

Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas

Felipe Fernández-Cuenca

Departamento de Microbiología y Epidemiología Infecciosa. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han supuesto un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas. La PCR que utiliza cebadores arbitrarios (AP-PCR) y la PCR que utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (rep-PCR) son las técnicas de PCR más utilizadas para tipificar bacterias y hongos. Estas técnicas son sencillas de realizar, rápidas y poseen un elevado poder de discriminación. La AP-PCR es relativamente poco reproducible, por lo que tiene que ser validada o estandarizada en cada laboratorio. La digestión con enzimas de restricción de genes amplificados mediante PCR constituye la base de la PCR-RFLP. Esta técnica es sencilla y muy reproducible, pero suele ser menos discriminativa que la AP-PCR o la rep-PCR. El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se basa en la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN obtenidos por restricción enzimática del ADN cromosómico. Esta técnica de tipificación posee mayor poder de discriminación y reproducibilidad que las anteriores, pero es más laboriosa, más costosa y requiere personal especializado. La mayoría de las técnicas de tipificación basadas en la PCR son menos laboriosas, más rápidas y más fáciles de realizar e interpretar que la electroforesis en campo pulsante (PFGE; técnica de referencia para la mayoría de bacterias y hongos), pero suelen ser, por lo general, menos reproducibles y discriminativas que esta última, dependiendo de la especie estudiada y de la técnica de PCR empleada. En resumen, existen diversas técnicas moleculares basadas en la PCR que son muy útiles como método inicial de tipificación para estudiar la relación clonal entre aislados de una misma especie. La elección de la técnica depende de factores de tipo técnico (rapidez, poca laboriosidad, fácil de interpretar y con un elevado poder de discriminación y reproducibilidad) y económico (bajo coste).

Palabras clave: Reacción en cadena de la polimerasa. Epidemiología molecular. Enfermedades infecciosas.

Correspondencia: Dr. F. Fernández-Cuenca.
Departamento de Microbiología y Epidemiología Infecciosa.
Hospital Universitario Virgen Macarena.
Apdo. 914. 41009 Sevilla. España.
Correo electrónico: felipefc@us.es

Manuscrito recibido el 3-2-2004; aceptado el 12-2-2004.

PCR techniques for Molecular Epidemiology of Infectious Diseases

The development of new PCR-based typing methods in the last years have supposed an important advance in the study of infectious diseases. Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) and repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) are the most widely used PCR-based fingerprinting methods for bacteria and fungi. Major advantages of these methods are flexibility, technical simplicity and high discriminatory power. The AP-PCR presents problems of low inter-run and inter-laboratory reproducibility which make necessary the optimization of the protocol and reagents. PCR-RFLP is based in the enzymatic digestion of polymorphic genes amplified by PCR. This method is easy to perform and discriminatory, although less than AP-PCR or rep-PCR. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a highly reproducible and discriminatory typing method based on the amplification by PCR of restriction fragments obtained from chromosomal DNA. This method is more discriminative and reproducible than AP-PCR, rep-PCR and PCR-RFLP, but it is more time-consuming and expensive, and requires specialised personnel. Most of these PCR-based typing methods are less time-consuming, rapid and easy to perform and of interpretation than pulsed-field gel electrophoresis (PFGE; gold standard method for typing most bacterium and fungi), but they usually are less discriminative and reproducible than PFGE, depending on the species studied and the method of PCR used. In summary, there are several PCR-based methods which are useful as a primary approach to the study of the clonal relationship among microbial isolates. The selection of the method to be used depend on technical (rapid, low time-consuming, easy to perform and to interpretate, reproducible and discriminatory) and economical (low cost) factors.

Key words: Polymerase chain reaction. Molecular epidemiology. Infectious diseases.

Introducción

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma espe-

TABLA 1. Características más relevantes de algunos métodos de tipificación basados en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR en comparación con la electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Método	Facilidad técnica	Interpretación de resultados	Duración de la técnica (días)	Reproducibilidad entre laboratorios	Reproducibilidad intraensayo	Coste por prueba
PFGE	Moderada	Fácil	3	Buena	Buena	Moderado
PCR-RFLP	Fácil	Fácil	1	Buena	Buena	Bajo
rep-PCR	Fácil	Fácil	1	Buena	Moderada	Bajo
AP-PCR	Fácil	Fácil	1	Moderada	Baja	Bajo
AFLP	Moderada	Moderada	2	Buena	Buena	Moderado
MLST	Difícil	Moderada	2	Buena	Buena	Elevado

Adaptada de Olive y Bean².

cie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva¹.

Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Ello se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían.

El extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido desarrollar nuevos métodos genotípicos de tipificación. La electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) es la técnica estándar de referencia para tipificar la mayoría de bacterias, hongos y parásitos con importancia clínica, debido a que posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad³. Esta técnica de tipificación tiene el inconveniente de que es muy laboriosa y duradera (la mayoría de los protocolos de trabajos requieren más de 4 días para poder obtener y analizar los pulsotipos), por lo que su uso diario en el laboratorio es poco práctico. Esto hace que sea necesaria la búsqueda de otros métodos de tipificación alternativos a la PFGE que sean más flexibles y rápidos, y menos laboriosos.

Técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en el mismo principio general común a todas ellas: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación^{2,3}. Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos.

Por lo general, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas y más flexibles que la PFGE, y permiten tra-

bajar con un mayor número de muestras^{2,3} (tabla 1) (fig. 1). Las técnicas de PCR son útiles para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente, pero son menos discriminativas que la PFGE para diferenciar subtipos entre cepas relacionadas clonalmente. Estas técnicas pueden presentar problemas metodológicos relacionados con la inhibición de la PCR y la contaminación de las muestras durante el proceso de preamplificación. Algunas de estas técnicas tienen que ser validadas en el laboratorio (estandarización de protocolos, equipos y reactivos) debido a que presentan una baja reproducibilidad, mientras que otras técnicas pueden requerir un *software* adecuado para analizar patrones de bandas de ADN que son complejos y difíciles de interpretar visualmente. Otros problemas son los criterios utilizados para interpretar los patrones de bandas y la dificultad para comparar los patrones de ADN entre varios geles, aunque esto último puede resolverse con la utilización de programas informáticos que analizan automáticamente los patrones y los junta en agrupaciones (*clusters*).

En la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) o PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR) se utilizan uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorios y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja estrictancia (temperatura de anillamiento a 36-45 °C y > 2 mM MgCl₂)⁴. Las ventajas más interesantes de la AP-PCR son su rapidez, flexibilidad, fácil interpretación y relativamente bajo coste. Existen diversos estudios que indican que la AP-PCR posee una baja reproducibilidad (sobre todo cuando se comparan patrones de bandas entre laboratorios diferentes), por lo que es recomendable que esta técnica se valide y se optimice en cada laboratorio⁵⁻¹¹. La baja reproducibilidad de la AP-PCR se debe a que es muy sensible a pequeñas variaciones metodológicas, como el procedimiento de extracción de ADN, el tipo de termociclador, la concentración de molde de ADN, la temperatura de anillamiento, la concentración de iones magnesio, etc.¹²

En general, la AP-PCR suele tener un poder de discriminación inferior al de la PFGE, aunque puede incrementarse con la utilización de varios cebadores y mediante la optimización de la PCR. La AP-PCR se ha utilizado en diversos estudios para tipificar bacterias (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella pneumophila*, etc.) y hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*)⁵⁻¹¹.

La rep-PCR es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN

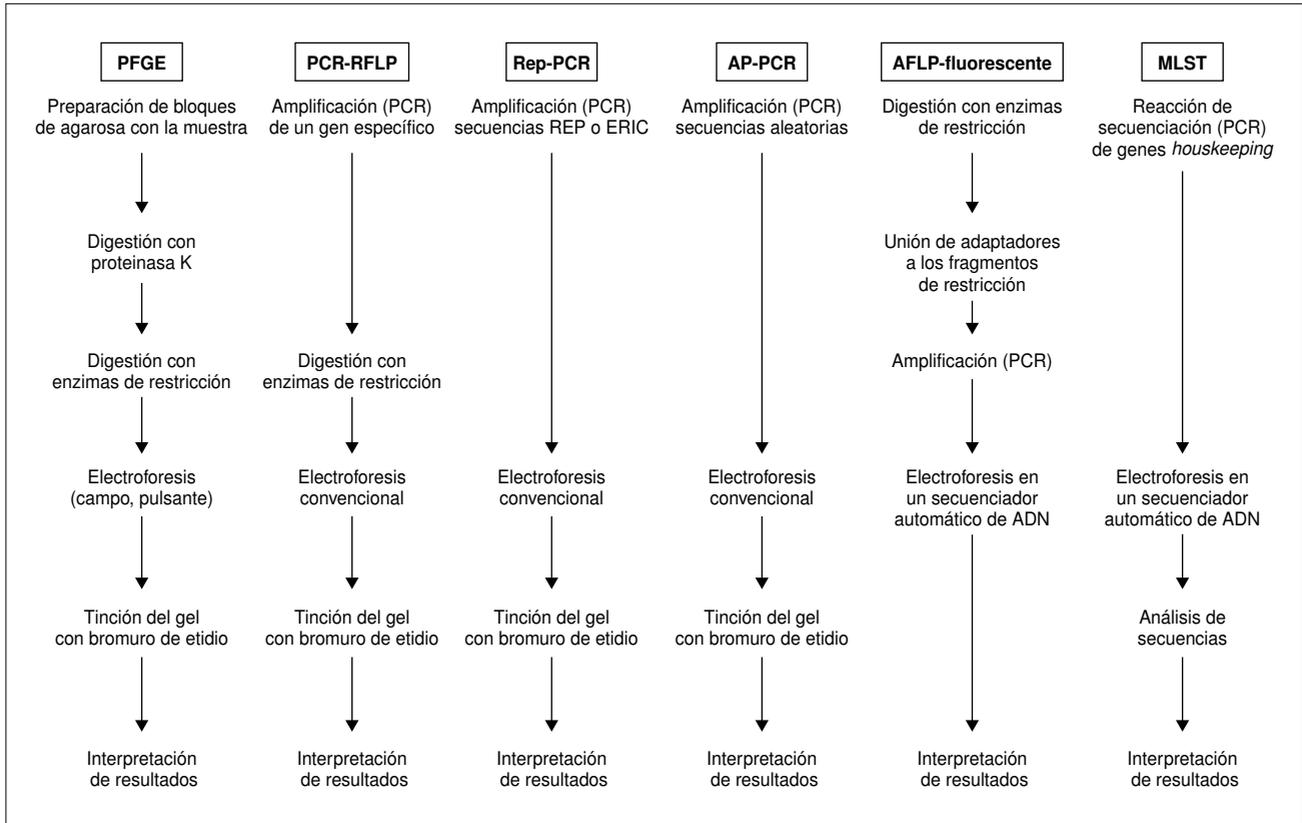


Figura 1. Representación esquematizada de los pasos más importantes de varias técnicas de tipificación mediante PCR. (Adaptada de Olive y Bean².)

repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias grampositivas y hongos¹³. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN.

Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias rep que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos^{8,14-16}.

La técnica de REP-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo coste, una vez que se dispone de un termociclador. Los patrones de bandas suelen ser sencillos, como en *A. baumannii*, aunque en otros microorganismos, como *Escherichia coli*, la interpretación de los patrones es algo más dificultosa (fig. 2) debido a la proximidad que existe entre algunas bandas y al mayor número de bandas. Esta técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferiores a los de la PFGE, aunque para algunas bacterias, como *A. baumannii*, se ha visto que la REP-PCR presenta un poder de discriminación similar al de la PFGE y superior al de la AP-PCR⁹. Estudios realizados por Tenover et al¹⁷, y Van Belkum⁵ indican que la rep-PCR es tan discriminatoria como la AP-PCR y el PFGE para tipificar *S. aureus*. El poder de discriminación

de la rep-PCR puede incrementarse con la utilización de cebadores fluorescentes¹⁸, aunque esto encarece bastante la técnica debido a que se necesita un secuenciador automatizado de ADN para analizar los patrones de bandas de ADN.

La amplificación de secuencias ERIC mediante PCR (ERIC-PCR) es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gramnegativas, como *A. baumannii*¹⁶. Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR.

La PCR-ribotipia se basa en la amplificación de las regiones espaciadoras que separan los genes ribosomales 16S y 23S^{2,3}. Esta técnica es reproducible aunque posee un poder de discriminación bajo, que puede incrementarse con la utilización de enzimas de restricción. En el estudio realizado por Vila et al⁸ se ha observado que el análisis de los patrones de restricción de los amplificados de los genes ribosomales (ARDRA) y/o las regiones espaciadoras que separan los genes ribosomales 16S y 23S es una técnica con un poder de discriminación bastante inferior a la de la AP-PCR, la ERIC-PCR y el PFGE.

La técnica de PCR-RFLP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas^{2,3}. Con esta técnica se estudia una región muy limitada del genoma (p. ej., gen *coa* que codifica para la coagulasa o el gen *spa* que codifica para la proteína A de *S. aureus* resistente a meticilina)¹⁹, por lo que su poder de discriminación y reproducibilidad suelen ser algo inferiores al de los métodos de

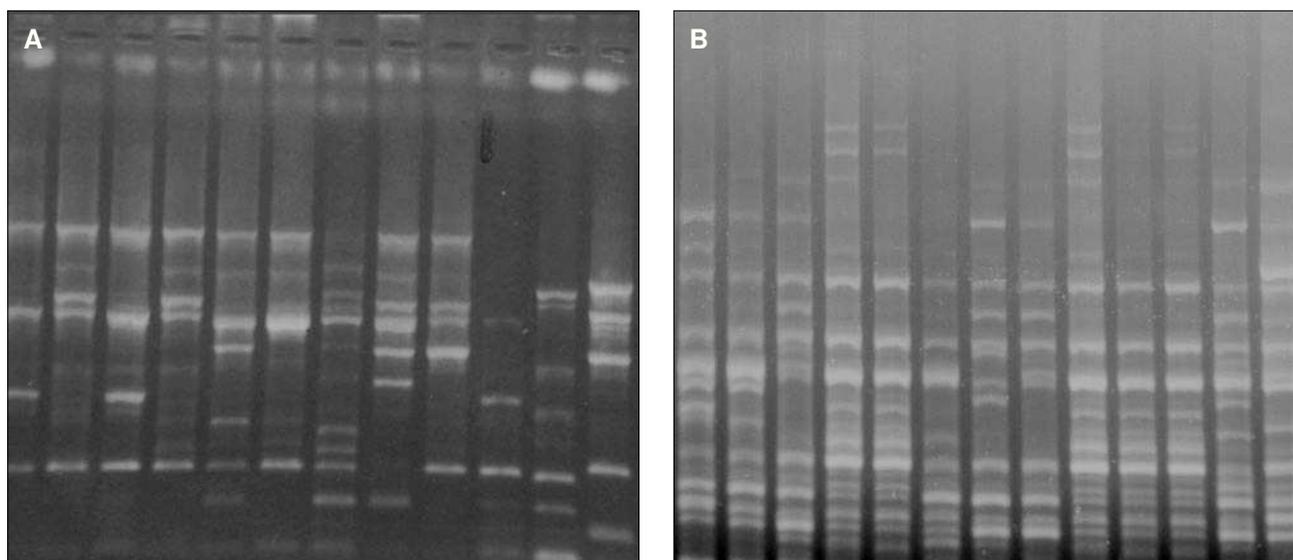


Figura 2. Patrones de REP-PCR obtenidos con cepas clínicas de A) *Acinetobacter baumannii* (imagen cedida por Germán Bou), y B) *Escherichia coli* (datos personales).

tipificación citados anteriormente. En general, el poder de discriminación de esta técnica depende de una serie de factores como la especie del microorganismo, el gen analizado y el tipo de enzima de restricción. El poder de discriminación de la técnica de PCR-RFLP es inferior al de la PFGE aunque puede incrementarse utilizando varias enzimas de restricción. La principal ventaja de la PCR-RFLP radica en la rapidez y simplicidad de la técnica, que permite la obtención de resultados en una sola jornada, y la reproducibilidad de los patrones de restricción.

El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se fundamenta en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción (generados a partir de ADN cromosómico) a los que previamente se les ha unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos²⁰⁻²³. Existen variaciones metodológicas del AFLP, dependiendo del número de cebadores (normalmente se utilizan 1 o 2), del tipo de marcaje de los cebadores (radiactivo o fluorescente) y del número de enzimas de restricción utilizadas (1 o 2). Los protocolos de AFLP más utilizados suelen emplear 2 enzimas de restricción y cebadores fluorescentes. Las ventajas más interesantes de este método son su elevada sensibilidad y su excelente poder de discriminación. La técnica de AFLP suele ser menos discriminativa que el PFGE, aunque para algunos microorganismos, como *Enterococcus faecium*, se ha observado que el poder de discriminación de ambos métodos son muy similares²³. En cepas de *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*, se ha observado que el AFLP es mucho más discriminativo que la PFGE²⁴.

Entre los principales inconvenientes de esta técnica hay que destacar su laboriosidad, el elevado coste del equipo (se requiere un secuenciador automatizado de ADN), la obtención de patrones de bandas complejos (entre 30 y 50 fragmentos de distinto tamaño) y el análisis de los mismos con un *software* adecuado. Todo esto hace que el AFLP se utilice fundamentalmente en centros de referencia.

En los últimos años se ha desarrollado una técnica de tipificación (MLST) basada en la amplificación y secuenciamiento de genes denominados *housekeeping*, genes ribosomales y/o genes relacionados con factores de virulencia²⁵.

Esta técnica es laboriosa y requiere un equipo costoso y personal con experiencia, por lo que hoy día se utiliza en centros especializados o laboratorios de referencia.

En resumen, hoy día disponemos de algunas técnicas de tipificación basadas en la PCR que pueden utilizarse como método preliminar para el estudio de la relación clonal entre microorganismos de una misma especie. La elección de la técnica más adecuada depende de muchos factores, de los que los más importantes son los de tipo técnico (técnica rápida, poco laboriosa, fácil de interpretar y con un elevado poder de discriminación y reproducibilidad) y económico (bajo coste).

Bibliografía

- Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993;17:153-64.
- Olive DM, Bean P. Principles and Applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1661-9.
- Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:174-8.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7213-8.
- Van Belkum A, Kluytmans J, Van Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E, et al. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1995;33:1537-47.
- Gori A, Espinasse F, Deplano A, Nonhoff C, Nicolas MH, Struelens MJ. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1996;34:2448-53.
- Kersulyte D, Struelens MJ, Deplano A, Berg DE. Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from Cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:2216-9.
- Vila J, Marcos MA, Jiménez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Med Microbiol* 1996;44:482-9.
- Skibsted U, Baggesen DL, Dessau R, Lisby G. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and phage-typing in the analysis of a hospital outbreak of *Salmonella enteritidis*. *J Hosp Infect* 1998;38:207-16.

10. Jonas D, Meyer HGW, Matthes P, Hartung D, Jahn B, Daschner FD, et al. Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. *J Clin Microbiol* 2000;38:2284-91.
11. Lasker BA. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 2002;40:2886-92.
12. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting the reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 1997;35:339-46.
13. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to DNA fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;19:6823-31.
14. Woods CR Jr, Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:2921-9.
15. Deplano A, Schuermans A, Van Eldere J, Witte W, Meugnier H, Etienne J, et al. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive element PCR analysis. *J Clin Microbiol* 2000;38:3527-33.
16. Gräser Y, Clare I, Halle E, Gantenberg R, Buchholz P, Jacobi HD, et al. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1993;31:2417-20.
17. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;33:407-15.
18. Del Vecchio VG, Petroziello J, Gress MJ, McCleskey F, Melcher GP, Crouch HK, et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via Fluorophore-Enhanced Repetitive-Sequence PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:2141-4.
19. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 2002;40:2119-25.
20. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijns M, Van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4407-14.
21. Savelkoul PHM, Arts HJM, De Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol* 1999;37:3083-91.
22. Koeleman JGM, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2522-9.
23. Antonishyn NA, McDonald RR, Chan EL, Horsman G, Woodmansee CE, Falk PS, et al. Evaluation of fluorescence-based amplified fragment length polymorphism analysis for molecular typing in hospital epidemiology: comparison with pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4058-65.
24. Desai M, Threlfall EJ, Stanley J. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism subtyping of the *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* phage type 4 clone complex. *J Clin Microbiol* 2001;39:201-6.
25. Vázquez AJ, Berrón S. *Multilocus sequence typing*: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:113-20.

NOTA

Los artículos publicados en la sección "Formación Médica Continuada" forman parte de grupos temáticos específicos (antibiograma, antimicrobianos, etc.). Una vez finalizada la publicación de cada tema, se irán presentando al Sistema Español de Acreditación de la Formación Médica Continuada (SEAFORMEC) para la obtención de créditos.

Una vez concedida la acreditación, ésta se anunciará oportunamente en la revista y se abrirá un período de inscripción gratuito durante 3 meses para los socios de la SEIMC y suscriptores de la Revista, al cabo del cual se iniciará la evaluación, durante 1 mes, que se realizará a través de la web de Ediciones Doyma.

ANEXO 1. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas

1. Las técnicas de PCR son muy útiles para:

- a) Diferenciar entre infección y recidiva.
- b) Determinar cómo se produce la diseminación de cepas multirresistentes durante un brote epidémico.
- c) Estudiar la resistencia a los antimicrobianos.
- d) Identificación de reservorios y portadores de clones multirresistentes.
- e) Todas las anteriores.

2. De los siguientes procesos, ¿cuál se utiliza en la técnica de rep-PCR?

- a) Digestión de ADN con enzimas de restricción.
- b) Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR.
- c) Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radiactivas.
- d) Secuenciación de fragmentos de ADN.
- e) Electroforesis en campo pulsante.

3. La reproducibilidad de la técnica de AP-PCR se afecta por:

- a) Concentración de ADN molde.
- b) Temperatura de anillamiento de los cebadores.
- c) Tipo de termociclador.
- d) Tipo y número de cebadores.
- e) Todas las anteriores.

4. De los siguientes métodos de tipificación, ¿cuál no está basado en la PCR?

- a) PCR-RFLP.
- b) AFLP.
- c) MLST.
- d) PFGE.
- e) Espoligotipado.

5. ¿Cuál de las siguientes características es deseable que tenga un sistema de tipificación basado en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR?

- a) Tipabilidad.
- b) Elevado poder de discriminación y reproducibilidad.
- c) Poca laboriosidad.
- d) Fácil interpretación de resultados.
- e) Todas las anteriores.

6. La limitación más importante de la AP-PCR se relacionan con:

- a) Baja reproducibilidad.
- b) Laboriosidad.
- c) Poder de discriminación.
- d) Análisis de patrones o perfiles de bandas de ADN.
- e) Coste económico.

7. Indicar la respuesta verdadera respecto a la técnica de AFLP:

- a) Baja reproducibilidad.
- b) Utiliza adaptadores que se unen a los fragmentos de restricción.
- c) Menor poder de discriminación que la AP-PCR.
- d) Más barata que la rep-PCR y la PCR-RFLP.
- e) Elevada complejidad.

8. La ventajas más interesante de las técnicas de tipificación mediante PCR se relacionan con:

- a) Baja sensibilidad.
- b) No presentan problemas de inhibición de la PCR.
- c) Reproducibilidad superior a la del PFGE.
- d) Facilidad en la interpretación de los resultados.
- e) No necesitan estandarización.

9. Una limitación importante de las técnicas de tipificación basadas en la técnica de PCR es:

- a) Se necesitan más de 5 días para obtener resultados.
- b) Poseen menor poder de discriminación que el PFGE para diferenciar entre cepas relacionadas clonalmente.
- c) Permiten trabajar con un número reducido de muestras.
- d) Su complejidad técnica.
- e) Pueden tener problemas de reproducibilidad.

10. Señalar la respuesta verdadera. La tipificación de microorganismos mediante PCR-RFLP:

- a) Es compleja desde el punto de vista técnico.
- b) Posee mayor poder de discriminación que el PFGE.
- c) Se basa en la amplificación y restricción enzimática de genes polimórficos.
- d) Es muy poco reproducible.
- e) Se basa en la amplificación y secuenciación de ADN.