los criterios clínicos y radiológicos. La confirmación microbiológica es útil, pero aproximadamente en el 50% de las neumonías nunca se identifica el agente causal [61, 62].

El diagnóstico de neumonía fue establecido según los criterios de la American Thoracic Society (ATS) [28] que se exponen a continuación: Criterios diagnósticos de neumonía intrahospitalaria según la declaración del consenso de la ATS:

1. Aparición de nuevos infiltrados en el RX de tórax que no se modifican con terapia percusiva.
2. Secreciones traqueobronquiales purulentas.
3. Fiebre >38°C.
4. Leucocitosis.
5. Aspirado traqueal con más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales por campo.

### **1.10.1. Diagnóstico Clínico-Radiológico**

El diagnóstico de neumonía bacteriana en pacientes mecánicamente ventilados es un reto para el clínico, ya que la presentación de la enfermedad es variable. La sospecha clínica de neumonía es el primer paso en cualquier evaluación de pacientes con posible NAV. Sin embargo, no existe un criterio clínico que sea específico para el diagnóstico de NAV [24]. La presencia de infiltrados pulmonares nuevos o persistentes en la radiografía de tórax y la presencia de 2 de estos 3 hallazgos clínicos: hipertermia ( $>38.2^{\circ}\text{C}$ ), secreciones purulentas, leucocitosis ( $>15000\text{ cel/cm}^3$ ) o leucopenia ( $<4000\text{ cel/cm}^3$ ), son los criterios que se utilizan para iniciar la terapia antibiótica empírica.

Estudios indican que los criterios de diagnóstico de los infiltrados radiológicos y los hallazgos clínicos tienen buena sensibilidad, pero baja especificidad, principalmente para NAV [63]. Es por esto, que la confirmación de la presencia de neumonía es mucho más difícil y los parámetros clínicos no pueden ser empleados para definir la etiología de la neumonía [64, 65].

### **1.10.2. Terapia empírica y NAV**

Para el tratamiento empírico, una de las opciones es tratar cada paciente en el que hay sospecha clínica de infección pulmonar con nuevos antibióticos, siempre y cuando la probabilidad de infección sea baja. Los resultados de muchos estudios han demostrado que el inicio inmediato de terapia con antibióticos apropiados se asocia con una mortalidad reducida [65, 66, 67], sin embargo, este enfoque clínico guía a una sobreestimación de la incidencia de NAV por la colonización traqueo bronquial y los procesos no infecciosos que son clínicamente similares.

La mayoría de los antibióticos que se administran en las UCI en pacientes con sospecha clínica, en los que no se comprueba la presencia de una infección de tubo respiratorio, exponen a muchos pacientes a toxicidad innecesaria, incrementando los costos hospitalarios y favoreciendo la emergencia de microorganismos



resistentes a los antibióticos [68]. En adición, el sobre uso de antibióticos en esos pacientes puede retrasar el diagnóstico de una verdadera causa de fiebre e infiltrados pulmonares [69], y el uso concomitante de ellos reduce la sensibilidad del cultivo, y pueden presentarse resultados falsos negativos.

### **1.10.3. Diagnóstico microbiológico**

El diagnóstico microbiológico ha sido utilizado para aislar patógenos relacionados a NAV, y los hallazgos microbiológicos cuantitativos le permiten al médico ajustar el espectro de antibióticos según las pruebas de resistencia antimicrobiana realizadas en el laboratorio.

El tubo respiratorio inferior es uniformemente colonizado unas pocas horas después de la intubación [70, 71]; por lo tanto, mediante el cultivo, la recuperación de patógenos no es suficiente para el diagnóstico de infección [72, 73].

El diagnóstico etiológico generalmente requiere un cultivo de muestras de tubo respiratorio inferior, raramente se puede hacer de hemocultivo o fluido pleural.

La sensibilidad de los cultivos de sangre es menor que el 25% y cuando es positivo los microorganismos pueden originarse de una fuente extrapulmonar en un amplio porcentaje, siempre y cuando NAV está presente [74].

Los cultivos de tubo respiratorio incluyen: Aspirado endotraqueal, lavado broncoalveolar o especímenes obtenidos con cepillo protegido. Los cultivos pueden ser cualitativos o cuantitativos. Tradicionalmente, la muestra se reporta cualitativamente. Una de las desventajas es que el crecimiento bacteriano puede ser afectado por el tamaño del inóculo de la bacteria; además, algunas bacterias crecen más rápidamente que otras [74].

El agente causal de neumonía se define por el empleo de cultivo cuantitativos de muestras de vías respiratorias inferiores con examinación inicial al microscopio.

## **1.11. Cultivo cuantitativo**

El cultivo cuantitativo ha sido empleado como el estándar de oro para la confirmación de la presencia de NAV.

Consiste en obtener la cuenta total de bacterias en una muestra de vías respiratorias inferiores mediante el método de dilución seriada. Los resultados deben ser reportados como UFC/mL para cada morfotipo [75, 76].

Los avances en este método incluyen la habilidad de escoger la dilución estadísticamente más apropiada para la cuenta y la capacidad de contar exactamente todas las bacterias presentes en la placa.

### **1.11.1. Muestras para el cultivo cuantitativo**

Con intento de mejorar la exactitud en el diagnóstico, varias estrategias invasivas han sido propuestas, como el LBA por broncoscopia, broncoscopia con cepillo protegido, aspiración pulmonar percutánea, aspiración endotraqueal y biopsia pulmonar abierta. Han sido considerables los esfuerzos para mejorar la probabilidad de llegar al diagnóstico microbiológico alcanzando mejores resultados clínicos (por ejemplo, sobrevida, reducción en el costo de antibióticos y en la estancia intrahospitalaria).

Las muestras broncoscópicas obtenidas mediante cepillo protegido, los LBAs y los aspirados endotraqueales para la visualización del árbol bronquial son útiles para el diagnóstico de neumonía [77]. En la tabla 2 se muestran los valores de sensibilidad y especificidad del cultivo cuantitativo para el diagnóstico de NAV empleando muestras de vías respiratorias inferiores.

En estudios recientes, el LBA por broncoscopio se asocia a una menor mortalidad a corto plazo y a una terapia antimicrobiana más apropiada.

El LBA ha sido utilizado satisfactoriamente para el diagnóstico de neumonía en pacientes ventilados [2] con una sensibilidad del  $73 \pm 18\%$  y una especificidad del  $82 \pm 19\%$  [78].

<b>Muestra</b>	<b>Cultivo cuantitativo</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>
Especimen obtenido con cepillo protegido	$\geq 10^3$ UFC/ml	33-100%	50-100%
Lavado broncoalveolar	$\geq 10^4$ UFC/ml	42-93%	45-100%
Aspirado traqueal	$\geq 10^5$ UFC/ml	38-82%	72-85%

**Tabla 2.** Valores de sensibilidad y especificidad del cultivo cuantitativo para diagnóstico de NAV empleando muestras de vías respiratorias inferiores

### **1.11.2. Valor de la cuantificación**

Los lavados broncoalveolares y las muestras obtenidas con cepillo protegido pueden ser fácilmente cuantificados [79, 80].

La flora colonizante de vías respiratorias superiores está presente, generalmente, en bajas concentraciones en especímenes de buena calidad. La cuantificación es útil para discriminar infección de microorganismos colonizantes.

Se estima que el lavado broncoalveolar representa aproximadamente 1 millón de alvéolos (cerca de 1% del pulmón). Una cuenta de  $10^4$  UFC/mL representa  $10^6$  UFC/mL de un fluido no diluido. En efecto, estudios en pacientes sin ventilación mecánica han demostrado que un valor de  $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL es apropiado para diferenciar contaminación de infección [80, 81, 82]; sin embargo, en pacientes mecánicamente ventilados hay mayor variabilidad en las cuentas [83, 84]. Los resultados del cultivo de un LBA se obtienen en un período de 2 a 4 días, y un resultado de  $1 \times 10^4$  UFC/mL es indicativo de infección [80, 81, 82].

### **1.11.3. Limitaciones del cultivo cuantitativo**

Algunas limitaciones del cultivo cuantitativo son: 1) algunos pacientes pueden tener resultados falsos positivos, a consecuencia de ventilación mecánica prolongada y subsiguiente colonización de vías respiratorias, 2) algunos pacientes pueden tener resultados falsos negativos, y esto depende de la estrategia de abordaje, esto puede resultar en el retraso en la iniciación de la terapia, 3) la sensibilidad del cultivo cuantitativo es influenciado por la terapia antibiótica y muchos pacientes con sospecha de NAV están en terapia activa con antibióticos; por lo tanto, un resultado negativo del cultivo no descarta la NAV, y 4) el tiempo prolongado de obtención de resultados, de 2 a 4 días [85, 86].

Si el diagnóstico clínico es usado para decidir cuándo debe empezarse la terapia, y los datos microbiológicos de las muestras son usados para definir la presencia o ausencia de neumonía por los microorganismos presentes en pulmones y la susceptibilidad a los antibióticos, es posible tratar la neumonía en etapas tempranas en el curso de la enfermedad e iniciar la terapia dirigida contra el patógeno que está presente. Sin embargo, la limitante principal del cultivo cuantitativo es que no todos los microorganismos presentes en los cultivos son necesariamente patógenos, ya que muchos de ellos son microorganismos colonizantes de vías respiratorias superiores, y la colonización precede al desarrollo de neumonía en la mayoría de los casos de NAV.

### **1.12. PCR en tiempo real**

En la última década se han desarrollado innumerables aplicaciones de la PCR de la microbiología clínica. La introducción de la PCR en la rutina asistencial en otros campos de la microbiología clínica ha sido muy limitada y su aplicación se ha restringido a aquellos microorganismos que no crecen en medios de cultivo convencionales y aún en ese grupo, la implementación real de esta metodología ha sido muy escasa.

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto formado [87]. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real son sondas de hibridación específica, marcadas con dos tipos de fluorocromos, un reportero y un apagador. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas sondas Taqman.

Las sondas Taqman son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo reportero en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y con un fluorocromo apagador en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el reportero. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el apagador. Sin embargo, durante la amplificación del DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la DNA polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo reportero [88]. Como el reportero y el apagador están espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el reportero es captada por el lector. La sensibilidad de la amplificación por la PCR depende de la especificidad de los iniciadores. Si los iniciadores no son específicos, pueden unirse a otra secuencia de DNA dentro de la mezcla de reacción y se pueden presentar amplificaciones no específicas.

### **1.12.1. Ventajas de la PCR en tiempo real**

La primera gran ventaja de la PCR en tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Al utilizar los sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de manera muy importante. Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera más sencilla, más precisa y en un rango mayor que en los procedimientos convencionales. El equipo tiene una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se puede llevar a cabo ensayos cuantitativos y detecciones múltiples; además, no requiere que las bacterias estén vivas para su detección y cuantificación, pero se tiene que seguir un estricto protocolo para evitar la contaminación del DNA lo que podría ocasionar resultados falsos-positivos.

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1. Objetivo general**

Desarrollar y estandarizar un método para detectar y cuantificar simultáneamente las 4 bacterias más frecuentemente asociadas al desarrollo de neumonía asociada a ventilador.

#### **2.2. Objetivos específicos**

1. Seleccionar las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV.
2. Diseñar una PCR en tiempo real, para la detección y cuantificación de las bacterias seleccionadas en un mismo ensayo.
3. Comparar el cultivo cuantitativo con la prueba diseñada de PCR en tiempo real.

## **CAPÍTULO 3**

### **JUSTIFICACIÓN**

La neumonía representa un problema de salud a nivel intrahospitalario y presenta una mortalidad elevada. El diagnóstico de NAV se basa principalmente en hallazgos clínico-radiológicos los cuales son inespecíficos. Las técnicas para el diagnóstico de NAV son relativamente lentas y tienen sensibilidad y especificidad que requieren ser mejoradas. El diagnóstico final depende del cultivo.

Aunque el cultivo cuantitativo es un método de referencia para la confirmación diagnóstica, se requieren, al menos, 4 días para obtener resultados y confirmar el diagnóstico.

El uso de una herramienta de diagnóstico molecular-microbiológica, como la PCR en tiempo real, podría ser una nueva opción para detección rápida y oportuna de patógenos, principalmente en pacientes que estén en tratamiento con antibióticos, ya que ofrece ventajas importantes con respecto a otras técnicas, tales como una mayor rapidez y alta sensibilidad de detección.



## **CAPÍTULO 4**

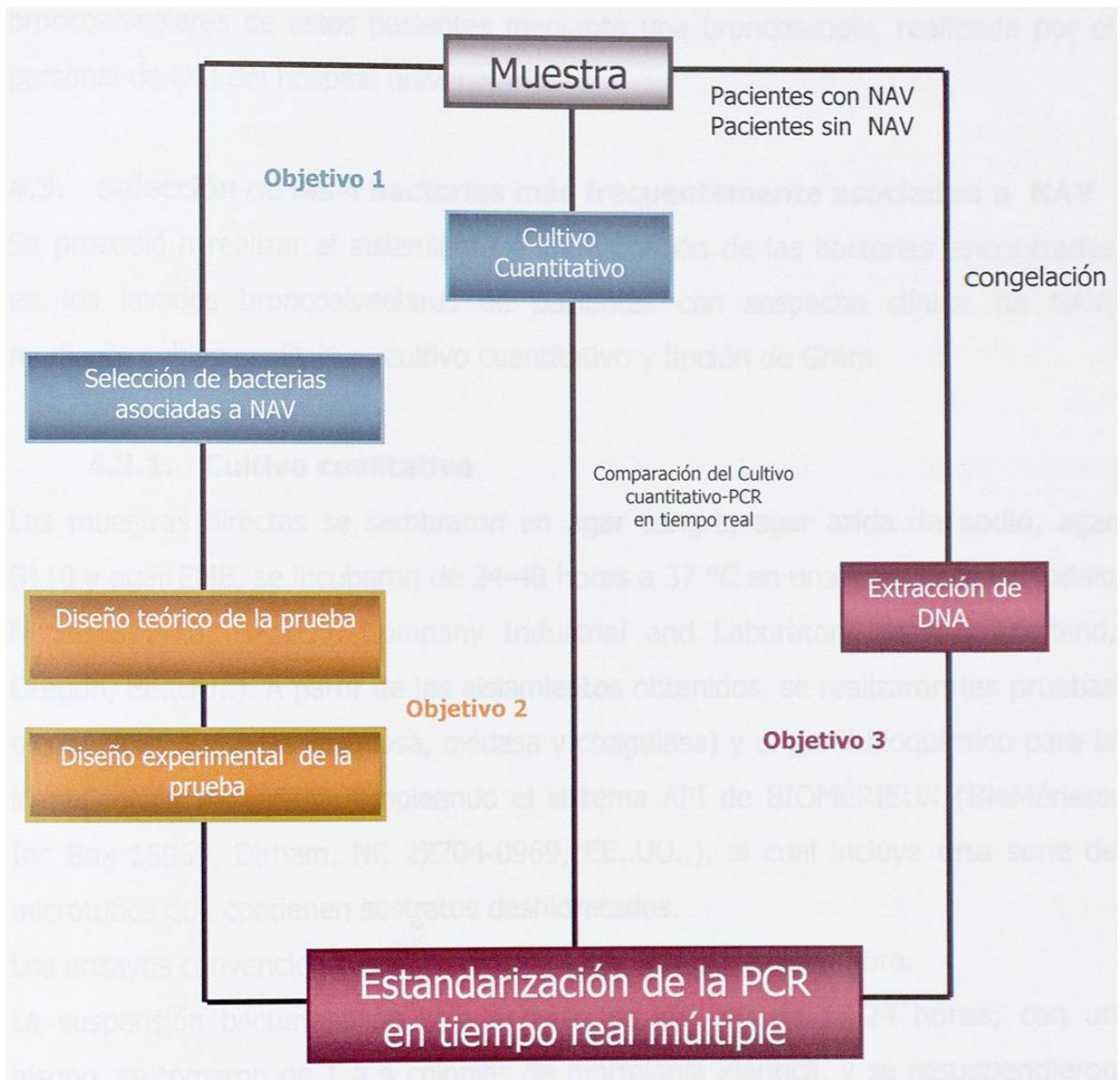
### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. Estrategia general**

Para desarrollar y estandarizar un método para detectar y cuantificar simultáneamente las 4 bacterias más frecuentemente asociadas al desarrollo de neumonía asociada a ventilador, se siguió la estrategia general que se muestra en la figura 2.

Se identificó la población de estudio teniendo en cuenta los criterios de inclusión, se solicitó consentimiento informado a los familiares y se llevó a cabo la obtención del LBA por broncoscopia. Esto se realizó en colaboración con el personal del Servicio de Neumología y la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".

Estas muestras fueron procesadas en el laboratorio para realizar una tinción de Gram, cultivo cualitativo y cuantitativo, para identificación bacteriana y selección de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV, así como para la obtención de la cuenta de bacterias. Ya seleccionadas las bacterias más frecuentes, se realizó el diseño teórico-experimental de la PCR a tiempo real para detección y cuantificación simultánea de las bacterias en un mismo ensayo, extracción de DNA de las muestras y elaboración de curvas de calibración para estandarización del método. Con los resultados del cultivo cuantitativo, cultivo y PCR a tiempo real, se obtuvo el status de infección de cada paciente y a partir de estos resultados se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, límite de detección, reproducibilidad, coeficiente de variación y especificidad para determinar la utilidad diagnóstica de la misma.



**Figura 2.** Estrategia general seguida para desarrollar y estandarizar un método para detección y cuantificación de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV por una metodología molecular.

## **4.2. Población de estudio**

Se incluyeron 23 pacientes de UCI, con sospecha clínica y radiológica de NAV.

Se solicitó consentimiento informado a los familiares y se obtuvieron lavados broncoalveolares de estos pacientes mediante una broncoscopia, realizada por el personal de UCI del hospital universitario.

## **4.3. Selección de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV**

Se procedió a realizar el aislamiento e identificación de las bacterias encontradas en los lavados broncoalveolares de pacientes con sospecha clínica de NAV, mediante cultivo cualitativo, cultivo cuantitativo y tinción de Gram.

### **4.3.1. Cultivo cualitativo**

Las muestras directas se sembraron en agar sangre, agar azida de sodio, agar S110 y agar EMB, se incubaron de 24-48 horas a 37 °C en una incubadora (Modelo Napco 322-10, Heinicke Company Industrial and Laboratory Heater, Portland, Oregon, EE.UU.). A partir de los aislamientos obtenidos, se realizaron las pruebas bioquímicas primarias (catalasa, oxidasa y coagulasa) y el perfil bioquímico para la identificación bacteriana, empleando el sistema API de BIOMÉRIEUX (BioMérieux Inc Box 15969, Durham, NC 27704-0969, EE.UU.), el cual incluye una serie de microtubos que contienen sustratos deshidratados.

Los ensayos convencionales se realizaron a partir de un cultivo puro.

La suspensión bacteriana se hizo a partir de cultivos de 18-24 horas; con un hisopo, se tomaron de 1 a 4 colonias de morfología idéntica, y se resuspendieron en un tubo con solución salina, ajustando la turbidez al 0.5 de McFarland. A partir de la suspensión bacteriana se reconstituyeron los medios de la galería API, se utilizaron de inmediato después de prepararse y se incubó de 24-48 horas a 37 °C. Las reacciones producidas durante la incubación se tradujeron en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos.

Los ensayos de asimilación de azúcares se inocularon con un medio mínimo y las bacterias crecieron solamente si eran capaces de utilizar el correspondiente sustrato. La lectura de las reacciones se hizo con la ayuda de tablas de identificación, y el reconocimiento se realizó mediante catálogos analíticos o con ayuda de un software de identificación (API Lab Plus, BioMérieux, 1990).

#### **4.3.2. Cultivo cuantitativo**

Para obtener el cultivo cuantitativo, se realizó el método de dilución seriada a partir de la muestra. Cada LBA se pasó a un tubo cónico, y se agitó en vortex por 30-60 segundos. A partir de la muestra directa se sembraron 0.1, 0.01 y 0.001 mL en agar chocolate, que corresponden a las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  respectivamente. Para obtener la dilución  $10^{-4}$ , se tomó 0.1 mL de la muestra directa y se resuspendió en 0.9 mL de solución salina, se agitó en vortex por 30-60 segundos. A partir de esta solución se tomó 1  $\mu$ L y sembró en agar chocolate en las condiciones ya mencionadas.

Las placas se incubaron de 24-48 horas a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> en una incubadora (Water Jacketed Incubator CI-46, Model 3546 S/N, American Scientific Products, EE.UU.) para obtener la cuenta total de bacterias (UFC/mL).

Las placas se revisaron a las 24 horas para observar el crecimiento bacteriano. Se escogió la dilución estadísticamente más apropiada para la cuenta de bacterias y se reportó en UFC/mL.

#### **4.3.3. Tinción de Gram**

Los LBAs fueron recibidos en el CRCEI y se procesaron en un tiempo menor a 2 horas. Las muestras se colocaron en tubos cónicos de 50 mL para realizar el cultivo cuantitativo, cultivo cualitativo y tinción de Gram.

Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 14000 rpm, se separó el sobrenadante con cuidado para obtener el sedimento y a partir de él se realizó la tinción de Gram. Se hicieron extensiones en portaobjeto y se examinaron al microscopio de luz con objetivo 100X.

La evaluación microscópica, con frecuencia, es no concluyente para la mayoría de los pacientes con sospecha clínica de NAV en la UCI, por la colonización de vías respiratorias superiores con bacterias potencialmente patógenas, cuando la infección está o no presente, por lo que se buscaron ciertos factores indicativos de infección, como la presencia de bacterias intracelulares y extracelulares, células inflamatorias como: granulocitos y leucocitos polimorfonucleares; así como la observación de más de 10 neutrófilos por campo, los cuales indican alta calidad de la muestra e inflamación y la presencia de células epiteliales escamosas de orofaringe que indican contaminación de la muestra.

#### **4.4. Diseño de una PCR en tiempo real para detección y cuantificación de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV**

##### **4.4.1. Diseño teórico de la PCR**

Ya seleccionadas las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV, se realizó el diseño teórico de la metodología a estandarizar. Para la selección de las secuencias blanco, se diseñaron iniciadores y sondas específicas para amplificar regiones conservadas de cada una de las bacterias, esto se llevó a cabo mediante el uso del software Beacon designer 4.0. El software utiliza algoritmos para el diseño de diferentes pares iniciador-sonda para un ensayo múltiple en un solo tubo de reacción.

El diseño teórico fue un ensayo múltiple para detección simultánea de las 4 bacterias empleando el software Beacon designer 4.0 (PREMIER Biosoft Internacional, 3786 Corina Way, Palo Alto, CA 94303-4504) y el sistema Taqman para el diseño de las sondas.

La secuencia del amplicón se eligió entre 100 y 150 pares de bases para mantener la especificidad de alto grado de la amplificación en los ensayos de PCR cuantitativa. El contenido de guanina y citosina de la secuencia blanco varió del 40 al 55% evitando secuencias palindrómicas o homopolímeros en la secuencia del amplicon. Los iniciadores se eligieron con una secuencia única dentro del templado

de DNA que iba a ser amplificado, de 18 a 25 nucleótidos de largo. Las regiones de amplificación tuvieron condiciones muy similares, con una variación de menos de un grado en el punto de fusión de los iniciadores para la obtención de una buena eficiencia en la PCR múltiple.

#### **4.4.2. Extracción de DNA de las cepas**

Ya obtenidas las cepas, se realizó la extracción de DNA, para lo cual se resuspendió la muestra en un mL de Tris-EDTA, pH 8 con 10 mg de lisozima/mL. Las muestras se incubaron a 37 °C por 30 minutos; y se añadieron 6 µL de proteinasa K (20 mg/mL), seguida de incubación por 30 minutos a 55 °C y el DNA se extrajo por el método que emplea fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El DNA se extrajo con 250 µL de fenol saturado y con 250 µL de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (SEVAG) (1:24), se precipitó con 2.33 volúmenes de etanol absoluto, y se dejó secar. El sedimento seco se disolvió en 25 µL de amortiguador TE 1X y el DNA se cuantificó por emisión fluorescente y por espectrofotometría.

#### **4.4.3. Diseño experimental de la PCR**

Una vez diseñados los iniciadores y las sondas específicas para amplificación de regiones conservadas de cada bacteria, se buscaron las concentraciones óptimas de amortiguador, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, iniciadores, sondas y unidades de Taq DNA polimerasa para obtener la máxima eficiencia de la PCR múltiple.

Las sondas marcadas con fluorocromos fueron purificadas después de su síntesis para minimizar las señales de fondo y asegurar que los resultados que se obtuvieran fueran óptimos.

#### **4.5. Elaboración de curvas de calibración**

Después de determinar las concentraciones óptimas de iniciadores y sondas para el ensayo, se realizaron ensayos para determinar la eficiencia de la PCR cuantitativa, sensibilidad y reproducibilidad mediante la elaboración de curvas de

calibración para cada una de las bacterias, así como la determinación de la especificidad de la prueba.

A partir de cultivos puros de las bacterias, se hicieron suspensiones bacterianas ajustando al 0.5 del nefelómetro de McFarland, a  $\lambda = 625 \text{ nm}$ , con una lectura de absorbancia de 0.082-0.1. A partir de estas suspensiones se hicieron diluciones seriadas, con las cuales se contaminaron muestras de pacientes sin sospecha clínica de NAV, se realizó la técnica de extracción de DNA y la PCR en tiempo real. La curva de calibración de los valores de Ct fue automáticamente construída por el instrumento para cada reacción del respectivo estándar. Los valores de Ct de las muestras se interpolaron en la respectiva curva estándar. La cantidad de bacteria presente en un DNA extraído, usado como templado en una reacción de PCR para cada muestra clínica fue calculado por el software del termociclador SmartCycler II (Cepheid, California, EE.UU.).

#### **4.6. Análisis estadístico**

Eficiencia de la reacción de PCR: Para determinar la eficiencia de la reacción se utilizó la pendiente de la curva estándar. Si la eficiencia de la amplificación de la PCR es del 100%, la cantidad del templado de DNA será del doble con cada ciclo de amplificación, y el trazo de la curva estándar del logaritmo de la concentración inicial del templado contra los ciclos de PCR que genera una forma lineal con una pendiente aproximada de -3.1 y -3.6 son típicamente aceptados para la mayoría de las aplicaciones que requieren cuantificación precisa.

La curva estándar se corrió por triplicado, así que fue posible determinar la precisión del pipeteo, la reproducibilidad y sensibilidad del ensayo; además, se determinaron el límite de detección y la especificidad.

Precisión: Es el grado de proximidad entre resultados que se efectúan repetitivamente y en forma independiente y la precisión está relacionada con el coeficiente de variación.

Reproducibilidad: Una vez establecido el método de ensayo, se hicieron réplicas de la técnica de extracción y PCR en tiempo real de muestras sin sospecha clínica de NAV contaminadas con concentraciones conocidas de cada una de las bacterias, esto fue realizado por dos operadores para comparar las variabilidades entre la técnica de extracción y la PCR en tiempo real, calculando la media y la desviación estándar se determinó el coeficiente de variación de los resultados.

Sensibilidad: Corresponde a la mínima cantidad de bacteria que puede producir un resultado significativo. Para comparar la relativa sensibilidad del par de iniciadores en el ensayo de PCR múltiple, se hicieron diluciones seriadas de muestras de DNA (controles positivos) de *A. baumannii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* de concentraciones iniciales conocidas. La pendiente de la curva estándar ayudó a determinar el límite de detección del ensayo dado.

Límite de detección (LD): Es la mínima concentración detectable de bacteria que no puede cuantificarse. La determinación del LD se efectuó comparando las señales obtenidas a partir de muestras sin sospecha clínica de NAV contaminadas con diluciones seriadas de bacterias de concentración conocida, estableciendo así la concentración mínima a la cual la bacteria podía detectarse.

Especificidad: Se refiere a la capacidad de la prueba para discriminar otras bacterias de las del estudio de interés. La especificidad de los ensayos de PCR en tiempo real fueron realizados con diferentes especies bacterianas que habían sido previamente descritas en muestras respiratorias. A causa que la especificidad de la PCR depende de la temperatura, la temperatura de alineación se optimizó para los microorganismos respectivos.

Se hizo la extracción de DNA de los organismos utilizados para el ensayo de especificidad por el método fenol-SEVAG. Se hizo un ensayo de PCR múltiple para



cada bacteria de interés, utilizando 10 ng de DNA extraído de cada bacteria de la tabla 12 y la cuantificación se hizo por espectrofotometría. Se utilizó un control negativo sin DNA templado para cada bacteria de interés.

#### **4.7. Aplicación del método desarrollado**

A los lavados broncoalveolares que se mantuvieron en congelación a -20 °C se les realizó la extracción de DNA y se aplicó la PCR en tiempo real múltiple para detectar y cuantificar las bacterias de interés en la muestra original. Con los resultados obtenidos de la PCR en tiempo real múltiple desarrollada se hizo un análisis comparativo con los resultados obtenidos del cultivo cuantitativo.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1. Características demográficas de la población de estudio

Se incluyeron 23 pacientes de los que se obtuvieron lavados broncoalveolares.

Dentro de la población estudiada, el género masculino tuvo predominio en una relación 5:1, representando el 85% de la población; además, el 83% de los pacientes ya habían recibido antibióticos antes de la toma de muestra y el 17% de ellos ingresaron al hospital con infección previa al inicio de la neumonía.

Las características de la población de estudio se muestran en la tabla 3.

Pacientes (n)	23
Masculino: Femenino	5:1
Masculino (%)	83
Media de edad (IC 95%)	46.5 (38.85-54.11)
Mediana de edad (años)	44
Rango de edad (años)	17-82
Antibiótico terapia previa (%)	83
Infección previa (%)	17

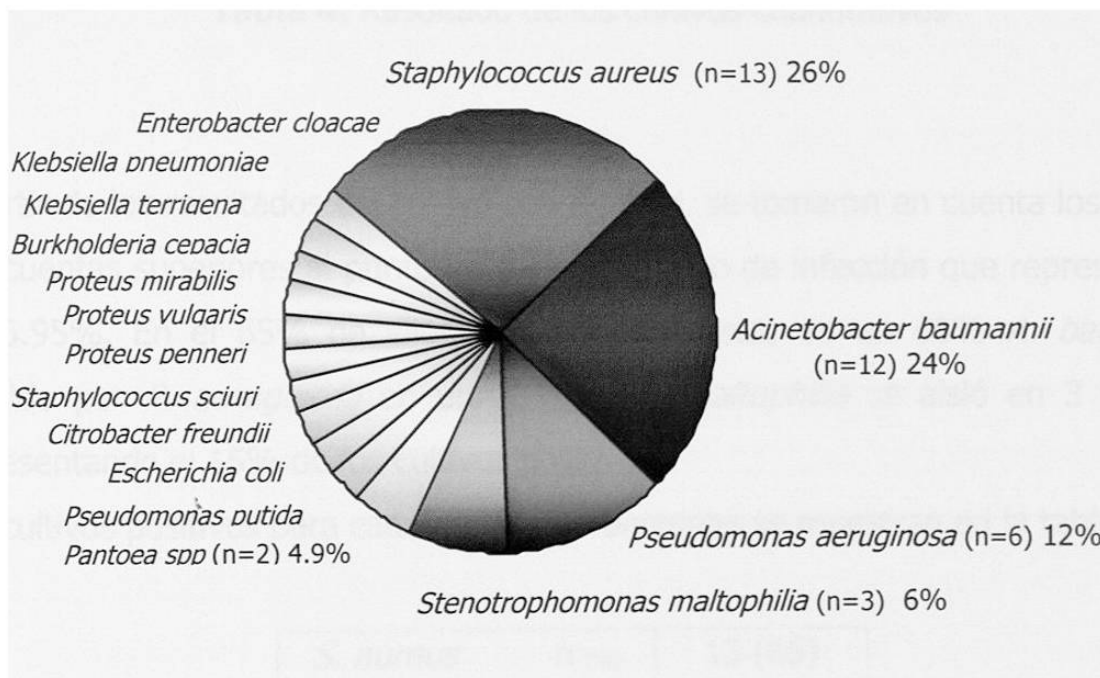
**Tabla 3.** Características de la población estudiada (n=23)

#### 5.2. Aislamientos de la población de estudio

El servicio de Neumología y la UCI del Hospital Universitario proporcionaron 23 lavados broncoalveolares, para la selección de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV mediante el cultivo cualitativo. De los 23 LBAs procesados se

aislaron 16 bacterias diferentes, 50 cepas en total. Las bacterias que se aislaron con mayor frecuencia son: *S. aureus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, representando el 68% de los aislamientos. *S. aureus* se aisló en un 26%, y fue la bacteria más frecuentemente aislada, *A. baumannii* se aisló en un 24% de las muestras, *P. aeruginosa* se aisló en un 12% y *S. maltophilia* en un 6%. Las bacterias que se aislaron con menor frecuencia se observan en la figura 3. *P. putida* y *Pantoea spp* se aislaron en un 4.9% y otras bacterias como: *E. coli*, *C. freundii*, *S. sciuri*, especies de *Proteus* y *Klebsiella*, *B. cepacia* y *E. cloacae*, que representaron el 2.4% de los aislamientos.

Los resultados obtenidos del cultivo cualitativo para seleccionar las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV se muestran en la figura 3.



**Figura 3.** Aislamientos de la población estudiada.

### 5.3. Resultados de los cultivos

Se realizó un cultivo cuantitativo para cada uno de los LBA, de los cuales, el 86.95% fueron positivos; es decir, la cuenta bacteriana fue  $\geq 10^4$  UFC/mL, indicativo de infección. Sólo el 2% de los cultivos tuvieron cuentas menores al punto de corte y en un cultivo no fue posible realizar la cuenta debido a la presencia de especies de *Proteus*, debido al efecto swarming que se observa en la placa de cultivo, por lo que se consideró como indeterminado.

Los resultados obtenidos de los cultivos cuantitativos se muestran en la tabla 4.

Cultivos positivos (cuenta $\geq 10^4$ ) n (%)	20 (86.95)
Cultivos negativos (cuenta $< 10^4$ ) n (%)	2 (8.7)
Cultivo indeterminado n (%)	1 (4.35)

**Tabla 4.** Resultado de los cultivos cuantitativos

A partir de los resultados del cultivo cuantitativo, se tomaron en cuenta los cultivos con cuentas superiores al punto de corte indicativo de infección que representaron el 86.95%. En el 65% de ellos se aisló *S. aureus*, en un 60% *A. baumannii*, seguido por *P. aeruginosa* en un 30%, y *S. maltophilia* se aisló en 3 cultivos, representando el 15% de los cultivos positivos.

Los cultivos positivos para cada una de las bacterias se muestran en la tabla 5.

<i>S. aureus</i> n (%)	13 (65)
<i>A. baumannii</i> n (%)	12 (60)
<i>P. aeruginosa</i> n (%)	6 (30)
<i>S. maltophilia</i> n (%)	3 (15)

**Tabla 5.** Cultivos positivos para cada una de las bacterias

A partir de los resultados del cultivo cualitativo de los 23 LBAs se observó que en el 95% de ellos se aisló por lo menos una de las bacterias seleccionadas, que en el 60% se aislaron por lo menos 2, y en el 15% de las muestras se aislaron 3 de las bacterias seleccionadas para el diseño de este proyecto.

Los porcentajes de las muestras con al menos 1, 2 o 3 de las bacterias seleccionadas se muestran en la tabla 6.

Muestras con al menos 1 de las bacterias seleccionadas	n (%)	19 (95)
Muestras con al menos 2 de las bacterias seleccionadas	n (%)	12 (60)
Muestras con al menos 3 de las bacterias seleccionadas	n (%)	3 (15)

**Tabla 6.** Muestras con al menos 1, 2 o 3 de las bacterias seleccionadas

#### 5.4. Diseño teórico de la PCR

Para el diseño teórico, se seleccionaron secuencias específicas de iniciadores y sondas Taqman para los ensayos de PCR en tiempo real seleccionadas de genes específicos: una secuencia del gen *oprL* que codifica para una lipoproteína de membrana externa (*P. aeruginosa*), el gen que codifica para una enzima lipolítica (fosfolipasa para *S. aureus*), la subunidad 16S ribosomal para *A. baumannii* y *S. maltophilia*, ya que es una secuencia parcial del gen 16S rRNA que es altamente conservada y se utiliza para comparar bacterias. Por amplificación selectiva de esta secuencia a partir del DNA genómico y comparando los resultados de bases de datos, los microorganismos pueden ser caracterizados como filotipos.

Con estas secuencias se hizo el diseño teórico empleando el programa fware Beacon designer 4.0 para los iniciadores y el Sistema Taqman para las sondas. Cabe mencionar que se hicieron diseños y síntesis previos que fueron evaluados pero los resultados no fueron satisfactorios.

En la tabla 7 se muestran los iniciadores y sondas específicos diseñados para cada bacteria.

<p style="text-align: center;"><i>Staphylococcus aureus</i> Gen fosfolipasa</p> <p>Primer F- AGTGTTAGCGGCTACAATGTTTG Primer R- CCTGACTGCATTTGATGTGACG</p> <p>TxR-TCGCGTTCCCTTGTTCTCCCGGTT-BHQ-2</p>	<p style="text-align: center;"><i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gen <i>oprL</i></p> <p>Primer F- AGCAGCCACTCCAAAGAAACC Primer R- CGGTCTGCTGAGCTTTCTGAG</p> <p>Cy5-CGCCCAGAGCTTCGTCAGCCTTGC-BHQ-3</p>
<p style="text-align: center;"><i>Acinetobacter baumannii</i> SubU 16s RNA</p> <p>Primer F- TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC Primer R- GGTCGTAAGGGCCATGATGAC</p> <p>FAM-CGTCGTCCCCGCCTTCTCCAGT-BHQ-1</p>	<p style="text-align: center;"><i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SubU 16s RNA</p> <p>Primer F- GATCCTGGCTCAGAGTGAACG Primer R- CCCACGACAGAGTAGATTCCG</p> <p>TET-CACCCGTCCGCCACTCGCCAC-BHQ-1</p>

**Tabla 7.** Iniciadores y sondas específicos para cada bacteria

### 5.5. Diseño experimental de la PCR

Las concentraciones elegidas fueron aquellas con las que se obtuvo una buena señal del producto amplificado sin la presencia de señales inespecíficas. Se utilizaron volúmenes de reacción de 25 µL para cada muestra.

Los ensayos en tiempo real requieren más  $MgCl_2$  que la PCR convencional. Se recomienda un rango de variación de la concentración de 2 a 6 mM para determinar las concentraciones óptimas del  $MgCl_2$  para la aplicación.

Grandes concentraciones de  $MgCl_2$  pueden conducir a amplificaciones no específicas, esto resulta por la actividad no óptima de la polimerasa.

Se realizaron ensayos preliminares haciendo una titulación del  $MgCl_2$  en un rango de 2 mM a 6 mM para determinar la concentración óptima para esta aplicación. Cepheid recomienda una concentración tan alta como de 8 mM al emplear el SmartCycler II cuando se hacen reacciones múltiples simultáneas, como en este caso, para la detección y cuantificación de las 4 bacterias.

La concentración final de  $MgCl_2$  utilizada fue de 8 mM debido a que se obtuvo una mejor señal comparada con las señales obtenidas al emplear una concentración menor de  $MgCl_2$ , además, no se observaron señales inespecíficas. Además, se utilizaron las mínimas concentraciones de iniciadores y sondas para evitar amplificaciones inespecíficas. Las concentraciones de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción se muestran en la tabla 8.

Componentes	Concentración
MgCl <sub>2</sub>	8 mM*
dNTPs	200 mM
amortiguador	10X
Taq DNA polimerasa	2.5 U/μL
DNA genómico	100 ng
F- <i>A. baumannii</i>	0.2 nM
R- <i>A. baumannii</i>	0.2 nM
F- <i>S. aureus</i>	1.0 nM
R- <i>S. aureus</i>	0.3 nM
F- <i>P. aeruginosa</i>	1.2 nM
R- <i>P. aeruginosa</i>	0.3 nM
F- <i>S. maltophilia</i>	0.2 nM
R- <i>S. maltophilia</i>	0.2 nM
Taqman- <i>A. baumannii</i>	0.05 nM
Taqman- <i>S. aureus</i>	0.5 nM
Taqman- <i>P. aeruginosa</i>	1.0 nM
Taqman- <i>S. maltophilia</i>	0.1 nM

\* Optimizing & Analyzing Real-Time Assays on the SmartCycler II System  
F- : Iniciador 5' a 3', R- : Iniciador 3' a 5', Taqman: Sonda de hidrólisis

**Tablas 8.** Concentraciones óptimas de los componentes de reacción para el ensayo de PCR en tiempo real múltiple para la detección simultánea de las 4 bacterias.



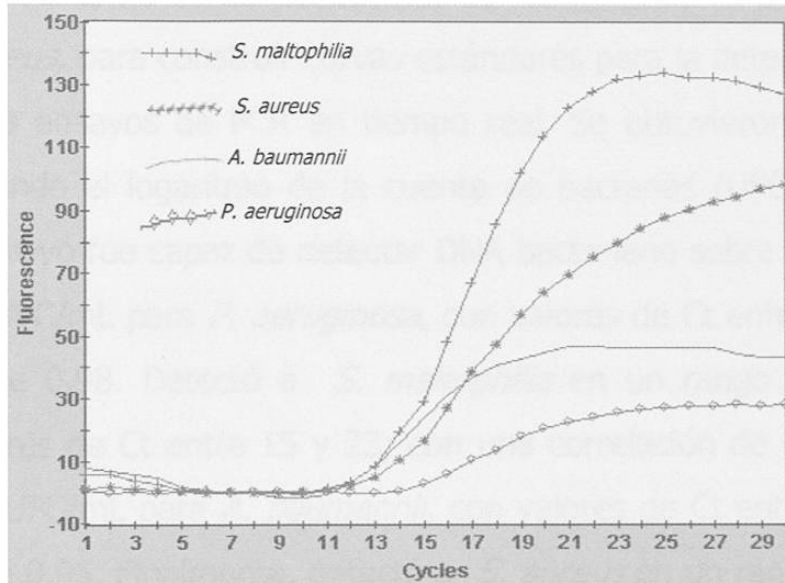
### 5.5. Condiciones de la PCR

Se realizaron experimentos preliminares para definir un protocolo con condiciones y ciclos de amplificación para detección y cuantificación de las 4 bacterias en una sola reacción de PCR. Finalmente, las condiciones fueron escogidas como sigue: Después de 2 minutos a 94 °C para una desnaturalización inicial, las muestras se sometieron a 30 ciclos, esto consistió en un paso a 94 °C por 15 segundos, seguido por un paso combinado de alineamiento-extensión a 62 °C por 30 segundos. La tabla 9 muestra las condiciones elegidas para la detección de las 4 bacterias.

<b>Etapa</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94 °C 2 min	1
Desnaturalización	94 °C 15 s	30
Alineamiento	62 °C 30 s	

**Tabla 9.** Condiciones de amplificación

Las concentraciones óptimas de los componentes de la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación fueron probadas utilizando controles positivos con los que se cuenta en nuestro laboratorio, realizando así una sola reacción de PCR en tiempo real. Como cada sonda es específica para cada una de las bacterias debido a que están marcadas con fluorocromos para diferenciarlas, fue posible observar de manera simultánea la señal para cada bacteria, empleando los componentes de la PCR en las concentraciones descritas previamente. El resultado obtenido se muestra en la figura 4.



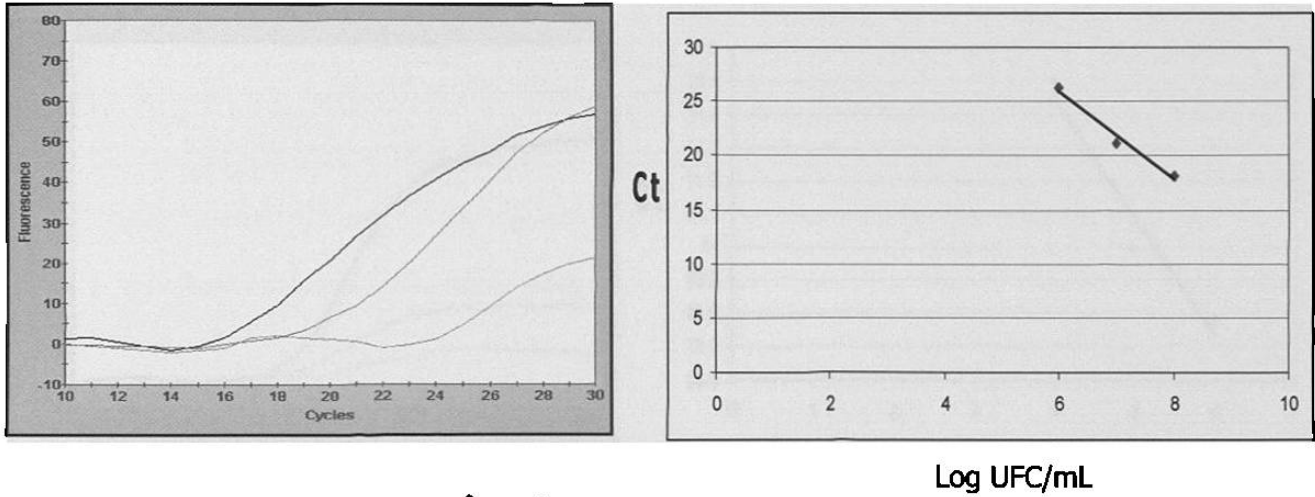
**Figura 4.** Ensayo en tiempo real

### 5.5.2. Curvas de calibración

Para cada bacteria se hizo una curva estándar de valores de Ct de diluciones seriadas de concentración conocida, con las cuales se contaminaron muestras de pacientes sin sospecha clínica de NAV. La curva de calibración de los valores de Ct fue automáticamente construida por el instrumento para cada reacción del respectivo estándar. Los valores de Ct de los LBAs positivos se interpolaron en la respectiva curva estándar. La cantidad de bacteria presente en el DNA extraído (usado como templado en una reacción de PCR) para cada muestra clínica fue calculada por el software a partir de las curvas estándares.

## 5.6. Análisis estadístico

Se emplearon diluciones seriadas a partir de una concentración de  $10^8$  UFC/mL de *P. aeruginosa*,  $10^7$  UFC/mL de *S. maltophilia*,  $10^6$  UFC/mL de *A. baumannii* y  $10^7$  UFC/mL de *S. aureus*, para construir curvas estándares para la determinación de la sensibilidad de los ensayos de PCR en tiempo real. Se obtuvieron las curvas de calibración graficando el logaritmo de la cuenta de bacterias (UFC/mL) contra el valor del Ct. El ensayo fue capaz de detectar DNA bacteriano sobre un rango lineal entre  $10^8$  y  $10^6$  UFC/mL para *P. aeruginosa*, con valores de Ct entre 18 y 26; con una correlación de 0.98. Detectó a *S. maltophilia* en un rango de  $10^7$  y  $10^5$  UFC/mL, con valores de Ct entre 15 y 23; con una correlación de 0.95. Un rango entre  $10^6$  y  $10^4$  UFC/mL para *A. baumannii*, con valores de Ct entre 13 y 14.5, y una correlación de 0.95. Finalmente, detectó a *S. aureus* en un rango entre  $10^7$  y  $10^5$  UFC/mL, con valores de Ct entre 15 y 19.5, y una correlación de 0.96. Las curvas de calibración obtenidas se muestran de las figuras 5 a la 8.

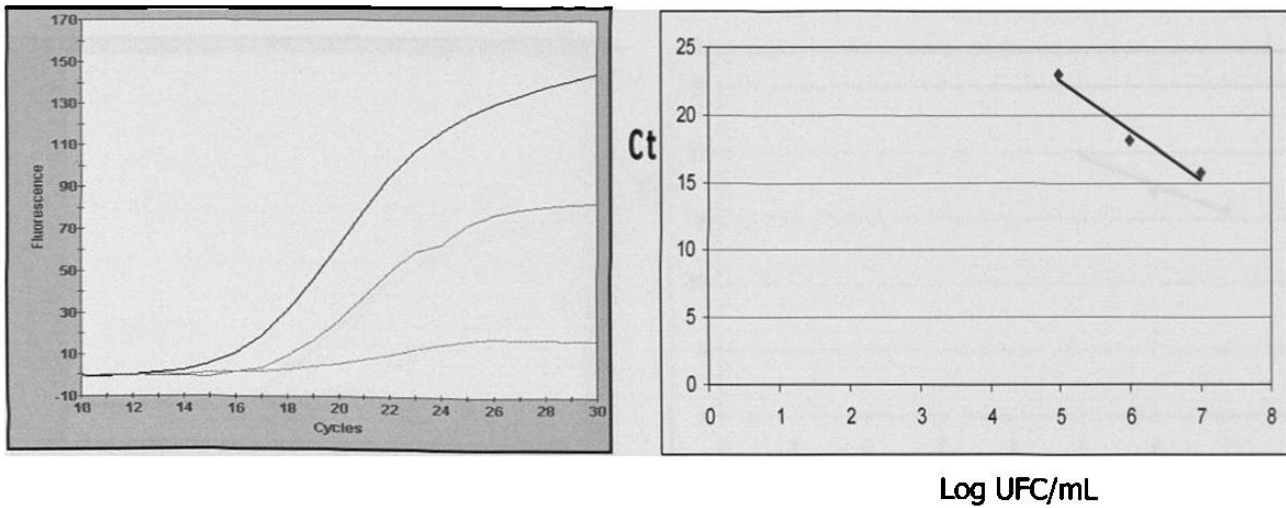


- Standard 0.5 McFarland:  $1 \times 10^8$  UFC/mL
- Dilución  $10^{-1}$ :  $1 \times 10^7$  UFC/mL
- Dilución  $10^{-2}$ :  $1 \times 10^6$  UFC/mL

$$y = -4.055x + 50.202$$

$$R^2 = 0.9818$$

**Figura 5.** Curva estándar para *Pseudomonas aeruginosa*

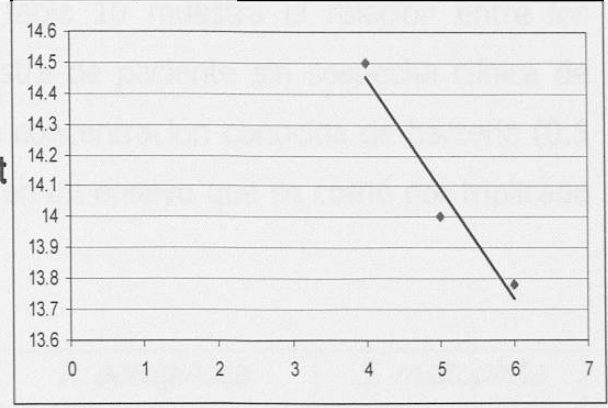
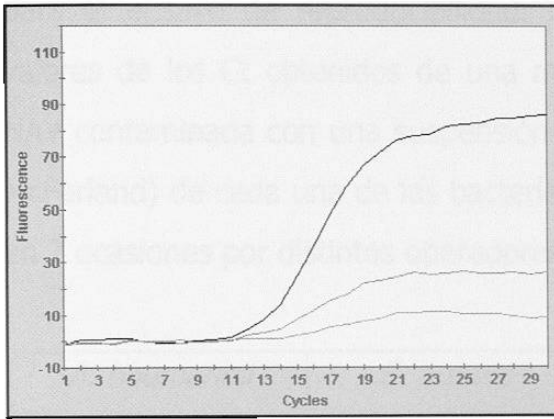


- Standard 0.5 McFarland:  $1 \times 10^7$  UFC/mL
- Dilución  $10^{-1}$ :  $1 \times 10^6$  UFC/mL
- Dilución  $10^{-2}$ :  $1 \times 10^5$  UFC/mL

$$y = -3.665x + 40.903$$

$$R^2 = 0.9583$$

**Figura 6.** Curva estándar para *Stenotrophomonas maltophilia*

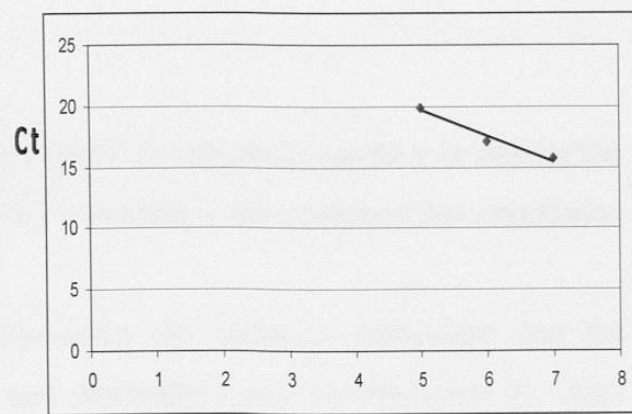
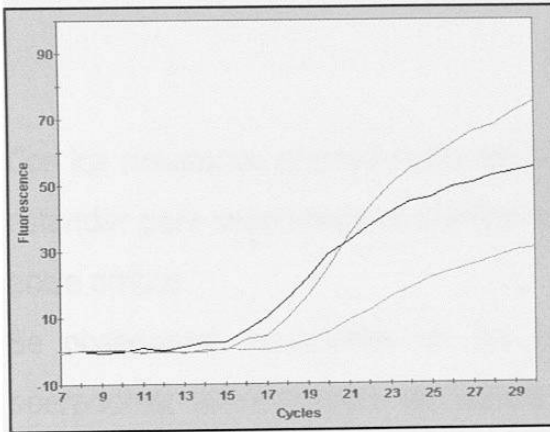


- Standard 0.5 McFarland:  $1 \times 10^6$  UFC/mL Log UFC/mL
- Dilución  $10^{-1}$ :  $1 \times 10^5$  UFC/mL
- Dilución  $10^{-2}$ :  $1 \times 10^4$  UFC/mL

$$y = -0.36x + 15.893$$

$$R^2 = 0.952$$

**Figura 7.** Curva estándar para *Acinetobacter baumannii*



Log UFC/mL

- Standard 0.5 McFarland:  $1 \times 10^7$  UFC/mL
- Dilución  $10^{-1}$ :  $1 \times 10^6$  UFC/mL
- Dilución  $10^{-2}$ :  $1 \times 10^5$  UFC/mL

$$y = -2.09x + 30.117$$

$$R^2 = 0.9609$$

**Figura 8.** Curva estándar para *Staphylococcus aureus*

Se observaron variaciones en los Ct obtenidos de los controles positivos utilizados para el ensayo de reproducibilidad. La tabla 10 muestra la relación entre los valores de los Ct obtenidos de una muestra de paciente sin sospecha clínica de NAV contaminada con una suspensión de concentración conocida de bacteria (0.5 McFarland) de cada una de las bacterias, en un ensayo que se corrió por triplicado en 2 ocasiones por distintos operadores.

<i>A. baumannii</i>			<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. maltophilia</i>			
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
0 1	15.7	13.44	13.84	18.0	17.0	15.0	16.25	17.16	16.0	17.5	16.3	15.5
0 2	16.3	17.5	15.48	15.5	18.8	18.1	19.16	19.0	19.93	18.0	19.16	19.0

\* O 1: Operador 1, O 2: Operador 2

**Tabla 10. Ensayos de reproducibilidad.** Valores de los Ct obtenidos de una muestra de paciente sin sospecha clínica de NAV contaminada con una suspensión de concentración conocida de cada una de las bacterias, en un ensayo que se corrió por triplicado en 2 ocasiones por distintos operadores.

Con los resultados obtenidos por los operadores se calculó la media y la desviación estándar para determinar el coeficiente de variación y así comparar los resultados entre ambos.

Se observaron variaciones en los coeficientes de variación obtenidos por los operadores; sin embargo, los valores son aceptables por ser menores al 15%. Estos resultados se muestran en la tabla 11.

Bacteria	Operador 1			Operador 2		
	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
<i>A. baumannii</i>	14.3	1.22	<b>8.5</b>	16.4	1.02	<b>6.2</b>
<i>S. aureus</i>	15.8	1.04	<b>6.6</b>	17.5	1.75	<b>10.0</b>
<i>P. aeruginosa</i>	16.5	0.61	<b>3.7</b>	19.4	0.5	<b>2.6</b>
<i>S. maltophilia</i>	16.4	1.01	<b>6.1</b>	18.9	0.81	<b>4.3</b>

**Tabla 11.** Media, desviación estándar y coeficiente de variación de los resultados obtenidos por los 2 operadores.

Los organismos usados para el ensayo de especificidad se enlistan en la tabla 12. No se observó amplificación de DNA de ninguno de los organismos no homólogos enlistados en la tabla 12, así como tampoco hubo amplificación con DNA genómico humano.

<i>S. chromogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. mirabilis</i>
<i>S. hominis</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>S. lungdunensis</i>	<i>C. bovis</i>	<i>S. sonneii</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>S. warneri</i>	<i>C. xerosis</i>	<i>R. equi</i>
<i>S. xylosum</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. immitis</i>
<i>S. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	DNA genómico humano

**Tabla 12.** Organismos utilizados para el ensayo de especificidad de la PCR en tiempo real múltiple.

### **5.7. Comparación de resultados del cultivo y de PCR en tiempo real**

A los LBAs que se mantuvieron en congelación se les extrajo el DNA por el método fenol-SEVAG y se corrió la PCR en tiempo real para cada uno. Se hizo un análisis comparativo entre los resultados del cultivo y los de la prueba molecular desarrollada. En los LBAs de los pacientes 2, 3, 9, 10 y 11 se confirmó la NAV, al obtenerse en el cultivo cuantitativo y en la PCR en tiempo real una cuenta bacteriana total  $\geq 10^4$  UFC/mL. En las muestras 3, 9 y 11 se aislaron de manera simultánea *A. baumannii* y *S. aureus* en el cultivo; sin embargo, se confirmó solamente la presencia de *A. baumannii* mediante la PCR en tiempo real, ya que se obtuvo la cuenta real (copias del gen/mL) de la bacteria y fue  $\geq$  al punto de corte indicativo de infección. Los resultados fueron similares en los pacientes 12, 14 y 15, al confirmarse la NAV mediante el cultivo y la PCR en tiempo real. A diferencia de las muestras anteriores, en éstas se confirmó la presencia de 2 de las bacterias seleccionadas mediante cultivo y PCR en tiempo real, con cuentas  $\geq 10^4$  UFC/mL. En el LBA del paciente 18 fue posible el aislamiento de *A. baumannii* y *S. aureus* mediante el cultivo cualitativo; sin embargo, no fue posible realizar el cultivo cuantitativo, debido a la presencia de *Proteus penneri* y el efecto swarming que produce en la placa. Mediante la PCR en tiempo real se detectó *A. baumannii* con cuenta de  $10^4$  copias del gen/mL; sin embargo, *S. aureus* no fue detectado mediante la prueba molecular. En los LBAs de los pacientes 7, 16 y 22 los resultados del cultivo cuantitativo se encontraron en un rango de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL, y se aislaron de 2 a 3 de las bacterias seleccionadas mediante el cultivo cualitativo. En las muestras 1, 5, 6 y 8 los resultados del cultivo y de la PCR en tiempo real fueron discordantes, detectándose mediante la prueba molecular otras bacterias diferentes a las aisladas mediante cultivo. En las muestras 1 y 8 se confirmó la presencia de NAV, al obtenerse mediante ambos métodos cuentas superiores al punto de corte indicativo de infección.



En la muestra 1 se aisló en cultivo *P. aeruginosa*, y se detectó mediante la prueba molecular *S. maltophilia*. El caso de la muestra 8 es similar. En las muestras 5 y 6 el cultivo cuantitativo fue negativo, ya que se obtuvieron cuentas  $<10^3$  UFC/mL. En la muestra 5 no se aisló ninguna de las bacterias seleccionadas, sin embargo se confirmó la presencia de NAV mediante la PCR en tiempo real, ya que se detectó *A. baumannii* con una cuenta  $>10^4$  copias del gen/mL. En la muestra 6 se aislaron 2 de las bacterias seleccionadas; sin embargo, se confirmó la presencia de NAV mediante la PCR en tiempo real por la detección de otra de las bacterias seleccionadas con una cuenta  $>10^4$  copias del gen/mL.

La tabla 13 muestra las características de la población estudiada y la tabla 14, los resultados obtenidos de los LBAs en los que se confirmó la presencia de una de las bacterias seleccionadas mediante la PCR en tiempo real cuantitativa, los resultados de LBAs en los que la concentración de bacteria detectada por la PCR en tiempo real estaba por debajo del límite de detección de las bacterias seleccionadas y los resultados discordantes de las muestras, comparando los resultados obtenidos por ambos métodos.

<b>Paciente</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Infección previa</b>	<b>Uso previo de antibiótico</b>	<b>Diagnóstico presuntivo</b>
2	70	H	No	si	neumonía intrahospitalaria
3	30	H	No	si	tumor de tallo cerebral
9	38	H	No	no	neumonía intrahospitalaria
10	50	H	No	si	hemorragia pulmonar
11	65	H	Si	si	choque hipovolémico
12	61	H	Si	si	choque séptico
14	40	H	No	si	neumonía intrahospitalaria
15	45	H	No	si	sepsis abdominal
18	59	H	No	si	edema pulmonar
23	53	H	No	si	hematoma subdural
7	42	H	No	si	quemadura de segundo grado, neumonía
16	25	M	No	si	politraumatismo
22	20	M	No	no	politraumatismo
21	74	H	Si	si	neumonía adquirida en la comunidad
1	37	H	No	si	neumonía intrahospitalaria
5	17	M	No	si	eclampsia
6	40	H	Si	si	pancreatitis grave
8	82	H	No	si	aneurisma abdominal

**Tabla 13.** Características de la población estudiada

Paciente	cultivo		PCR en tiempo real	
	Bacteria (s)	Cuenta (UFC/ml)	Bacteria (s)	Cuenta (copias/mL)
2	<i>A. baumannii</i>	1.6x10 <sup>3</sup>	<i>A. baumannii</i>	2.4x10 <sup>4</sup>
3	<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	1.4x10 <sup>6</sup>	<i>A. baumannii</i>	1x10 <sup>4</sup>
9	<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i>	2.52x10 <sup>5</sup>	<i>A. baumannii</i>	1x10 <sup>4</sup>
10	<i>A. baumannii</i> <i>C. freundii</i>	5.2x10 <sup>6</sup>	<i>A. baumannii</i>	>1x10 <sup>5</sup>
11	<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i>	1.2x10 <sup>5</sup>	<i>A. baumannii</i>	1x10 <sup>4</sup>
12	<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i>	1.13x10 <sup>5</sup>	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	1.1x10 <sup>3</sup> 3.7x10 <sup>3</sup>
14	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	2.3x10 <sup>5</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	3.3x10 <sup>5</sup>
15	<i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. maltophilia</i>	6.0x10 <sup>5</sup>	<i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>	2.0x10 <sup>4</sup> 7.8x10 <sup>6</sup>
18	<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> <i>Pantoea sp P. penneri</i>	NC	<i>A. baumannii</i>	2.5x10 <sup>4</sup>
23	<i>S. aureus</i>	6.5x10 <sup>4</sup>	<i>S. aureus</i>	3.7x10 <sup>3</sup>
7	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> <i>S. maltophilia</i>	8.65x10 <sup>6</sup>	< LD	< LD
16	<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> <i>S. maltophilia</i>	5.2x10 <sup>4</sup>	< LD	< LD
22	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	2.4x10 <sup>6</sup>	< LD	< LD
21	<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i>	7.8x10 <sup>3</sup>	< LD	< LD
1	<i>P. aeruginosa</i>	5x10 <sup>5</sup>	<i>S. maltophilia</i>	>1x10 <sup>7</sup>
5	<i>P. putida</i> , <i>E. cloacae</i>	4.3x10 <sup>3</sup>	<i>A. baumannii</i>	5.7x10 <sup>4</sup>
6	<i>P. putida</i> , <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> ,	6.5x10 <sup>3</sup>	<i>A. baumannii</i>	1.6x10 <sup>4</sup>
8	<i>A. baumannii</i> , <i>S. sciuri</i>	>1x10 <sup>6</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	2.5x10 <sup>7</sup>

\* NC: No cuantificable.

**Tabla 14.** Resultados obtenidos mediante cultivo y la PCR en tiempo real cuantitativa.

Se encontró número alto de patógenos en el cultivo cuantitativo comparado con la PCR en tiempo real múltiple. Los hallazgos significativos de las 4 bacterias más frecuentemente asociadas a NAV, representados por un punto de corte  $\geq 10^4$  UFC/mL, se muestran en la tabla 14.

PCR en tiempo real	Hallazgos en cultivo			
	<i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. maltophilia</i>
<i>A. baumannii</i>	8/18			
<i>S. aureus</i>		2/18		
<i>P. aeruginosa</i>			2/18	
<i>S. maltophilia</i>				1/18

**Tabla 15.** Comparación de los hallazgos significativos con cultivo ( $\geq 10^4$  UFC/mL) y con PCR en tiempo real ( $\geq 10^4$  UFC/mL)

Los patógenos fueron encontrados en el 17/18 (%) de los LBAs con cultivo y en el 14/18 (%) con la PCR en tiempo real cuantitativa.

## CAPÍTULO 6

### DISCUSIÓN

El diagnóstico de NAV representa un verdadero reto para el clínico por las limitaciones en el diagnóstico.

Para el diagnóstico de NAV, los hallazgos clínicos y radiológicos son los más ampliamente utilizados, aunque su utilidad es limitada porque existen otras condiciones infecciosas y no infecciosas que son clínicamente similares a la NAV; por lo que es necesario realizar el cultivo cuantitativo, el cual permite el aislamiento y cuantificación de los potenciales agentes causales de NAV, aunque tiene la importante limitación de que requiere de un tiempo prolongado para la obtención de resultados (4 días).

El desarrollo de nuevos métodos que permitan realizar el diagnóstico de NAV en un tiempo más corto, así como definir el agente causal potencial, será de gran utilidad en la práctica clínica.

En este trabajo se desarrolló y estandarizó un método molecular para el diagnóstico de NAV, para lo cual se recolectaron LBAs de 23 pacientes con sospecha clínica de NAV tardía; y de esos pacientes, la mayoría correspondió al género masculino, con edad promedio de 46.5 años. Esto no es de sorprender ya que se ha reportado que la NAV es más frecuente en el género masculino (72%) y la media de la edad reportada es de 52.9 años.

La mayoría de los pacientes (83%) habían recibido antibióticos antes del comienzo de la neumonía, y según datos reportados, la antibiótico terapia es un factor importante en el desarrollo de NAV, principalmente en pacientes de UCI. Esto se ha asociado a la presencia de bacterias multidrogasresistentes, tales como *A. baumannii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, las cuales fueron las bacterias más frecuentemente aisladas en esta población de estudio, representando el 68% de los aislamientos.

Estos resultados concuerdan con datos reportados por Langer y Liang en el 2002, y Bekele Afessa en el 2006.

Además, se observó que la mayoría de los cultivos (83.3%) fueron polimicrobianos, esto también fue reportado por Coombes en el 2002.

Para desarrollar la prueba molecular se tomaron en cuenta las bacterias más frecuentemente aisladas y se realizaron curvas de calibración para cada una de las bacterias. Se determinó además el límite de detección y se obtuvo un valor de  $1 \times 10^3$  UFC/ml para *A. baumannii* y *S. aureus*, y de  $1 \times 10^4$  UFC/ml para *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*. Para la elaboración de curvas de calibración, en este estudio se utilizaron muestras reales contaminadas con cantidades conocidas de bacterias, por lo que los valores presentados son un valor muy cercano al valor real, incluyendo el efecto de matriz, lo cual podría explicar los valores altos. Los límites de detección obtenidos son suficientes para el diagnóstico de NAV ya que detectan los puntos de corte propuestos para el cultivo cuantitativo.

En la correlación de los resultados de la prueba molecular desarrollada con los cultivos, se encontró que en el cultivo, el 40% de los pacientes tenían tanto *A. baumannii* como *S. aureus*; sin embargo, con la prueba molecular, *A. baumannii* se detectó en el 44.4% y *S. aureus* sólo en el 5.6%. Llama la atención que *S. aureus* se detectó en mucha menor proporción en la prueba molecular que en el cultivo. Para tratar de explicar lo anterior, debe mencionarse que el cultivo detecta y cuantifica microorganismos, pero no tiene la capacidad de determinar cuentas relativas, por lo que los resultados de la prueba molecular sugieren que *S. aureus*, aunque se encontraba en la muestra, tal como se detectó en el cultivo, se encontraba en cantidades inferiores al límite de detección de la prueba molecular.

Los resultados observados sugieren que la prueba molecular permite distinguir entre agentes causales reales y probable contaminación de vías respiratorias superiores.

En el 33.3% de los cultivos, se aisló *P. aeruginosa*; sin embargo, mediante la prueba molecular desarrollada se detectó sólo en el 11.1%. La posible explicación a esto es similar a la propuesta para las diferencias observadas para *S. aureus*.

En el 22.2% de los cultivos, se aislaron 2 o 3 de las bacterias seleccionadas de manera simultánea, con cuentas  $\geq 1 \times 10^4$  UFC/mL; sin embargo, mediante la PCR en tiempo real no se detectó ninguna de las bacterias incluidas en la prueba molecular, lo cual sugirió que ninguna de ellas se encontraba en cantidades suficientes para ser considerada como agente causal de NAV.

Estos resultados sustentan aún más la utilidad de la prueba molecular desarrollada y representan una gran aportación en el diagnóstico de NAV, ya que con la prueba desarrollada, no sólo se detecta y cuantifica a los 4 agentes causales más frecuentes de NAV tardía, sino que además se discrimina entre las bacterias que podrían encontrarse en la muestra como verdaderos agentes causales o como una contaminación de vías respiratorias superiores.

Cabe señalar además que los resultados de 4 muestras fueron discordantes ya que se aislaron o detectaron bacterias diferentes por ambos métodos. Para tratar de explicar esto, se debe mencionar que la prueba molecular desarrollada permite obtener cuentas de copias de genes que no necesariamente corresponden a bacterias vivas, aunque tampoco se puede asumir que las cuentas correspondan a la acumulación de bacterias muertas, tomando en cuenta que en un proceso infeccioso, el sistema inmune se encarga de eliminarlas. Por otro lado las cuentas del cultivo corresponden a las UFC de bacterias viables cultivables y este número puede ser muy inferior a las células vivas en un proceso infeccioso que incluye tanto a células vivas no viables, células viables cultivables y células viables no cultivables. Lo anterior es una posible explicación a las diferencias observadas.

En este trabajo no se evaluaron las características de los pacientes y no se llevó a cabo seguimiento clínico, por lo que es conveniente llevar a cabo un ensayo para evaluar la utilidad diagnóstica del método desarrollado, así como evaluar la posibilidad de aplicar éste método con muestras menos invasivas.



## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIONES

La prueba desarrollada permite detectar y cuantificar simultáneamente a *A. baumannii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, los cuales son los agentes causales más frecuentes de NAV, si están presentes en concentraciones superiores al límite de detección.

*baumannii*=  $1 \times 10^3$ , *S. aureus*=  $1 \times 10^3$ , *P. aeruginosa*=  $1 \times 10^4$ ,  
*S. maltophilia*=  $1 \times 10^4$  copias del gen/mL).

Mediante la prueba desarrollada:

- Se confirmó la presencia de NAV en esta población de estudio (70%).
- Fue posible realizar la cuenta de bacterias sin el inconveniente del efecto swarming por la presencia de especies de *Proteus*.
- Se obtuvieron las cuentas reales de cada una de las bacterias en los LBAs.
- Se identificó a *A. baumannii* como el principal agente causal de NAV en la población estudiada.
- Se obtuvieron resultados en 6 horas. La detección oportuna de NAV facilitará la toma de medidas específicas en el control de la enfermedad.

Esta prueba fue denominada prueba PASS, por su capacidad de detectar *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* y *S. aureus*.

## CAPÍTULO 8

### REFERENCIAS

1. Pennington JE. Nosocomial respiratory infection. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennet JE, editors. Principles and practice of infectious diseases. St Louis, MO: *Churchill Livingstone*; 1990:2199-2205.
2. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:867-903.
3. Torres A, Aznar R, Gatell JM, Jimenez P, Gonzalez J, Ferrer A, Celis R, Rodriguez-Roisin R. Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:523-528.
4. American Thoracic Society Documents. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:388-416.
5. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP: Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 1999;27:887-892.
6. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al: The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) study. *JAMA* 1995;274:639-644.
7. Langer M, Cigada M, Mandelli M, Mosconi P, Tognoni G. Early onset pneumonia: a multicenter study in intensive care units. *Intensive Care Med* 1987;13:342-346.

8. Strausbaugh L. Nosocomial respiratory infections. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, editors. . Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia, PA: *Churchill Livingstone*; 2000:3020-3027.
9. American Thoracic Society. Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement, American Thoracic Society, November 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1711-1725.
10. Prod´hom G, Leuenberger P, Koerfer J, Blum A, Chiolerio R, Schaller MD, Perret C, Spinnler O, Blondel J, Siegrist H, et al. Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients receiving antacid, ranitidine, or sucralfate as prophylaxis for stress ulcer. A randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 1994;120:653-662.
11. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, Griffith LE, Guyatt GH, Leasa D, Jaeschke RZ, Brun-Buisson C. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med* 1998;129:433-440.
12. Tejada Artigas A, Bello Dronca S, Chacon Valles E, Munoz Marco J, Villuendas Uson MC, Figueras P, Suarez FJ, Hernandez A. Risk factors for nosocomial pneumonia in critically ill trauma patients. *Crit Care Med* 2001;29:304-309.
13. Leal-Noval SR, Marquez-Vacaro JA, Garcia-Curiel A, Camacho-Larana P, Rincon-Ferrari MD, Ordonez-Fernandez A, Flores-Cordero JM, Loscertales-Abril J. Nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. *Crit Care Med* 2000;28:935-940.

14. Fagon JY, Chastre J, Vuagnat A, Trouillet JL, Novara A, Gilbert C. Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. *JAMA* 1996;275:866-869.
15. Eggimann P, Hugonnet S, Sax H, Touveneau S, Chevrolet JC, Pittet D. Ventilator-associated pneumonia: caveats for benchmarking. *Intensive Care Med* 2003;29:2086-2089.
16. Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Montserrat V, Bellm L, Redman R, Kollef MH. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest* 2002;122:2121.
17. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, Griffith LE, Guyatt GH, Leasa D, Jaeschke RZ, Brun-Buisson C. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med* 1998;129:440.
18. Chastre J, Trouillet JL, Vuagnat A, Joly-Guillou ML, Clavier H, Dombret MC, Gibert C. Nosocomial pneumonia in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1165-1172.
19. Markowicz P, Wolff M, Djedaini K, Cohen Y, Chastre J, Delclaux C, Merrer J, Herman B, Veber B, Fontaine A, et al. Multicenter prospective study of ventilator-associated pneumonia during acute respiratory distress syndrome. Incidence, prognosis, and risk factors. ARDS Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1942-1948.
20. Celis R, Torres A, Gatell JM, Almela M, Rodriguez-Roisin R, Agustin Vidal A. Nosocomial pneumonia. A multivariate analysis of risk and prognosis. *Chest* 1988;93:318-324.

21. Rello J, Rue M, Jubert P, Muses G, Sonora R, Valles J, Niederman MS. Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent. *Crit Care Med* 1997;25:1862-1867.
22. Chastre J. Conference Summary: Ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005;50:975-983.
23. National Nosocomial Infectious Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999;27:520-532.
24. Wunderink RG. Clinical Criteria in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000;117:191-194.
25. Park David R. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005;50:742-763.
26. Tablan OC, Anderson LJ, Besse R, Bridges C, Hajjeh R, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of the CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep* 2004;53:1-36.
27. Craven DE, Steger KA. Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated adult patients: epidemiology and prevention in 1996. *Semin Respir Infect* 1996;11:32-53.

28. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:388-416.
29. Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, Joly-Guillou ML, Combiaux D, Dombret MC, Gibert C. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:531-539.
30. Akca O, Koltka K, Uzel S, Cakar N, Pembeci K, Sayan MA, et al. Risk factors for early-onset, ventilator-associated pneumonia in critical care patients: Selected multiresistant versus nonresistant bacteria. *Anesthesiology* 2000;93:638-645.
31. Bochicchio GV, Joshi M, Bochicchio K, Tracy K, Scalea TM. A time-dependent analysis of intensive care unit pneumonia in trauma patients. *J Trauma* 2004;56:296-301.
32. Kallet RH, Quinn TE. The gastrointestinal tract and ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005;50:910-921.
33. Torres A, el-Ebiary M, Gonzalez J, et al. Gastric and pharyngeal flora in nosocomial pneumonia acquired during mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:352-7.
34. Pierce AK, Sanford JP, Thomas GD, Leonard JS. Long-term evaluation of decontamination of inhalation-therapy equipment and the occurrence of necrotizing pneumonia. *N Engl J Med* 1970;282:528-31.

35. Brain JD, Valberg PA. Deposition of aerosol in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1979;120:1325-73.
36. Harkness GA, Bentley DW, Roghmann KJ. Risk factors for nosocomial pneumonia in the elderly. *Am J Med* 1990;89:457-63.
37. Windsor JA, Hill GL. Risk factors for postoperative pneumonia: the importance of protein depletion. *Ann Surg* 1988;208:209-14.
38. Deitch EA, Berg R. Bacterial translocation from the gut: a mechanism of infection. *J Burn Care Rehab* 1987;8:475-82.
39. Fiddian-Green RG, Baker S. Nosocomial pneumonia in the critically ill: product of aspiration or translocation? *Crit Care Med* 1991;19:763-9.
40. Valles J, Artigas A, Rello J, Bonsoms N, Fontanals D, Blanch L, et al. Continuous aspiration of subglottic secretions in preventing ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med* 1995;122:179-186.
41. Bonten MJ, Gaillard CA, de Leeuw PW, Stobberingh EE. Role of colonization of the upper intestinal tract in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 1997;24:309-319.
42. Combes A, Figliolini C, Trouillet JL, Kassis N, Wolff M, Gibert C, et al. Incidence and outcome of polymicrobial ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2002 ;121 :1618-1623.

43. Rello J, Sa-Borges M, Correa H, Leal SR, Baraibar J. Variants in etiology of ventilator-associated pneumonia across four treatment sites: Implications for antimicrobial prescribing practices. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:608-613.
44. Torres A, Carlet J. Ventilator-associated pneumonia. European task force on ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2001;17:1034-1045.
45. Shah PM. Staphylococcus aureus in lower respiratory infections: Clinical relevance of antimicrobial resistance. *Semin Respir Infect* 2001;16:196-202.
46. Stevens DL. Community-acquired Staphylococcus aureus infections: Increasing virulence and emerging methicillin resistance in the new millennium. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:189-191.
47. Pujol M, Corbella X, Pena C, Pallares R, Dorca J, Verdagué R, et al. Clinical and epidemiological findings in mechanically-ventilated patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureus pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:622-628.
48. Rello J, Torres A, Ricart M, Valles J, Gonzalez J, Artigas A, Rodríguez-Roisin R. Ventilator-associated pneumonia by Staphylococcus aureus. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive episodes. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1545-1549.
49. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9:978-984.



50. Rello J, Ausina V, Ricart M, Castella J, Prats G. Impact of previous antimicrobial therapy on the etiology and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1993;101:1230-1235.
51. Rello J, Ausina V, Ricart M, Puzo C, Quintana E, Net A, Prats G. Risk factors for infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 1994;20:193-198.
52. Dennesen PJ, van der Ven AJ, Kessels AG, Ramsay G, Bonten MJ. Resolution of infectious parameters after antimicrobial therapy in patients with ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1371-1375.
53. Crouch Brewer S, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV Jr. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 1996;109:1019-1029.
54. Rello J, Mariscal D, March F, Jubert P, Sanchez F, Valles J, Coll P. Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in ventilated patients: relapse or reinfection? *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:912-916.
55. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant acinetobacter infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann Pharmacother* 2004;38:1449-1459.
56. D'Agata EM, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:588-591.

57. Simor AE, Lee M, Vearcombe M, Jones-Paul L, Barry C, Gomez M, et al. An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: risk factors for acquisition and management. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:261-267.
58. Roberts SA, Findlay R, Lang SD. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. *J Hosp Infect* 2001;48:228-232.
59. Mahgoub S, Ahmed J, Glatt AE. Completely resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:477-479.
60. Husni RN, Goldstein LS, Arroliga AC, Hall GS, Fatica C, Stoller JK, et al. Risk factors for an outbreak of multi-drug-resistant *Acinetobacter* nosocomial pneumonia among intubated patients. *Chest* 1999;115:1378-1382.
61. CDC definitions for nosocomial infections. *Am Rev Respir Dis* 1988;139:1058-1059.
62. Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;153:1711-1725.
63. Villers D. Critères cliniques, radiologiques et biologiques des pneumopathies nosocomiales. *Réan Soins Intens Med Urg* 97 :1208-1219.

64. Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1999;111:676-685.
65. Kollef MH, Ward S. The influence of mini-BAL cultures on patient outcomes: implications for the antibiotic management of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1998;113:412-420.
66. Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000:131-138.
67. Rello J, Gallego M, Mariscal D, Sonora R, Valles J. The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:196-200.
68. Kollef MH, Fraser VJ. Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med* 2001;134:298-314.
69. Meduri GU, Mauldin GL, Wunderink RG, Leeper KV Jr, Jones CB, Tolley E, Mayhall G. Causes of fever and pulmonary densities in patients with clinical manifestations of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1994;106:221-235.
70. Johanson W, Pierce A, Sanford JP, et al. Nosocomial respiratory infections with Gram-negative bacilli. *Ann Intern Med* 1972;77:701-770.
71. Correa H, Marini F, Franca G. Infección pulmonar en paciente con asistencia respiratoria. *Arch Med Int* 1982;4:191-205.

72. Garrad CHS, A'Court CD. The diagnosis of pneumonia in the critically ill. *Chest* 1995;108:17-25.
73. Rello J, Esandi ME, Díaz E, et al. The role of *Candida* spp isolated from bronchoscopic samples in nonneutropenic patients. *Chest* 1998;114:146-149.
74. Luna CM, Videla A, Mattera J, Vay C, Famiglietti A, Vujacich P, Niederman MS. Blood cultures have limited value in predicting severity of illness and as a diagnostic tool in ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1999;116:1075-1084.
75. Wimberly NW, Bass JB, Boyd BW, et al. Use of a bronchoscopic protected catheter brush for the diagnosis of pulmonary infections. *Chest* 1982;81:556-562.
76. Pollock HM, Hawkins EL, Bonner JR, et al. Diagnosis of bacterial pulmonary infections with quantitative protected catheter cultures obtained during bronchoscopy. *J Clin Microbiol* 1983;17:255-259.
77. Johanson WG, Seidenfeld JJ, Gomez P, et al. Bacteriologic diagnosis of nosocomial pneumonia following prolonged mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:259-264.
78. Torres A, el-Ebiary M. Bronchoscopic BAL in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000;117:198-202.

79. Wimberly N, Faling LJ, Bartlett JG. A fiberoptic bronchoscopy technique to obtain uncontaminated lower airway secretions for bacterial culture. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:337-343.
80. Thorpe JE, Baughman RP, Frame PT, Wesseler TA, Staneck JL. Bronchoalveolar lavage for diagnosing acute bacterial pneumonia. *J Infect Dis* 1987;155:855-861.
81. Kirkpatrick MB, Bass JB. Quantitative bacterial cultures of bronchoalveolar lavage fluids and protected brush catheter specimens from normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:546-548.
82. Kahan FW, Jones JM. Diagnosing bacterial respiratory infection by bronchoalveolar lavage. *J Infect Dis* 1987;155:862-869.
83. Torres A, de la Bellacasa JP, Xaubet A, et al. Diagnostic value of quantitative cultures of bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheters in mechanically ventilated patients with bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:306-310.
84. Meduri GU, Beals DH, Maijub AG, et al. Protected bronchoalveolar lavage: a new bronchoscopic technique to retrieve uncontaminated distal airway secretions. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:855-864.
85. Niederman MS, Torres A, Summer W. Invasive diagnostic testing is not needed routinely to manage suspected ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:565-569.

86. Souweine B, Veber B, Bedos JP, Gachot B, Dombret MC, Regnier B, Wolff M. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. *Crit Care Med* 1998;26:236-244.
87. Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993;11:1026-1030.
88. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991;88:7276-7280.

## **CAPÍTULO 9**

### **APÉNDICES**

#### **Apéndice A**

#### **Pruebas bioquímicas**

##### **Prueba de catalasa**

- a) Tomar una asada de la cepa de estudio y sumergirla en 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, observar e interpretar la prueba.

Interpretación: Positivo: Formación de burbujas

Negativo: No hay formación de burbujas

##### **Prueba de oxidasa**

- a) Impregnar un papel filtro con una gota de reactivo de oxidasa (cloruro de N,N, dimetil-p-fenildiamina al 1% en agua).
- b) Tomar una asada de la bacteria de estudio teniendo cuidado de no arrastrar medio de cultivo.
- c) Extender la colonia en el papel filtro empapando en el reactivo de oxidasa, observar e interpretar la prueba.

Interpretación: Positivo: Formación de color rosa-morado-negro

Negativo: No hay cambio de color

##### **Prueba de coagulasa**

- a) Tomar una asada de la cepa de estudio y sumergirla en 1 mL de suero humano , incubar 24 horas a 37 °C, revisando cada 2 horas para observar la formación del coágulo.

Interpretación: Positivo: Formación del coágulo  
Negativo: No hay formación del coágulo

### **Perfil bioquímico de identificación**

- a) Sistema API E: Sistema de identificación para enterobacterias
- b) Sistema API NE: Sistema de identificación para no enterobacterias
- c) Sistema API Sthap: Sistema de identificación para cocos Gram positivos



## **Apéndice B**

### **Tinciones**

#### **Tinción de Gram**

1. Teñir con cristal violeta 1 min.
2. Enjuagar con agua destilada.
3. Cubrir la preparación con solución de lugol y dejar actuar durante un min.
4. Enjuagar con agua destilada para eliminar el exceso de lugol.
5. Decolorar con alcohol al 70% durante 10 s.
6. Cubrir la preparación con safranina durante 30 s.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Dejar secar al aire y observar la preparación con objetivo de 100X.

## **Apéndice C**

### **Preparación de reactivos y soluciones**

#### **Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (solución stock)**

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura y aforar a 50 mL.

#### **Bromuro de etidio 2 ?g/mL**

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock mas 249 mL de agua ultrapura).

#### **EDTA 500 mM pH 8.0**

Disolver 9.306 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 40 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL.

#### **Etanol al 70%**

Mezclar 70 mL de etanol al 100% mas 30 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril.

#### **Fenol saturado**

##### a) Destilación

Se funde el fenol a 68 °C. Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido no es cristalino (el fenol destila a una temperatura de 180 °C, es recomendable no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el mismo refrigerante). El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris-HCl 0.5 M para evitar su cristalización.

##### b) Saturación

Antes de comenzar la saturación, el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido.

- c) Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% (función antioxidante).
- d) Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 (medir con papel indicador).
- e) Agitar durante 24 horas en un cuarto frío, dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o embudo de separación. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.
- f) Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración 0.2%.
- g) La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20 °C, las alícuotas de fenol en uso se almacenan a 4 °C.

### **Gel de agarosa al 2%**

Disolver 2 g de agarosa en 100 mL de TBE 1X, calentar en microondas o en una plancha de calentamiento hasta que esté fundido, agregar 10  $\mu$ L de bromuro de etidio 2 mg/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

### **Jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)**

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 mL de glicerol en TE 1X pH 8.0 aforar a 10 mL.

### **SEVAG (24:1)**

Disolver 24 mL de cloroformo mas 1 mL de alcohol isoamílico.

### **Proteinasa K 10 mg/mL**

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

### **SDS AL 10%**

Disolver poco a poco 5 g de SDS en 50 mL de agua destilada.

### **SDS al 1%**

Mezclar 5 mL de una solución de SDS al 10% en 50 mL de agua destilada.

### **TBE 10X Solución stock**

Disolver 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico en 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y aforar a 500 mL con agua ultrapura.

### **TBE 0.5X Solución de trabajo**

Disolver 50 mL de TBE 10X y aforar a 1 L con agua destilada.

### **TE 1X**

Mezclar 500 mL de Tris-HCl 500 mM pH 8.0 y 50 mL de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25 mL.

### **TE 1X con SDS al 1%**

Disolver 1 g de SDS en 100 mL de TE 1X.

### **Tris-HCl 500 mM pH 8 (Solución stock)**

Disolver 30.3 g de trizma base en 300 mL de agua ultrapura, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 500 mL.



