

CASTELLANOS M. & CO
ABOGADOS
Calle 94A No. 7A-09
Bogotá D.C.

Señora

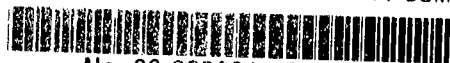
JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-038031- -00005-0000

Fecha: 2007-12-11 14:48:26 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTELIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPULSTAREQULE Folios: 16

Re.: Expediente No. **03.038.031**

Solicitud de Patente de Invención titulada: **"PROCESO PARA LA TIPIFICACION RAPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADOS"**

Solicitante: **CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC)**

RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente me permito presentar respuesta al oficio No. **11361** notificado por fijación en lista del **14 de Septiembre de 2007**, en los siguientes términos:

1. CLARIDAD DE LA SOLICITUD

1.1 Claridad de la Descripción:

En cuanto a la claridad de la solicitud, el examinador menciona:

No aparece a lo largo del capítulo descriptivo una evidencia experimental sobre la solución al problema planteado: menor duración del método, su reproducibilidad y su menor costo.

En cuanto a esta objeción, el solicitante discrepa del señor examinador, toda vez que en el aparte de la descripción Esencia de la Invención, si se aportan evidencias experimentales acerca de las soluciones a los problemas citados en el aparte Nivel Conocido de la Técnica.

Los problemas existentes en el estado de la técnica que plantea el solicitante son:

- Problemas relacionados con los largos tiempos de incubación para preparar muestras de ADN bacteriano intacto e inmovilizado de bacterias, útiles para tipificar mediante Electroforesis de Campos Pulsantes estos microorganismos. $\Rightarrow$ ~~t~~
- Uso de enzimas líticas y proteasas para llevar a cabo este proceso y moldes que no forman muestras con tamaños homogéneos conteniendo los ADN inmovilizados. $\Rightarrow$ Elementos utilizados

Las evidencias que resolvieron los problemas del estado del arte mencionados se describen en las siguientes páginas del aparte Esencia de la Invención:

- **En la página 17, líneas 3-14:** (se muestra el inicio y el fin de la cita)

"La presente invención provee un proceso y un juego de reactivos que permiten tipificar aislados de microorganismos en un día de trabajo (entre 7 y 13 horas)..." "...que brinda minibloques cuyos grosores son homogéneos y pueden estar entre 0.03 y 0.1 cm según las dimensiones del molde que se emplee."

- **En la página 18, línea 5 a página 20, línea 21:** (se muestra el inicio y el fin de la cita)

"El método de preparación de muestras provisto en esta invención consume 60 minutos a lo sumo, es sencillo y barato, pues no requiere de enzimas líticas ni proteasas en las soluciones de incubación de los microorganismos..." "...También con este tipo de molde pueden prepararse minibloques que contengan cualquier otro tipo de células."

$\downarrow$ Simple mención?? $\rightarrow$

Adicionalmente, la descripción proporciona evidencia experimental en los siguientes ejemplos de realización:

- **Ejemplo 1, página 29, línea 26 a página 30, línea 12.** Molde esterilizable para preparar muestras.
- **Ejemplo 3, página 32, línea 4 a página 33, línea 4.** Preparación no enzimática de ADN intacto e inmovilizado de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de cultivos en medio sólido y líquido.
- **Ejemplo 4, página 33, línea 6 a página 34, línea 8.** Preparación no enzimática de ADN intacto e inmovilizado de *Staphylococcus aureus* proveniente de cultivos en medio sólido.
- **Ejemplo 8, página 35, línea 1-25.** Tipificación de aislados de *Escherichia coli* mediante el empleo del miniCHEF.
- **Figuras 1, 3, 4 y 10.**

En cuanto a la reproducibilidad de las soluciones propuestas, ésta se hace evidente en los Ejemplos 1, 3, 4 y 8 y en las Figuras 1, 3, 4 y 10 contenidas en la Esencia de la Invención (Ver también Breve descripción de las figuras, pág. 40, línea 27 a pág. 43, línea 18).

Aclaro al señor examinador que no es objeto de esta invención reivindicar los costos de las soluciones propuestas por lo que no era necesario demostrar su menor costo frente a las soluciones establecidas en el estado del arte. Es evidente que si se reducen los tiempos de preparación de las muestras de ADN, así como los reactivos biológicos que son comúnmente utilizados (enzimas líticas y proteasas) son reemplazados por reactivos químicos, los costos de las soluciones son menores y por eso se mencionan como ventajas de las soluciones propuestas. Por solo señalar un ejemplo el costo de 1 g de Proteinasa k (la proteasa mas utilizada en el estado del arte) es de 690 dólares americanos mientras que el costo de 1 kg de Urea es 28.50 dólares americanos (datos de precios tomados del catalogo Sigma-Aldrich Biochemicals & Reagents for Life Science Research 2004-2005)

⇒ No
necesaria-
mente.

1.2 Claridad de las Reivindicaciones

Con el objeto de superar las objeciones hechas a la claridad de las reivindicaciones, presento un nuevo pliego reivindicatorio, el cual no incluye nueva materia a la solicitud, comprendido por 14 reivindicaciones que sustituyen a las reivindicaciones originales 1 a 17.

Las modificaciones realizadas consistieron en:

- Plantear nuevas reivindicaciones dirigidas a un proceso para la tipificación de bacterias;
- Cancelar las reivindicaciones originales No 14-17;
- Eliminar las reivindicaciones del método de cálculo que posee como salida la serie de duraciones de los pulsos más eficiente para lograr la mejor separación de los fragmentos de restricción de cada especie bacteriana en el mínimo tiempo de electroforesis, así como la representación gráfica de los patrones electroforéticos de bandas predichos.
- Adicionalmente, se presenta un nuevo resumen de la solicitud.
- La nueva reivindicación 1 limita la materia reivindicada a los dos objetos de invención novedosos revelados en esta solicitud y que forman parte del proceso de tipificación rápida de bacterias. Los dos objetos de invención son los siguientes:
 - o El molde flexible para formar los minibloques.
 - o El juego de reactivos químicos, su composición y los pasos para preparar ADN bacteriano intacto e inmovilizado en los mencionados moldes y de forma rápida mediante el uso de dicho juego de reactivos.

Del nuevo pliego reivindicatorio se desprende que no se caracteriza el proceso por el modelo matemático empleado sino por las etapas que lo caracterizan y lo hacen

novedoso e inventivo sobre los procesos conocidos. Las etapas del proceso reivindicado, aunque poseen los mismos fines que las conocidas en el estado del arte, se llevan a cabo mediante un procedimiento nuevo ya que utiliza, para inmovilizar las células bacterianas en un gel, moldes flexibles y esterilizables nunca antes descritos y para preparar los ADN intactos e inmovilizados de *P. aeuginosa*, *E. coli* y *S. aureus* disoluciones que solo contienen reactivos químicos y que tampoco eran conocidas antes de esta solicitud. Estas nuevas características del proceso permiten que el mismo sea realizado eficientemente en tiempos cortos y a menor costo. ⇒ !

En cuanto a la afirmación del señor examinador: 'No es posible la identificación de las propiedades técnicas y novedosas e inventivas del método reivindicado en las reivindicaciones 1 a 17 ni su aporte al estado de la técnica...', el solicitante manifiesta su desacuerdo toda vez que los fines de las etapas del proceso reivindicado no se diferencian de los conocidos en el estado del arte pero lo que si es novedoso es la forma en que se realizan tal y como se describe en los apartes de la descripción ya mencionados de la Esencia de la Invención y que se resumen en las Ventajas de las soluciones propuestas (pág. 38). ⇒ ??

No obstante enumeraré algunas de las características de las soluciones propuestas que hacen novedoso el proceso reivindicado:

- En la solicitud de patente, el molde está compuesto de diferentes materiales flexibles y forma minibloques individuales de tamaños idénticos.
- El molde flexible permite ser doblado para despegarle fácilmente los minibloques de el, y de esta forma los minibloques puedan caer directamente dentro de la disolución de tratamiento y así se evitan manipulaciones innecesarias. Esta propiedad de ser flexible lo diferencia de las soluciones conocidas en el estado del arte que describen moldes rígidos que no pueden ser doblados.
- Los materiales flexibles empleados para construir el molde descrito en la solicitud de patente pueden ser esterilizados en autoclave. Los moldes que pueden ser esterilizados en autoclave son útiles para tipificar bacterias patógenas porque ellos incrementan la bioseguridad del proceso. Los moldes conocidos con anterioridad están compuestos por materiales que no pueden ser esterilizados en autoclave.
- El molde reivindicado en la presente solicitud permite formar minibloques individuales e idénticos, mientras que los moldes conocidos en el estado del arte forman tiras de agarosa que tienen que ser cortadas para obtener los minibloques lo cual constituye una manipulación adicional. Cuando las tiras de agarosa son cortadas pueden obtenerse minibloques de diferentes tamaños. El uso de minibloques de diferentes tamaños afecta la reproducibilidad de los patrones de bandas.

Material flexible.

Es el molde
el objeto ??

La novedad de esta parte de la invención es el molde en si mismo y los materiales flexibles utilizados para su construcción, por ej. silicona. Los materiales flexibles poseen la propiedad de poder ser esterilizados por autoclave y doblados, así como también mayor durabilidad, por ej. el molde de acrílico es mas frágil. El molde descrito en esta solicitud permite obtener directamente minibloques individuales sin realizar manipulaciones adicionales. Por otra parte, la construcción de estos moldes es mas simple, ya que los materiales flexibles pueden ser fundidos y los moldes construidos en un 'pre-molde' diseñado previamente para que le confiera la forma requerida al molde de formar minibloques independientes. Esta tecnología facilita la producción industrial del molde. Por último, los moldes de acrílico tienen que ser construidos uno a uno mediante carpintería de plástico.

Adicionalmente, la presente solicitud revela la siguiente modificación para el aislamiento de ADN intacto de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* inmovilizado en minibloques:

- La sustitución de los reactivos biológicos (enzimas líticas y proteasas) por reactivos químicos para el tratamiento de las células de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* inmovilizadas en minibloques y la obtención de ADN inmovilizado de calidad de estos microorganismos para ser analizado mediante las minicámaras CHEF de Electroforesis de Campos Pulsantes.

El resto de las características del proceso (la disminución de los tiempos de preparación, la disminución de la cantidad de células inmovilizadas, la disminución de los costos) se derivan precisamente de la utilización de este procedimiento para preparar ADN intacto e inmovilizado de estos microorganismos.

Este proceso de preparación de ADN intacto e inmovilizado de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* se diferencia de todo lo conocido hasta el momento en el estado del arte. Hasta el momento, no había sido demostrado que las disoluciones que contienen agentes quelantes, detergentes y urea eran capaces de liberar los ADN de bacterias para que fueran digeridos con enzimas de restricción y posteriormente analizados mediante Electroforesis de Campos Pulsantes (Nivel Conocido de la Técnica). Lo único conocido era que disoluciones conteniendo urea y detergentes permitían la desproteínización de ADN de *S. cerevisiae*. Por ejemplo, El tercer párrafo de la sección de Introducción del documento '*Non-enzymatic deproteinization...*' (Analytical Letters (1994) vol 27, N° 7, pp. 1255-1264) describió '*... un método de desproteínización de las moléculas de ADN para la preparación de ADN de talla cromosómica. El método utiliza disoluciones que contienen urea, detergente o ambos combinados para disociar los complejos de ADN-proteínas*'. Sin embargo, los resultados presentados en el cuerpo del documento demostraron solamente la obtención de ADN de *S. cerevisiae* de tamaño cromosómico de calidad para ser

No.

analizado mediante Electroforesis de Campos Pulsantes después de la incubación de los protoplastos de *S. cerevisiae* con urea y un detergente. Ese procedimiento reportado fue simplificado en el documento '*Rapid non enzymatic...*' (Analytical Letters, (1996) vol 29, N° 12, pp 2079-2084) eliminando el paso de formación de protoplastos de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la extensión de esta información para la preparación de ADN inmovilizado de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* no es de ninguna forma una tarea obvia para una persona entrenada en el arte de preparar ADN y por tanto la inclusión de estos reactivos en una disolución del juego de reactivos no resta novedad y actividad inventiva a esta aplicación. Las evidencias técnicas y científicas de la anterior afirmación se presentan a continuación:

⇒ no es cierto.

- Los mecanismos por los cuales las disoluciones que contienen urea y detergentes rindieron ADN inmovilizado de *S. cerevisiae* de buena calidad para ser analizado mediante Electroforesis de Campos Pulsantes no fueron revelados en la información publicada previamente a la presentación de esta solicitud. ⇒ ??
- *S. cerevisiae* es un organismo eucarionte. La pared celular de las especies de levaduras contienen como principales componentes β -glucanos y quitina. La composición de las mencionadas paredes celulares difiere de las de las bacterias. El principal componente de las paredes celulares de la bacterias son los peptidoglicanos; otros componentes son ácido teicoico, lipoproteínas y lipopolisacáridos. Por otra parte, la mayoría de los métodos conocidos para la extracción de ADN de levaduras requieren de enzimas, tales como zimolasa, que tiene especificidades diferentes de las que se utilizan para lisar las paredes celulares bacterianas. Por ejemplo, para formar esferoplastos de células de *E. coli* y *P. aeruginosa* se requiere lisozima, mientras que para formar los de *S. aureus* es necesario lisostafina. Por tanto, para la preparación de ADN de *S. cerevisiae* o bacterias se utilizan diferente enzimas en el paso de ruptura de las paredes celulares. En el acápite Nivel conocido de la técnica. Características de las soluciones técnicas análogas se presentan varios ejemplos (vea página 9, línea 24 a la página 12, línea 16)

componentes de la sol. disolvente de pared!

Por tanto, si hasta el momento el mecanismo de acción de las disoluciones publicadas previamente a la presentación de esta solicitud eran desconocidas; y *S. cerevisiae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* requieren diferentes enzimas para romper sus paredes celulares, la inclusión de urea y detergentes en las disoluciones utilizadas para romper las paredes celulares bacterianas no es una tarea obvia. De aquí, que los autores de la solicitud de patente no tenían disponible ninguna información publica que indicara que las disoluciones utilizadas para romper las paredes celulares de *S. cerevisiae* podrían actuar sobre los componentes de las paredes celulares bacterianas.

- Argumentos adicionales forman parte del 'know-how' de la invención y por eso no fueron revelados en la solicitud de patente. Por ejemplo, las paredes celulares de *P. aeruginosa* se rompen antes de la inmovilización y no se obtienen moléculas de ADN intactas, si las células de este microorganismo son lavadas e inmovilizadas en las disoluciones que se utilizan para lavar e inmovilizar las células de *S. cerevisiae*, o *E. coli*, o *S. aureus*. Esto demuestra que no se pueden deducir generalizaciones a partir de la información conocida del estado del arte.
- La utilización de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos para tratar las células inmovilizadas, permitió que en la etapa de lavado de las de moléculas de ADN solo se utilicen reactivos químicos en las disoluciones de lavado y no sea necesario utilizar inhibidores de proteasas o largos tiempos de lavados como está establecido en el estado del arte.

En la actualidad continúan utilizándose protocolos enzimáticos costosos para tipificar bacterias mediante Electroforesis de Campos Pulsantes en todo el mundo, a pesar de las informaciones conocidas del estado del arte y que en este momento las enfermedades infecciosas permanecen siendo un serio problema emergente de salud. Este hecho provee evidencias adicionales de que no es obvio deducir generalizaciones a partir de la información conocida del estado del arte.

Los argumentos anteriores respaldan que el método para preparar ADN inmovilizado de bacterias mediante el uso solamente de reactivos químicos; y ahora reivindicado en las reivindicaciones No 1-14 enmendadas, requiere actividad inventiva y es totalmente nuevo.

En conclusión, las modificaciones efectuadas a la solicitud superan las objeciones por excepción de patentabilidad y claridad. Entonces, la presente solicitud cumple con las disposiciones de los artículos 28 y 30 y, dado su carácter novedoso e inventivo también cumple los requisitos de patentabilidad exigidos por los artículos 14 y 18 de la Decisión 486. Por lo tanto, respetuosamente solicito a ese Despacho que se conceda el privilegio de patente a la presente solicitud.

2. ANEXOS

Capítulo reivindicatorio

Nuevo resumen

Formato de modificaciones

Recibo de pago por modificaciones

Señora Jefe,


Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. **39.779.654** de Usaquén

T.P.A. No. **70819** del Cons. Sup. de la Judicatura

Carrera 9ª. No. 93-09 - Bogotá, D.C.

Teléfono: 6107420 - 6107480

Bogotá D.C.

11 DIC. 2007

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material

☒ Modificación a una solicitud

②

SOLICITANTE

Nombre: CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
(CNIC)
Dirección: Ave. 25 No. 15202 esq a 158,
Cubanacán, Playa,
Ciudad de la Habana
12100, CUBA
Nacionalidad o Domicilio: CUBA

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.
Dirección: CALLE 94A No. 7A-09
Teléfono: 610 74 20 Fax: 610 07 06
E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número 39'779.654 TPA 70.819

④

Número de Expediente:

03.038.031

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo pliego reivindicatorio con 14 reivindicaciones al cual solicito se otorgue el privilegio de patente.

Presento nuevo resumen.

⑥

Comprobante de pago No.

07 - 100,532

Fecha

10/12/2007

⑦

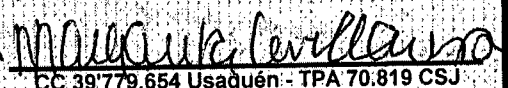
Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa.
☐ Poderes si fuere el caso, junto con la sustitución de los mismos a mi favor.
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas
☒ Nuevo capítulo reivindicatorio
☒ Nuevo resumen

⑧

NOMBRE MARGARITA CASTELLANOS A.

FIRMA


CC 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 CSJ

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 100,532
FECHA : DICIEMBRE 10 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-038031- -00005-0000

Fecha: 2007-12-11 14:48:26 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE Y L. Ene. 379 FASE NACIONAL II
Act. 444 RESPUESTA RIQUE Folios: 16

***** CONSIGNACION *****

OSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	72393600	10/12/2007	6,092,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEHAS COMERCIALES	99,000.00
		TOTAL :	\$ 99,000.00

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PROCESO PARA LA TIPIFICACIÓN RÁPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADO

5 RESUMEN

Se provee un proceso para tipificar rápidamente levaduras, parásitos y bacterias. Comprende los siguientes pasos: a) Preparar, en 5 a 60 minutos, ADN intacto e inmovilizado mediante un método que emplea un juego de reactivos que solo
10 contiene solución tampón, un detergente, un agente quelante y un agente que rompe los puentes de hidrógeno. b) Separar moléculas de ADN intactas o sus fragmentos de restricción usando miniequipos de electroforesis de campos pulsantes de los sistemas CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) y TAFE (Transversal Alternating Field Electrophoresis) en tiempos comprendidos
15 entre 2.5 y 7 horas. c) Seleccionar las condiciones óptimas que se aplicarán en el miniCHEF empleando un método que simula *a priori* los patrones electroforéticos que se obtendrían en dichos geles. d) Brindar los tiempos de reorientación, velocidades de migración y tallas de las moléculas sin emplear marcadores de tallas pero valiéndose de un método que analiza distancias migradas.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias mediante Electroforesis de Campos Pulsantes (ECP); proceso que es realizado durante 7 a 13 horas dado que las separaciones mediante ECP de los fragmentos de restricción del ADN bacteriano son realizadas en minicámaras del sistema CHEF ('Contour Clamped Homogeneous Electric Field'); proceso caracterizado porque la preparación de ADN intacto e inmovilizado de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* comprende las etapas de:

- (a) inmovilización de las células bacterianas en minibloques de agarosa mediante moldes flexibles con tapas y disoluciones compuestas por reactivos químicos; disoluciones que conforman un juego de reactivos y que contienen una sal (NaCl 0.15 M) o un agente quelante de metales (EDTA 0.01M) y una sal (NaCl 0.15M); disoluciones que podrían contener adicionalmente agarosa de bajo punto de fusión; siendo dichos moldes y tapas ensamblados completamente y las células bacterianas inmovilizadas en minibloques de agarosa formados en dichos moldes de acuerdo con diferentes pasos,
- b) tratamiento de las células inmovilizadas mediante la incubación de los minibloques en disoluciones compuestas por reactivos químicos; disoluciones que conforman un juego de reactivos y que contienen un agente quelante de metales (EDTA 0.1M), dos detergentes aniónicos (Sarcosil 1% y Nonidet P-40 1%) y Tris base 0.01M, disoluciones que podrían contener adicionalmente Urea 4M,
- c) lavado y almacenamiento de las moléculas de ADN intacto inmovilizado de cada especie bacteriana mediante la incubación de los minibloques que las contienen en disoluciones compuestas por reactivos químicos; disoluciones que conforman un juego de reactivos y contiene un agente quelante de metales (EDTA 0.1M) y Tris base 0.01M,

proceso donde las etapas son realizadas de acuerdo con diferentes pasos en dependencia de la especie bacteriana.

2. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizado porque el molde flexible donde se inmovilizan las células de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus*

aureus en minibloques de agarosa son láminas de materiales tales como la silicona, y se cubren con tapas de vidrio; láminas que poseen hasta 0.5 cm de grosor y tienen estampadas en una de sus superficies múltiples depresiones cuadradas con lados de 0.3 cm de tamaño y desde 0.03 hasta aproximadamente 0.1 cm de profundidad, depresiones en las cuales la mezcla de agarosa y células bacterianas solidifica formando minibloques con dichas dimensiones, moldes que son lo suficientemente flexibles para doblarse y permitir que los minibloques se despeguen de los mismos, moldes que son reutilizables después de esterilizarlos mediante autoclave.

3. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación No. 2 caracterizado porque las láminas flexibles que forman dichos moldes flexibles y autoclavables son de silicona, goma o cualquier otro material flexible, láminas que pueden tener cualquier forma, tamaño y hasta 50 depresiones cuadradas idénticas estampadas en una superficie.

4. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con las reivindicación N° 1 caracterizado porque la etapa de ensamblaje de uno de dichos moldes flexibles e inmovilización de células bacterianas en minibloques de agarosa para preparar ADN intacto inmovilizado comprende los pasos siguientes:

- i) verter la suspensión de células bacterianas y agarosa sobre la superficie del molde que posee estampadas las depresiones,
- ii) distribuir uniformemente dicha suspensión con una espátula hasta rellenar dichas depresiones,
- iii) cubrir el molde con su tapa y esperar hasta que se formen los minibloques,
- iv) doblar el molde sobre un frasco cualquiera para despegar los minibloques.

5. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de dicho juego de reactivos utilizada para lavar las células en la etapa de inmovilización de las mismas en minibloques de agarosa mediante moldes flexibles es NaCl 0.15M y EDTA 0.01M, pH 8.0 (disolución N° 1).

6. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de dicho juego de reactivos utilizada para lavar las células en la etapa de inmovilización de las mismas en minibloques de agarosa mediante moldes flexibles es NaCl 0.15M (disolución N° 2).

7. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de dicho juego de reactivos utilizada para formar los minibloques de agarosa en la etapa de inmovilización de las células mediante moldes flexibles es agarosa de bajo punto de gelificación fundida en NaCl 0.15M a una concentración entre 1.5 y 2.0 % (disolución N° 3).

8. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de dicho juego de reactivos utilizada para formar los minibloques de agarosa en la etapa de inmovilización de las células mediante moldes flexibles es agarosa de bajo punto de gelificación fundida en NaCl 0.15M y EDTA 0.01M, pH 8.0 a una concentración entre 1.5 y 2.0 % (disolución N° 4).

9. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de dicho juego de reactivos mediante la cual se realiza la etapa de tratamiento de las células inmovilizadas es EDTA 0.1 M, Sarcosil 1 %, Nonidet P-40 1 % y Tris base 0.01 M, pH 8.0 (disolución N° 5).

10. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de dicho juego de reactivos mediante la cual se realiza la etapa de tratamiento de las células inmovilizadas es EDTA 0.1 M, Sarcosyl 1 %, Nonidet P-40 1 %, Tris base 0.01M y Urea 4M, pH 8.0 (disolución N° 6).

11. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de la disolución de dicho juego de reactivos mediante la cual se realiza la etapa de lavado y conservación de los minibloques es EDTA 0.1 M y Tris base 0.01M, pH 8.0 (disolución N° 7).

12. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con las reivindicación N° 1, caracterizado porque las etapas para la preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *P. aeruginosa* comprenden los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 2 de dicho juego de reactivos,
- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 3 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde e incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 30 minutos a 50°C,
- iv) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

13. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con las reivindicación N° 1, caracterizado porque las etapas para la preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *S. aureus* comprenden los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 1 de dicho juego de reactivos,
- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 4 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde e incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 60 minutos a 50°C,
- iv) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

14. Un proceso para la tipificación rápida de bacterias de acuerdo con las reivindicación N° 1, caracterizado porque las etapas para la preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *E. coli* comprenden los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 1 de dicho juego de reactivos,

- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 3 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde, e incubar los minibloques en la disolución N° 5 de dicho juego de reactivos durante 10 minutos a 37°C,
- iv) incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 30 minutos a 50°C.
- v) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Replacement for Bacteriophage Typing of *Staphylococcus aureus*

TAMMY L. BANNERMAN,* GARY A. HANCOCK, FRED C. TENOVER, AND J. MICHAEL MILLER

Hospital Infections Program, National Center for Infectious Disease, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 30333

Received 18 August 1994/Returned for modification 9 November 1994/Accepted 19 December 1994

Bacteriophage typing (BT) (World Health Organization method) has been used at the Centers for Disease Control and Prevention for over 30 years to type isolates of *Staphylococcus aureus*. Since studies have shown that BT patterns have poor reproducibility and because BT fails to type a high percentage (15 to 20%) of isolates, the Centers for Disease Control and Prevention has converted from using BT to using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for strain typing *S. aureus*. We compared the results of BT with results of PFGE for typing 300 isolates of *S. aureus*, including strains from several well-characterized outbreaks. Ninety-six isolates were BT group I, 19 were group II, 82 were group III, 7 were group V, and 96 were nontypeable. PFGE identified subgroups within each phage group and thus was more discriminating than BT, which identified no subgroups. PFGE was able to type all isolates and distinguish related from unrelated strains of *S. aureus*. Our modified, standardized PFGE methodology should enable typing laboratories to obtain rapid, reliable results in 3 to 4 days when starting with an isolated colony on agar media.

Outbreaks of infections caused by *Staphylococcus aureus* continue to be a problem for health care facilities (16). Identifying strains among the outbreak isolates is a major step in determining the source of the outbreak and in designing subsequent control measures. Two typing techniques frequently used for strain delineation of *S. aureus* are bacteriophage typing (BT) (4, 14) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (7, 8, 10, 15). The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) has used BT for over 30 years to discriminate among strains of outbreak-related *S. aureus*. Unfortunately, this technique has several weaknesses: (i) it characterizes isolates on the basis of a phenotypic marker that has poor reproducibility; (ii) it does not type all isolates; and (iii) it requires maintenance of a large number of phage stocks and propagating strains, which confines its use to relatively few reference laboratories. PFGE is a molecular typing technique that does not have the same limitations as BT, since the bacterial genome is more stable than most protein markers. PFGE offers advantages over other DNA-based *S. aureus* strain-typing techniques (9, 12). For example, plasmid typing offers only moderate reproducibility, restriction fragment length polymorphism typing requires the analysis of complex banding patterns, and ribotyping is highly labor-intensive and time-consuming. To date, all *S. aureus* isolates are typeable by PFGE; however, criteria for PFGE banding pattern interpretation have not been standardized despite several attempts (9, 11). In addition, PFGE techniques currently being used are technically demanding.

This paper presents the data that served as the basis for moving from BT to PFGE as the method of choice for strain typing *S. aureus* isolates at the CDC. During this investigation, we developed (i) a shorter and easier standardized method for typing *S. aureus* by PFGE, (ii) the interpretation of the resulting banding patterns used at the CDC, and (iii) the criteria for submitting outbreak isolates of *S. aureus* to CDC for PFGE analysis.

* Corresponding author. Mailing address: Hospital Infections Program, Mailstop C16, 1600 Clifton Rd., Atlanta, GA 30333. Phone: (404) 639-3599. Fax: (404) 639-1381. Electronic mail address: TZB6@cidhpl1.em.cdc.gov (Internet).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. A total of 300 isolates of *S. aureus* were selected for inclusion in this study. Ninety-six isolates were BT group I, 19 were group II, 82 were group III, 7 were group V, and 96 were nontypeable. Phage group I contained cultures representing 16 outbreak clusters; isolates having a phage pattern of 80/81 or 52/52A/80/81 were placed into two clusters because of evidence supporting their close relationship (1, 2, 5). Phage groups II, III, and V contained cultures representing four, seven, and one outbreak cluster(s), respectively. These selected isolates were taken from a collection of strains that were sent to CDC for phage typing from a variety of hospitals located in the United States over a period of 35 years.

BT. Phage typing was performed as described previously by using the international bacteriophage typing set at the routine test dilution and 100 times the routine test dilution (3). Outbreak strains that differed by the presence or absence of one phage were considered related; strains, which differed by the presence or absence of two or more phages were considered unrelated.

PFGE. The protocol for the preparation of chromosomal DNA was modified from that described by Goering and Winters (6). The cultures were grown overnight in 5 ml of brain heart infusion broth, and 0.7 ml of this overnight culture was harvested by centrifugation (7,000 rpm for 2 min [Eppendorf model 5415C]) in a microfuge tube. Cells were washed once in 1 ml of autoclaved TEN buffer (0.1 M Tris Cl, 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA) and centrifuged again. The washed cells were resuspended in 0.3 ml of autoclaved EC buffer (6 mM Tris Cl, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.5% Brij 58, 0.2% deoxycholate, 0.5% Sarkosyl). Two microliters of a 1-mg/ml solution of lysozyme (Amberlite; Applied Microbiology, New York, N.Y.) dissolved in 20 mM sodium acetate was added to the cell suspension, and the mixture was subsequently vortexed. Three hundred microliters of 2% SeaPlaque agarose (FMC Corp., Rockland, Maine) dissolved in EC buffer was added to the lysozyme-cell suspension. The suspension was briefly vortexed and quickly pipetted into a plug mold. The plug was allowed to solidify at room temperature for about 10 min. After solidification, the plug was placed in a tube (16 by 100 mm) containing 3 ml of EC buffer and the cells in the plug were lysed for 1.0 h at 37°C without shaking. After the lysing step, the EC buffer was removed and replaced with 3 ml of autoclaved TE buffer (10 mM Tris Cl, 5 mM EDTA) and the tube was incubated for 1 h at 55°C without shaking. The plug was then transferred to 3 ml of fresh TE buffer for storage at 4°C until further analysis.

For electrophoresis, the plug was cut into small slices (2 by 5 mm) and placed in a 125- μ l total restriction enzyme mixture (restriction buffer plus sterile distilled water) containing 20 U of *Sma*I (New England Biolabs, Beverly, Mass.). After a 2-h incubation at 25°C with shaking at 140 rpm, chromosomal restriction fragment patterns were analyzed by loading the trimmed slices of the plug into a well of a 1% SeaKem agarose running gel (FMC Corp.). The running gel was prepared in 0.5 $\times$ TBE buffer (Bio-Rad, Richmond, Calif.). The wells containing the plug slices were sealed with 0.8% SeaPlaque agarose. Electrophoresis was performed with the CHEF-DR II or CHEF-DR III electrophoresis cell (Bio-Rad, McVillie, N.Y.). Bacteriophage lambda DNA concatamers (Bio-Rad) were used as size standards and served as a control for the running parameters of the CHEF-DR units. The running parameters were as follows: initial pulse, 5 s; final

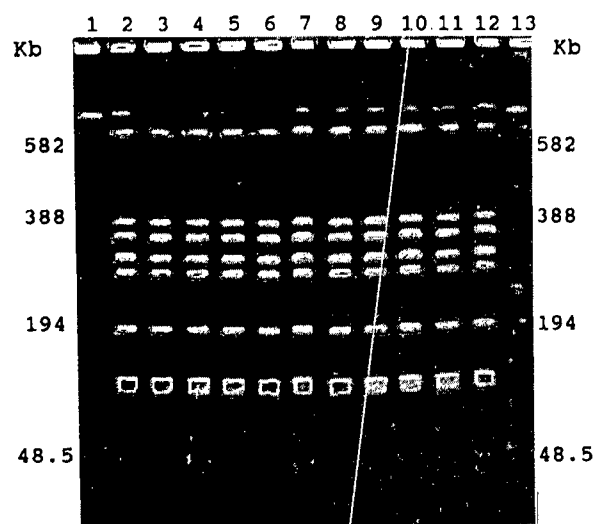


FIG. 1. PFGE patterns from an outbreak of BT-nonreactive isolates. Molecular size standards (lambda oligomers) are in lanes 1 and 13. Lanes 2 to 12 each contain a different isolate.

pulse, 40 s; voltage, 200 V or 6 V/cm; time, 20 h; and temperature, 12 to 14°C. The gels were stained with ethidium bromide and photographed.

Interpretation of PFGE banding patterns. The interpretation of the banding patterns was done visually according to the following guidelines: (i) banding patterns from the majority of epidemiologically related isolates that appeared identical in size and number of bands were considered to represent the same strain (modal pattern), which was designated strain A; (ii) isolate banding patterns that differed from the main pattern because of one or two genetic events (three or fewer band differences due to a mutation, insertion, deletion, and/or inversion) were considered those of a subtype within the main group (e.g., A₁, A₂, and A₃, etc.); and (iii) isolate banding patterns that differed from the main pattern by four or more bands which could not be explained by at most two genetic events were considered those of a different strain (e.g., designated strains B, C, and D, etc.).

RESULTS

Typeability. Ninety-six (32%) of the 300 isolates of *S. aureus* were nonreactive by BT. Eighty-three of the 96 isolates were isolated from three different outbreak clusters. Because of the inability of BT to type these isolates, no usable information was available to enable infection control personnel to confirm the occurrence, or support the resolution, of an outbreak. PFGE was able to show strain relationships within two of the outbreaks. The third outbreak cluster was found by PFGE to contain two different strains. Figure 1 displays the PFGE banding patterns of outbreak isolates that were nonreactive by BT. The uppermost band in this figure is not undigested DNA, but a large piece of DNA that has no *Sma*I restriction site.

Discriminatory power. Discriminatory power refers to the ability of a technique to differentiate among unrelated strains. A comparison of the abilities of BT and PFGE to differentiate among isolates representing phage groups I, II, III, and V is given in Table 1. The number of patterns for BT and PFGE was determined by analyzing each outbreak independently.

(i) **Phage group I.** Representatives of phage group I included 15 outbreak cluster isolates from a large variety of geographic locations and sources. For the 96 isolates studied, BT produced 18 patterns and PFGE produced 15 type patterns and 31 subtype patterns. Strain-typing agreement occurred between the two typing techniques for all outbreaks except two. For one of these two outbreaks (outbreak 1 in Table 2), BT gave three patterns, 29/52/80/81, 29/52/95, and 29, indicating

TABLE 1. Comparison of the discriminatory powers of BT and PFGE

Phage group	No. of isolates	No. of outbreaks ^a	Total no. of phage patterns ^b	Total no. of PFGE patterns ^b	
				Types	Subtypes
Nontypeable	96	7	0	8	8
I	96	15	18	15	31
II	19	4	4	4	2
III	82	7	15	11	13
V	7	1	1	1	5

^a Number of presumed outbreak-related clusters as determined by epidemiologic data.

^b Total number of patterns for BT and PFGE was determined by analyzing each outbreak independently.

three strains were present. For the same outbreak, PFGE showed one type pattern and one subtype pattern, indicating the presence of one strain. For the second outbreak, BT showed phage types of 29/52/79/80 and 29/80, indicating two strains were present. PFGE results showed one type pattern and one subtype pattern, indicating one strain was present. Comparison of the different outbreak patterns revealed two predominant or main PFGE patterns for this phage group. This finding suggests that a small number of clones constitute phage group I. Further studies are under way to help elucidate these results. All of the subtypes were found to have one of the two main patterns. Lanes 2 and 3 of Fig. 2 show the main representatives of phage group I; lane 2 shows the predominant pattern.

(ii) **Phage group II.** Representatives of phage group II included isolates from four outbreak clusters and four different geographic locations. For the 19 isolates studied, BT produced four patterns and PFGE produced four type patterns and two subtype patterns. For outbreak 2 (Table 2), BT included a nonoutbreak isolate as part of the outbreak. Each cluster of isolates from the four sets gave a different main PFGE pattern, with two of the main patterns showing a subtype or slight variation. Three of the four main patterns are shown in Fig. 2 (lanes 4 to 6).

(iii) **Phage group III.** Representatives of phage group III included isolates from five different geographic locations and seven different outbreak clusters. For the 82 isolates studied, BT showed 15 patterns and PFGE produced 11 type patterns and 13 subtype patterns. Strain-typing agreement between the two techniques occurred for all outbreaks except three. For one of these three outbreaks, BT gave two phage types of 53/77 and 53/54/75/77/95, indicating two strains were present. PFGE results showed the presence of one strain by giving a type pattern for isolates having the phage pattern of 53/54/75/77/95 and a subtype pattern for isolates having the phage type of 53/77. For the second outbreak, PFGE results showed 3 type patterns and 11 subtype patterns, indicating the presence of three strains. BT gave results indicating that there were six strains. The first of the three strains for PFGE consisted of phage types 75 (BT strain 1), 75/77 (BT strain 1), and 47/81 (BT strain 2). The second PFGE strain consisted of phage types 47/54/75 (BT strain 3), 47/54/75/77 (BT strain 3), 47/54/75/81 (BT strain 3), 47/54/75/77/81 (BT strain 3), 6/47/54/81 (BT strain 4), and 53 (BT strain 5). The third PFGE strain consisted of the phage type 47/53/54/75/77/83A (BT strain 6). PFGE showed 7 main patterns (Fig. 2, lanes 7 to 13), with the 13 subtype patterns falling under 2 of the 7 main patterns (lanes 8 and 9). BT gave a wide variety of different phage combinations. For the third outbreak (outbreak 3 in Table 2),

TABLE 2. Epidemiologic application of PFGE to representative outbreaks of *S. aureus* infection

Outbreak	Phage group	No. of isolates ^a	No. of outbreak-related isolates	No. of different patterns			No. correctly classified by ^c :		No. misclassified by BT ^d
				Expected	By BT	By PFGE ^b	BT	PFGE	
1	I	6	6	1	3	1	4	6	2
2	II	8	7	2	1	2	7	7	1
3	III	17	14	4	5	4	13	14	1
4	III	13	12	2	3	2	11	12	1
5	V	7	7	1	1	1	7	7	0

^a Total number of outbreak cluster isolates submitted for strain analysis.^b Number of major PFGE patterns, excluding subtypes.^c Number of isolates correctly classified as outbreak related.^d Outbreak isolates were classified as unrelated for outbreaks 1, 3, and 4, and one nonoutbreak isolate was classified as related for outbreak 2.

BT gave five different patterns and PFGE gave four main patterns with one subtype. BT excluded an outbreak isolate from the outbreak-related cluster.

Figure 3 demonstrates the usefulness of PFGE in distinguishing related from unrelated isolates in a food outbreak (outbreak 4 in Table 2). Nine of the 13 isolates were found to be the same strain, designated strain A, by PFGE (Fig. 3, lanes 2 to 8, 11, and 12). Isolates in lanes 9, 10, and 13 differ by one band (around 48 kb) from strain A; therefore, they are subtypes. This band difference may be attributable to the loss of a plasmid in the subtype isolates. The final isolate was designated strain B by PFGE because of the completely different banding pattern (Fig. 3, lane 14). Among the nine strain A isolates and three subtypes, BT gave a pattern of 47/54/75 for all except one strain A isolate that was nonreactive. Strain B was phage type 95 by BT.

(iv) **Phage group V.** The isolates tested for phage group V came from one outbreak. For the seven isolates, BT gave one pattern, 94/96. For PFGE, there was only one main pattern, with the remaining isolates being classified as subtypes (Fig. 4). The isolates in lanes 2 and 5 of Fig. 4 have the same PFGE pattern. On the basis of the CDC criteria for PFGE banding pattern interpretation, these two isolates were classified as belonging to the same strain, designated strain A. The other

isolates are subtypes of strain A and were classified as subtypes A₁ to A₅. As shown in Table 2 (outbreak 5), both techniques were correct in identifying all isolates as outbreak related.

DISCUSSION

Strain identification is an integral part of outbreak investigations. For over 30 years, the CDC, like other large reference laboratories around the world, has been using BT as its strain-typing method. However, this technique has several reported problems, including problems with typeability, reproducibility, and the labor required. The goal of this study was to determine if PFGE is a more epidemiologically accurate strain-typing method than BT for *S. aureus*. Our studies found two main advantages of using PFGE: (i) it had universal *S. aureus* strain-typing ability, and (ii) it was better than BT at distinguishing epidemiologically related strains from unrelated strains.

After PFGE was established as the method of choice, it was necessary to develop a simple procedure that could provide rapid, reliable results. The procedure described here can be completed within 3 to 4 days, starting with an isolated colony on agar media. The main difference between this procedure and other published PFGE procedures is the lack of a proteinase step. Unlike that of some genera, staphylococcal DNA can be released from intact cells in agarose plugs, restricted with endonucleases, and electrophoresed before significant DNA

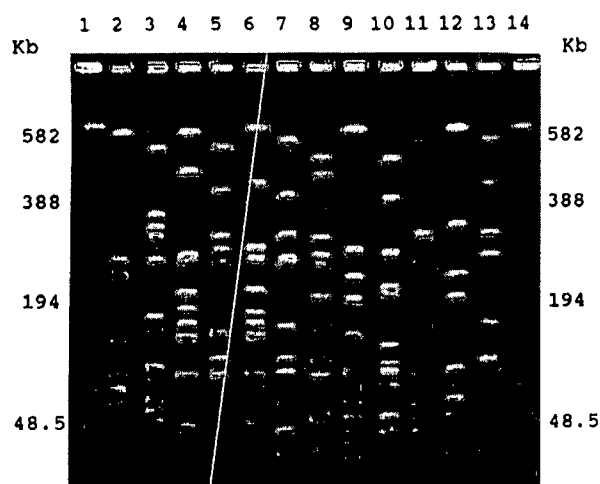


FIG. 2. Main PFGE patterns for the isolates found to belong to phage groups I, II, and III. Representatives of phage group I are in lanes 2 and 3. Representatives of phage group II are in lanes 4 to 6. Representatives of phage group III are in lanes 7 to 13. Molecular size standards (lambda oligomers) are in lanes 1 and 14.

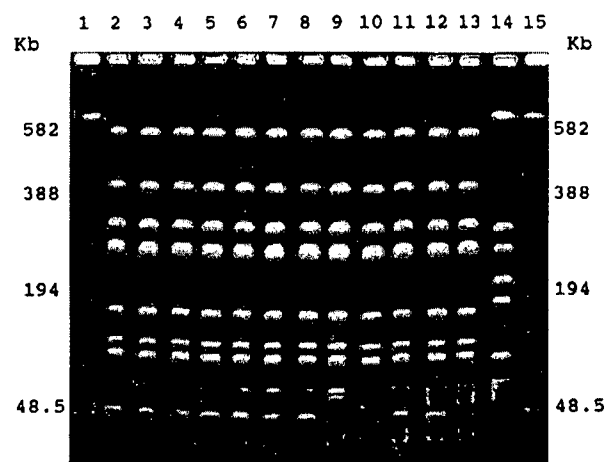


FIG. 3. PFGE patterns from food outbreak isolates. Molecular size standards (lambda oligomers) are in lanes 1 and 15. Lanes 2 to 14 each contain a different isolate.

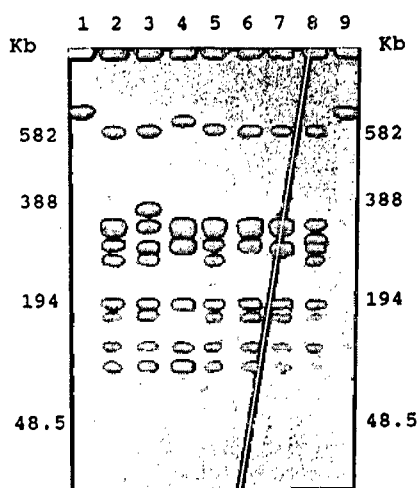


FIG. 4. PFGE patterns from outbreak isolates belonging to phage group V. Molecular size standards (lambda oligomers) are in lanes 1 and 9. Lanes 2 to 8 each contain a different isolate.

degradation takes place. However, if one is using a restriction endonuclease that requires overnight digestion, a proteinase or similar step may be necessary because restriction incubation temperatures of 25 to 37°C allow the resident nucleases to cleave DNA. The stability of the DNA in the plugs will differ from strain to strain. Some plugs (prior to restriction endonuclease digestion) have been kept in TE buffer for 3 to 6 months without any noticeable DNA degradation, while the DNA in other plugs has shown degradation after 1 month. Since a critical process in PFGE is the lysis of the isolate, the use of the recombinant lysostaphin Ambicin L is an essential component of our protocol. This protocol can also be applied to the coagulase-negative staphylococci with two modifications: (i) an increase in the lysostaphin amount from 2 to 10 µl and (ii) an increase in the lysing time from 1 to 2.0 or 2.5 h, depending upon the species. Further optimization of PFGE for strain typing staphylococci is currently under way. This technique, unlike BT, does not require the time-consuming maintenance of a large number of stocks. The cost per PFGE assay of 13 isolates is around \$36, excluding technician time and the initial cost of equipment. The total price consists of the costs for reagents, \$15; media, \$10; glassware, \$9; and miscellaneous items (film), \$2. In comparison, the total cost for BT is about \$10 per isolate. The disadvantage of this technique in comparison with BT is the high cost of the capital equipment for PFGE.

A final goal of this study was to provide to health institution personnel interested in having strains of staphylococci analyzed by PFGE at the CDC criteria for submission of isolates. The criteria are as follows: (i) testing will be performed only on outbreak-related isolates submitted in pure culture on Trypticase soy agar slants (or equivalent); (ii) all isolates must be sent in one shipment, since accurate interpretation requires that all isolates from an outbreak be tested on the same gel, if possible; (iii) cultures should be sent to the CDC through the state health department with a letter from the requestor explaining the epidemiologic need for PFGE analysis, the demographics of the outbreak, and locally obtained testing results (e.g., antimicrobial susceptibility); and (iv) if hospitals have had a previous problem with *S. aureus*, they are encouraged to submit

one or two historical control strains to determine whether the same strain is responsible for the outbreak.

The results from PFGE analysis must always be analyzed in light of the information from the epidemiologic investigation. There are four main categories into which isolates may fall when the interpretation guidelines presented herein are used (13). (i) Isolates with identical banding patterns (same number and size of bands) will be considered "indistinguishable" and if epidemiologically related will be considered the same strain (i.e., designated strain A); (ii) isolates with banding patterns differing from that of strain A as a result of one genetic event will be considered "probably related" to that main strain and will be considered subtypes if the epidemiologic data suggest that they are linked to the outbreak; (iii) isolates with banding patterns differing from that of strain A as a result of two genetic events will be considered "possibly related" to strain A and will be considered subtypes if the epidemiologic information suggests that they are involved in the outbreak; and (iv) isolates with banding patterns differing from that of strain A as a result of three or more genetic events will be considered "different" strains (i.e., designated strain B, C, or D, etc.).

Because of the advantages PFGE has over BT, including greater discriminatory power, universal typeability, and ease of use and interpretation, the CDC has converted to using PFGE in epidemiologic investigations of *S. aureus*. The PFGE method described herein should enable typing laboratories to obtain rapid, reliable results when investigating staphylococcal outbreaks.

ACKNOWLEDGMENT

This work was performed while the first author, Tammy L. Bannerman, held a National Research Council-CDC research associateship.

REFERENCES

- Asheshov, E. H., and J. E. Rippon. 1959. Changes in typing pattern of phage-type 80 staphylococci. *J. Gen. Microbiol.* 20:634-643.
- Bannerman, T. L., G. A. Hancock, F. C. Tenover, and J. M. Miller. Unpublished data.
- Blair, J. E., and R. E. O. Williams. 1961. Phage typing of staphylococci. *Bull. W. H. O.* 24:771-778.
- Chowdhury, M. N., and A. M. Kambal. 1992. An outbreak of infection due to *Staphylococcus aureus* phage type 52 in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 22:299-305.
- Comtois, R. D. 1960. Changes in the phage-typing patterns of staphylococci following lysogenization with related group of *Staphylococcus* bacteriophages. *Can. J. Microbiol.* 6:491-502.
- Goering, R. V., and M. A. Winters. 1992. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30:577-580.
- Ichihama, S., M. Ohta, K. Shimokata, N. Kato, and J. Takeuchi. 1991. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 29:2690-2695.
- Linhardt, F., W. Ziebuhr, P. Meyer, W. Witte, and J. Hacker. 1992. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic fragments as a tool for the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 95:181-186.
- Prevost, G., B. Jaulhac, and Y. Piemont. 1992. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 30:967-973.
- Stewart, P. R., W. El-Adhami, B. Inglis, and J. C. Franklin. 1993. Analysis of an outbreak of variably methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with chromosomal RFLPs and *mec* region probes. *J. Med. Microbiol.* 38:270-277.
- Struelens, M. J., A. Deplano, C. Godard, N. Maes, and E. Serruys. 1992. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30:2599-2605.
- Tenover, F. C., R. Arbeit, G. Archer, J. Biddle, S. Byrne, R. Goering, G. Hancock, G. A. Hebert, B. Hill, R. Hollis, W. R. Jarvis, B. Kreiswirth, W. Eisner, J. Maslow, L. K. McDougal, J. M. Miller, M. Mulligan, and M. A. Pfaller. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 32:407-415.