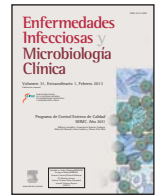




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección

Felipe Fernández Cuenca*, Lorena López Cerero y Álvaro Pascual Hernández

Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, Sevilla, España
Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

RESUMEN

Palabras clave:
Tipificación molecular
Brote
Clon
Epidemiología
Vigilancia
Control

Las técnicas de tipificación molecular son útiles en la vigilancia y control de brotes porque permiten conocer la clonalidad entre aislados, identificar reservorios y determinar vías de transmisión. La electroforesis en campo pulsado (ECP) es la técnica de referencia de tipificación debido a que tiene un elevado poder de discriminación. Entre las limitaciones más importantes de la ECP están el elevado coste del equipo, su laboriosidad y el tiempo necesario para analizar los pulsotipos. Aunque hay numerosas técnicas de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la más utilizada es la PCR de secuencias de ADN repetidas (REP-PCR). Estas técnicas son más económicas, menos laboriosas (algunas son semiautomatizadas y están comercializadas, como el Diversilab de bioMérieux), y suelen generar patrones de bandas relativamente más fáciles de interpretar que la ECP. El poder de discriminación de las técnicas de PCR puede ser inferior o similar al de la ECP. Tanto la ECP como las técnicas de PCR tienen que optimizarse o estandarizarse en el laboratorio para garantizar una buena reproducibilidad. Para el estudio de brotes pequeños y de corta evolución, en los que interesa obtener una información con rapidez, es preferible utilizar una técnica de PCR. En brotes más complejos y de mayor duración, en los que interesa conocer además la evolución o dinámica de los clones con el tiempo, es más rentable utilizar la ECP. Los métodos de tipificación basados en la secuenciación del ADN, como el MLST, se utilizan para estudios epidemiológicos globales o para analizar la estructura poblacional de los microorganismos.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Molecular typing methods for infection monitoring and control

ABSTRACT

Keywords:
Molecular typing
Outbreak
Clone
Epidemiology
Surveillance
Control

Molecular typing methods are useful in the surveillance and control of nosocomial outbreaks because they can provide information on the clonal relatedness among isolates, identify reservoirs, and determine routes of transmission. The gold standard assay for molecular typing is pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) due to its high discriminatory power. Some major disadvantages of PFGE include the high cost of the equipment, its labor intensiveness (the technique is not automated) and the time required to analyze the profiles of DNA bands (pulsotypes). Although there are many molecular typing methods based on polymerase-chain reaction (PCR), the most widely used is repetitive sequence-based PCR (REP-PCR). Most of the PCR techniques used for molecular typing have none of the limitations of PFGE as they are less expensive and labor intensive (some, such as bioMérieux's Diversilab system, are commercially available) and generate DNA profiles that are easier to interpret, depending on the microorganism. The discriminatory power of PCR is generally lower than or similar to that of PFGE. Both PFGE and PCR require optimal laboratory standardization to guarantee good reproducibility. PCR methods are preferable in the study of small, time-limited outbreaks. In more complex outbreaks of longer duration, in which clonal evolution and dynamics are studied, the use of PFGE is preferable. Molecular typing methods based on DNA sequencing, such as multilocus sequence typing, are applicable in global epidemiological studies or in analyses of the population structure of microorganisms.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.
Correo electrónico: felipefc@us.es (F. Fernández Cuenca).

Introducción

Las enfermedades infecciosas se han convertido en un serio problema de salud pública. Las infecciones nosocomiales adquieren especial relevancia en el campo de las enfermedades infecciosas por la elevada morbilidad y mortalidad añadida que ocasionan, y por el gasto económico que implican, además del impacto social que originan. El ambiente hospitalario constituye un ecosistema favorable para la producción de brotes. Aunque los brotes nosocomiales pueden estar causados por algunos hongos (*Aspergillus* spp.)¹, virus (p. ej., adenovirus², norovirus³) y parásitos (p. ej., *Plasmodium malarie*)⁴, son los de etiología bacteriana los que presentan mayor interés desde el punto de vista epidemiológico. Son especialmente trascendentales los brotes causados por cepas de *Klebsiella* spp. productora de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE)⁵, bacterias productoras de carbapenemasas (enterobacterias^{6,7}, *Acinetobacter baumannii*⁸, *Pseudomonas aeruginosa*⁹), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)¹⁰, *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina¹¹, *Staphylococcus* resistentes a linezolid¹², *Clostridium difficile*¹³, etc. Algunas cepas bacterianas de estas especies se caracterizan por presentar un alto potencial de transmisibilidad (clones epidémicos) y una elevada capacidad para adquirir multiresistencia a los antimicrobianos. Sin embargo, si bien las infecciones por bacterias multiresistentes se asocian especialmente al ambiente hospitalario, en los últimos años se ha observado un aumento de infecciones por bacterias multiresistentes en la comunidad, entre las que destacan las producidas por *Escherichia coli* productora de BLEE¹⁴ o SARM¹⁵.

El laboratorio de microbiología tiene que participar de forma activa en la comisión de infecciones y política de antibióticos de los centros hospitalarios en los equipos de control de infección nosocomial¹⁶. Entre las actividades de los laboratorios de microbiología destaca la tipificación o tipado molecular, que ofrece una información muy útil en la investigación de brotes, tanto en la fase de detección como en la de contención y resolución¹⁷⁻¹⁹. La detección de un brote se basa, de forma tradicional, en la acumulación de casos en un corto período. Sin embargo, disponer de una base de perfiles fenotípicos o genéticos de un determinado microorganismo nos permite detectar episodios "ocultos" de transmisión en el hospital, que no siempre se reflejan en un aumento llamativo de casos. Este aspecto es especialmente interesante en los centros con escasas fluctuaciones en la frecuencia de patógenos nosocomiales, en las actividades de control y en la comprensión de las dinámicas de introducción y sustitución de clones. Por otra parte, la posibilidad de discriminar entre pacientes relacionados con un brote de los que no lo están supone uno de los pasos más importantes para el abordaje de un brote, establecer su dimensión y estudiar las características epidemiológicas de los implicados. Por último, permite relacionar o confirmar la existencia de reservorios o vehículos de transmisión. La información que proporcionan las técnicas de tipado, si se adecúa la técnica al problema planteado y se proporciona en un tiempo corto, permite diseñar medidas de actuación apropiadas. Por lo tanto tenemos que dejar de considerar las técnicas de tipificación molecular como una herramienta exclusivamente dirigida a evaluar de manera retrospectiva brotes nosocomiales de infección. Su uso razonable en "tiempo real" permite la toma de decisiones en el contexto del equipo de control de infección nosocomial, que evita la aparición o diseminación de brotes nosocomiales o mejora su control. Además, nos permite estudiar la epidemiología de clones multiresistentes en nuestros centros hospitalarios.

Tipificación molecular

Las técnicas de tipificación se han clasificado tradicionalmente en fenotípicas (basadas en características bioquímicas o fisiológicas de los microorganismos) y genotípicas o moleculares (basadas en el estudio del ADN)¹⁷⁻¹⁹.

Las técnicas de tipificación fenotípicas se usan cada vez con menor frecuencia en la investigación de brotes por los problemas de baja reproducibilidad y poder de discriminación que tienen. No obstante, algunas técnicas fenotípicas, como el perfil de resistencia antimicrobiana o antibiograma, pueden ser muy útiles en algunas situaciones, como sucede por ejemplo cuando el laboratorio de microbiología detecta un nuevo fenotipo de resistencia, diferente del habitual, que incrementa su aparición, sobre todo en algunas áreas hospitalarias concretas.

Las técnicas moleculares de tipificación se diferencian de las técnicas fenotípicas porque pueden aplicarse a un mayor número de especies microbianas, tienen mayor poder de tipificación, son más reproducibles y tienen mayor poder de discriminación. El interés de estas técnicas radica en su capacidad para establecer la relación genética (clonalidad) que existe entre aislados implicados en un brote, además de ser herramientas muy útiles para confirmar la fuente de infección o reservorio.

En los últimos 25 años se ha producido un extraordinario avance en el desarrollo y aplicación de técnicas de tipificación molecular en la investigación de brotes¹⁷⁻²⁰. Los métodos moleculares de tipificación pueden utilizar como diana tanto ADN cromosómico como ADN de elementos genéticos móviles de transmisión horizontal (plásmidos, transposones, integrones y secuencias de inserción). Se pueden clasificar en 3 grandes grupos de técnicas: a) las basadas en el estudio de los perfiles de restricción del ADN (plasmídico o cromosómico); b) las que se fundamentan en la amplificación de secuencias de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y c) las basadas en la secuenciación parcial de genes.

Métodos basados en la restricción del ADN

Estudio de los perfiles de ADN plasmídico. El estudio de los perfiles de plásmidos es una técnica relativamente sencilla de realizar y de interpretar. Se requiere una extracción de los plásmidos, generalmente mediante una lisis celular, que posteriormente son separados mediante electroforesis en gel de agarosa. El análisis de los perfiles de plásmidos se realiza considerando el número de bandas de ADN plasmídico y sus respectivos tamaños. Este método de tipificación se ha aplicado con relativa frecuencia al estudio de brotes causados por enterobacterias como *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp.²¹, aunque actualmente esta metodología se limita al estudio de brotes pequeños, y siempre de forma conjunta o complementaria a otras técnicas basadas en el estudio de ADN cromosómico. Su bajo poder de discriminación se ha relacionado con problemas metodológicos, como puede ocurrir con la extracción de algunos plásmidos de gran tamaño (megaplásmidos) que resultan difíciles de separar mediante electroforesis convencional, y de interpretación de resultados. Una alternativa para aumentar el poder de discriminación de esta técnica consiste en digerir los extractos plasmídicos con varias enzimas de restricción (perfil de restricción plasmídica).

Aunque los perfiles plasmídicos suelen ser simples (no suelen presentar demasiadas bandas), pueden estar sujetos a cierta variabilidad que complica su interpretación. Los plásmidos pueden presentar diferentes conformaciones dependiendo del grado de superenrollamiento. Por esta razón, un mismo plásmido puede presentar diferentes patrones de movilidad electroforética, que nos pueden hacer pensar que se tratan o que corresponden a plásmidos diferentes. Otra consideración importante es que plásmidos con diferente secuencia de ADN pueden presentar el mismo perfil de movilidad electroforética, ya que pueden tener tamaños muy similares que no se diferencian en electroforesis convencional. Aislados de un mismo clon pueden tener distinto contenido en plásmidos debido a que estos elementos genéticos son móviles y pueden integrarse en el cromosoma, transferirse a otras cepas bacterianas, o recombinar con otros plásmidos de la misma o diferente especie en el transcurso del mismo brote. Además, un mismo plásmido en diferentes aislados

puede estar sujeto o distintos procesos de pérdida de ADN, como deleciones, o ganancia de otros elementos genéticos móviles, como transposones, integrones y secuencias de inserción.

Estudio de los perfiles de restricción de ADN cromosómico. Esta metodología se basa en la digestión del ADN cromosómico con una enzima de restricción, generándose un número variable de fragmentos de diferente tamaño que se separan en geles de agarosa mediante electroforesis convencional (RFLP) o electroforesis en campo pulsado o pulsátil (ECP). La diferencia fundamental es el número de fragmentos que genera cada tipo de restricción: enzimas de corte frecuente (RFLP) o poco frecuente (ECP).

En la técnica de RFLP, los productos de la digestión (0,5 y 25 kb) pueden visualizarse con bromuro de etidio, cuando el número de fragmentos no es muy numeroso, o mediante la hibridación con sonda (marcaje químico o radioactivo) de una determinada secuencia de la que hay varias copias en el cromosoma, lo que incrementa la capacidad de discriminación y de interpretación de la técnica de RFLP.

La técnica de RFLP-IS6110 se consideró, durante mucho tiempo, el método de referencia de tipado de *Mycobacterium tuberculosis*²². El ADN cromosómico se digiere con el enzima de restricción *PvuII* y los fragmentos se separan mediante electroforesis. La detección de los fragmentos se realiza por hibridación de una sonda de ADN que reconoce a la secuencia de inserción IS6110.

El ribotipado es otra variante de RFLP basada en el análisis de los genes del ARN ribosomal. Los perfiles obtenidos (ribotipos o ribogrupos) se diferencian por el número y la localización de estos genes. La técnica de ribotipado es larga y tediosa (en unos 2 días se pueden obtener resultados), aunque esta limitación puede resolverse con la utilización de sistemas automatizados, como el RiboPrinter (Qualicon Inc. Wilmington, DE). Su poder de discriminación suele ser inferior al de la ECP y al de los métodos de tipificación basados en la PCR.

Para separar fragmentos de mayor tamaño (hasta 1.000 kb) es preferible utilizar la ECP. Esta técnica ha mostrado ser altamente reproducible y con un poder de discriminación elevado, por lo que se ha convertido en el método de referencia de tipificación para la mayoría de las bacterias con interés epidemiológico²³. La ECP se basa en la separación electroforética en campo pulsado del ADN cromosómico digerido con una enzima de restricción con baja frecuencia de corte. Los perfiles de ADN (pulsotipos) presentan entre 10 y 30 fragmentos de ADN con un tamaño variable, que oscila entre 10 y 800 kb. La interpretación de los pulsotipos se realiza aplicando los criterios de Tenover et al, y suele ser relativamente fácil cuando se trabaja con unas pocas cepas. Cuando el número de cepas es elevado o los perfiles de bandas son complejos es conveniente recurrir a la utilización de un *software* específico, como por ejemplo BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) o GelCompar (Applied Maths). Estos programas permiten normalizar las condiciones de migración de los perfiles electroforéticos entre experimentos diferentes, por lo que se pueden almacenar los perfiles electroforéticos en bases de datos. Disponer de un histórico de aislados del centro es lo que permite establecer conexiones que estaban "ocultas" si no conducían a un aumento inmediato del número de casos. Además, contienen un algoritmo para realizar estudios de filogenia que permiten establecer relaciones evolutivas o de parentesco entre los aislados, mediante la utilización de dendogramas.

Existe una serie de parámetros básicos de la ECP que deben definirse o determinarse en el laboratorio para asegurar una buena reproducibilidad^{24,25}. Los más importantes son la normalización del gel, el porcentaje de tolerancia en la posición de las bandas y punto de corte de similitud para definir los *clusters*. Otra limitación importante de la ECP es que solo existen protocolos de trabajo consensuados en algunas especies, como *S. aureus* (proyecto Harmony)²⁶, *E. coli* y *Salmonella* (Pulsenet)²⁴ o *A. baumannii*²⁵, y las bases de datos son locales, por lo que es difícil intercambiar información entre re-

giones geográficas alejadas. Los inconvenientes más destacados de la ECP son su relativo elevado coste económico inicial, excesiva laboriosidad (proceso no automatizado) y el tiempo necesario para obtener y analizar los resultados (una semana como mínimo), por lo que resulta una metodología poco práctica para introducirla en la rutina de un laboratorio convencional de microbiología clínica. Las ventajas consisten en que se pueden aplicar a un gran número de especies bacterianas, se puede almacenar los perfiles, al menos de forma local y, sobre todo, su alto nivel de discriminación, ya que analizan una gran parte del cromosoma bacteriano. Esta capacidad de detectar pequeñas variaciones entre los aislados le confiere características idóneas para el estudio de brotes a nivel local.

Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos

Estas técnicas analizan una pequeña porción del cromosoma. La amplificación se realiza mediante PCR utilizando como dianas genes o secuencias de ADN polimórficas que se encuentran distribuidas por el cromosoma¹⁷⁻²⁰. Tradicionalmente, los formatos utilizados para la separación y detección de los amplicones se han fundamentado en la electroforesis en gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio, aunque en los últimos años se han desarrollado otros formatos que ofrecen más ventajas o rentabilidad.

En comparación con la ECP, los métodos de PCR destacan por su menor laboriosidad o complejidad técnica, su flexibilidad (que le permite trabajar con un elevado número de muestras y con diferentes tipos de formatos de PCR), la rapidez en la obtención de los resultados (entre 24 y 48 h) y la sencillez para realizar la interpretación de los resultados, debido a que los perfiles obtenidos suelen ser menos complejos que los obtenidos mediante ECP²⁰ (fig. 1). Su poder de discriminación es razonablemente elevado, aunque puede ser similar o inferior al de la ECP, dependiendo del microorganismo y de la técnica de PCR utilizada^{17,20}.

Entre las limitaciones técnicas más importantes están la inhibición de la reacción de amplificación y la contaminación de las muestras. Respecto a la reproducibilidad, esta es variable dependiendo de las características del método de extracción del ADN y de los formatos de amplificación y detección. Para asegurar una buena reproducibilidad de la técnica se requiere que cada laboratorio optimice y estandarice los procesos de extracción, amplificación y detección. A pesar de que en los últimos años se ha llevado a cabo un esfuerzo en su estandarización, son técnicas que no suelen permitir la normalización entre experimentos, por lo que no son adecuadas para conservar un histórico de perfiles.

La PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR), también denominada RAPD (*random amplification polymorphic DNA*) o técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico, se caracteriza por utilizar un único cebador de unos 10 nucleótidos que hibrida aleatoriamente, en condiciones de baja temperatura (entre 36 y 45 °C), con regiones inespecíficas del cromosoma^{17,19,27}. Este método de tipificación es rápido, poco laborioso y permite realizar un análisis sencillo de los perfiles de bandas.

El problema o inconveniente más importante que puede encontrarse con la AP-PCR es su baja reproducibilidad, que limita su utilidad para el estudio de brotes. Los perfiles de bandas obtenidos mediante AP-PCR pueden alterarse o modificarse por diversos factores, como el método de extracción, la concentración de ADN molde, el tipo de Taq polimerasa, el tipo de termociclador y, sobre todo, la temperatura de hibridación y la concentración de iones magnesio¹⁷. Aunque el poder de discriminación de la AP-PCR es inferior al de la ECP, puede incrementarse mediante la inclusión de varios cebadores en reacciones independientes.

Otro método de tipificación molecular muy utilizado en los estudios de brotes es la rep-PCR^{17,19}. Esta técnica se fundamenta en la utilización de cebadores que hibridan de forma específica con unas secuencias de ADN repetitivas (secuencias rep), de función desconocida,

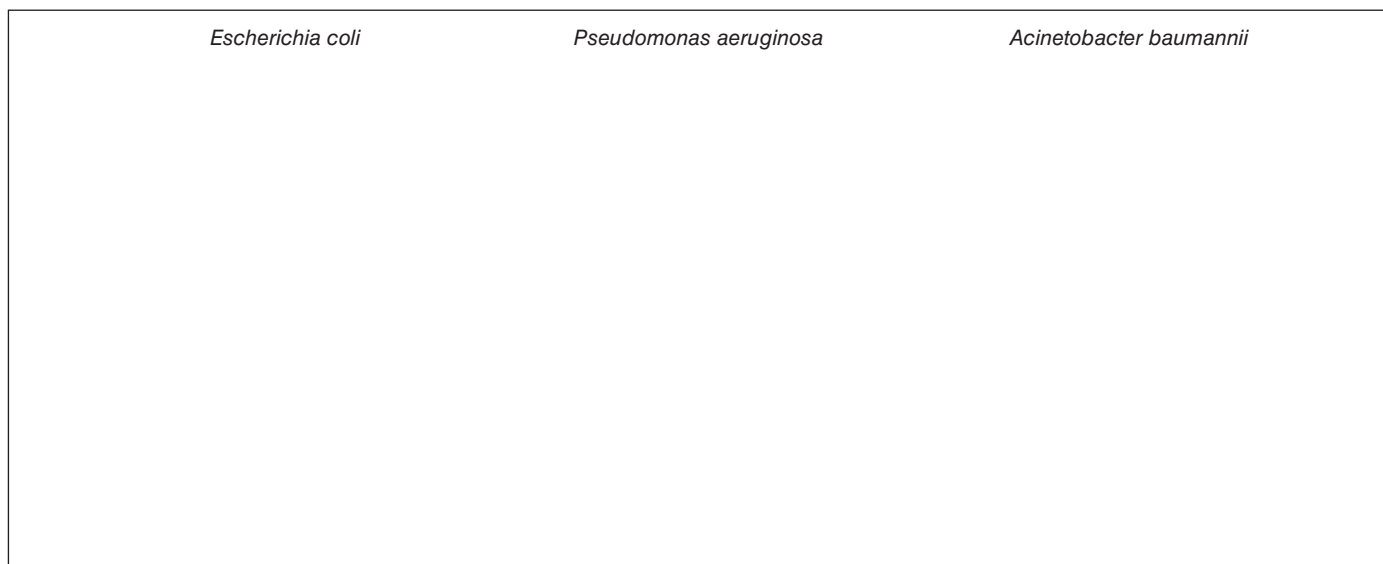


Figura 1. Patrones de bandas de ADN (pulsotipos) obtenidos mediante electroforesis en campo pulsado de ADN cromosómico de aislados clínicos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

que se encuentran dispersas por todo el genoma de muchas bacterias, hongos y parásitos. Hay 3 familias de secuencias repetitivas: las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP), las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC), y las secuencias o elementos BOX. Estas secuencias tienen una longitud variable, que oscila entre 35 y 40 pb (secuencias REP), 124 y 127 pb (secuencias ERIC) y 154 pb (secuencias BOX). De estas 3 secuencias de ADN, la más utilizada en el estudio de brotes son las secuencias REP. La variabilidad en los perfiles de bandas de ADN generados mediante REP-PCR viene determinada por el número de secuencias repetitivas y por la distancia que hay entre dichas secuencias (se amplifica la región de ADN que separa las secuencias REP). La técnica de REP-PCR es muy sencilla, rápida (menos de 2 días), reproducible (generalmente más que la AP-PCR pero menos que la ECP) y económica. Los perfiles de ADN presentan un número de bandas inferior al de los obtenidos mediante ECP, por lo que la definición de los perfiles y el análisis de la relación que existe entre ellos son relativamente sencillos (fig. 2). Los procesos de la REP-PCR, incluido el análisis e interpretación de los resultados, pueden automatizarse. El sistema Diversilab (bioMérieux, Francia) es un método flexible de REP-PCR porque permite estudiar perfiles de bandas de muchos microorganismos^{28,29}. Presenta una elevada reproducibilidad en comparación con la técnica manual, y permite una interpretación sencilla de los resultados debido a que el sistema incorpora un *software* específico que permite analizar perfiles y agruparlos en *clusters*. La implementación de estos sistemas en el laboratorio supone ahorro en tiempo y personal, pero tiene el inconveniente de su elevado coste económico.

Existen otras variantes metodológicas de tipificación molecular basadas en la PCR de secuencias repetidas específicas de las micobacterias del complejo de *M. tuberculosis*, como la técnica de espolitipado, basada en la amplificación de las regiones espaciadoras de las regiones DR (*direct repeat*) y la técnica MIRU-VNTR, basada en el estudio del polimorfismo del número de repeticiones de secuencias en tándem³⁰.

El estudio del polimorfismo en la longitud de los fragmentos obtenidos por digestión con enzimas de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) es una técnica de tipado que puede ser útil. Un tipo particular de técnica de PCR-RFLP es la PCR-ribotipia, basada en la amplificación de las regiones espaciadoras de genes ribosomales, como el 16S y el 23S^{17,19}. La técnica de PCR-RFLP posee un poder de discrimina-

ción variable que depende del gen estudiado y de la enzima de restricción. Su poder de discriminación, inferior al de la ECP, se incrementa con la utilización de varias enzimas de restricción. Las ventajas más destacables son su rapidez y la simplicidad de la técnica. La reproducibilidad y el poder de discriminación son aceptables, aunque inferiores a los de las técnicas descritas anteriormente. Para incrementar el poder de discriminación se pueden utilizar varias enzimas de restricción diferentes. El análisis de los perfiles es sencillo y el tiempo de obtención de resultados aceptable (menos de 48 h). La ribotipia es muy útil para el estudio de brotes en los que puedan estar implicadas cepas hipervirulentas de *C. difficile* con el ribotipo 027²⁸.

La técnica de amplificación basada en el estudio de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) no se suele utilizar en el estudio de pequeños brotes^{17,19,31}. Esta técnica se reserva para estudios epidemiológicos globales a largo plazo, en los que interesa conocer la estructura poblacional. El AFLP es una técnica cara y compleja desde el punto de vista técnico. El ADN genómico se digiere con 1 o 2 enzimas de restricción y a los fragmentos generados se les unen unos adaptadores que posteriormente hibridan, durante el proceso de amplificación, con unos cebadores específicos marcados normalmente con un producto fluorescente. La separación de los fragmentos se puede realizar en un secuenciador de ácidos nucleicos. En cuanto al poder de discriminación del AFLP este puede ser similar o superior al de la ECP, dependiendo del microorganismo.

Métodos basados en la secuenciación de ADN

De los métodos de tipificación basados en la secuenciación de ADN, con el que existe más experiencia es con el MLST (*multilocus sequencing typing*)^{17,19,32}. Esta técnica se fundamenta en la secuenciación parcial de 6 o 7 genes metabólicos muy conservados (*housekeeping genes*) que están sujetos a escasa presión selectiva, como ocurre con algunos genes relacionados con el metabolismo o con factores de virulencia y los genes ribosomales. Aunque es una técnica muy laboriosa y costosa tiene la ventaja de que los resultados obtenidos (secuencias tipo) son objetivables, se pueden almacenar en formato electrónico y se pueden intercambiar entre laboratorios muy distantes geográficamente, lo que permite poder comparar perfiles o secuencias tipo entre aislados de distintos países o continentes.

El MLST posee un poder discriminativo bajo. Al igual que sucede con la técnica de AFLP, el MLST no se suele utilizar para el estudio de

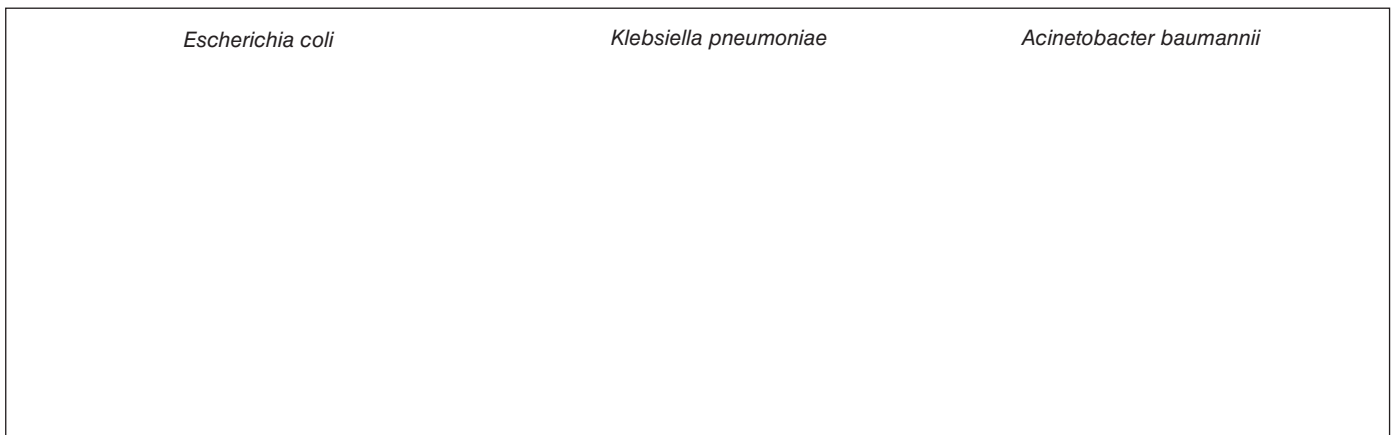


Figura 2. Patrones de bandas de ADN obtenidos mediante REP-PCR de ADN de aislados clínicos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*.

brotos de escasa magnitud, sino que se aplica principalmente en estudios epidemiológicos globales o a largo plazo, en los que se quiere conocer la estructura poblacional.

Criterios de selección de técnicas de tipificación molecular

Las técnicas de tipificación moleculares no deben utilizarse de forma sistemática ante la sospecha de un brote. En caso de que esté justificado el estudio epidemiológico molecular hay que tener en cuenta una serie de asunciones, no siempre ciertas, a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Los aislados implicados en el brote están epidemiológicamente relacionados y proceden de un mismo progenitor o clon, si están genéticamente relacionados. Por el contrario, los aislados que no estén relacionados epidemiológicamente tendrán genotipos diferentes.

Dada la gran diversidad de técnicas de tipificación molecular resulta difícil decidirse por la más idónea para estudiar un brote. En general se deben considerar tanto factores o criterios de tipo técnico como de tipo económico, intentando buscar siempre un equilibrio en términos de rentabilidad o de coste-eficacia que permita resolver un problema epidemiológico concreto.

Desde el punto de vista técnico, la tipificación tiene que cumplir estos 3 requisitos básicos: *a*) capacidad de tipificación (tipabilidad), determinada por su poder para clasificar o catalogar cualquier aislamiento en un tipo determinado de forma inambigua; *b*) poder discriminativo para establecer diferencias entre aislamientos no relacionados, y *c*) reproducibilidad o capacidad de ofrecer resultados reproducibles entre diferentes ensayos. Además es recomendable que la técnica sea sencilla de realizar, robusta, económica, rápida y que permita una interpretación fácil y objetiva de los resultados. Según el objetivo que se persiga, bien el análisis de un aumento de casos en un momento puntual o bien el estudio de la relación clonal entre aislados de una especie en un centro, es importante también considerar la posibilidad de poder establecer una base de datos de perfiles genéticos. La automatización del proceso de tipificación contribuye a la estandarización y la mejora de la reproducibilidad de la técnica. Los sistemas automatizados de tipificación molecular, como el sistema de rep-PCR Diversilab de bioMérieux, incorporan además un *software* que facilita el análisis de los perfiles y permite crear una base de datos con dichos perfiles.

El interrogante que posiblemente se plantea con mayor frecuencia a la hora de estudiar un brote es acerca del tipo de método molecular que debe utilizarse. En principio se podría utilizar un método rápido, como por ejemplo una rep-PCR, o un método algo menos rápido pero con mayor poder de discriminación, como ocurre con la ECP. Decidir por una u otra técnica dependerá de la disponibilidad de la infraestructura necesaria para realizar la REP-PCR o la ECP, del tipo

de información epidemiológica que se pretende obtener y de la rapidez con la que se quiere obtener dicha información y la realización del análisis de los resultados.

Cuando hay datos que hacen sospechar el inicio de un brote es importante obtener información epidemiológica preliminar de forma rápida y que sea fiable. En la investigación de cualquier brote es fundamental conocer el número de clones implicados (y la relación que hay entre ellos), identificar el origen o reservorio del brote y determinar las vías de transmisión. En las fases iniciales del brote es poco probable que se produzcan fenómenos de microevolución (diversificación génica) en un período tan corto. Bajo esta asunción es de esperar que no se produzcan cambios importantes en los perfiles de ADN, pudiendo descartar con cierta seguridad que perfiles idénticos o similares pertenezcan a clones distintos. Estaríamos ante un caso de epidemiología local o a corto plazo en el que interesa tomar medidas eficaces de prevención, vigilancia y control del brote. En este contexto, la REP-PCR puede ser una herramienta de tipificación adecuada para responder a las cuestiones planteadas.

Otra situación distinta es cuando además de la información requerida para controlar el brote, interesa saber la dinámica clonal en el tiempo; es decir, la relación que hay entre clones de brotes ocurridos en el pasado y clones más recientes. En esta situación es probable que ocurran fenómenos de diversificación o microevolución (p. ej., deriva genética), por lo que es preferible utilizar la ECP.

Finalmente, como se ha citado anteriormente para estudios epidemiológicos globales (multicéntricos o intercontinentales) en los que interesa obtener información relacionada con la estructura poblacional, se utilizan preferiblemente métodos de tipado más complejos y costosos, como el MLST o el AFLP, aunque la ECP podría tener utilidad en esta situación.

Agradecimientos

A Pilar Egea Miranda y Francisco Caballero Moyano por su ayuda en la edición de las imágenes.

Financiación

Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III. Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa" FEDER, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Guarro J, Solé M, Castany R, Cano J, Teixidó A, Pujol I, et al. Use of random amplified microsatellites to type isolates from an outbreak of nosocomial aspergillosis in a general medical ward. *Med Mycol.* 2005;43:365-71.
2. Hamada N, Gotoh K, Hara K, Iwahashi J, Imamura Y, Nakamura S, et al. Nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. *J Hosp Infect.* 2008;68:262-8.
3. Greig JD, Lee MB. A review of nosocomial norovirus outbreaks: infection control interventions found effective. *Epidemiol Infect.* 2012;140:1151-60.
4. Moro ML, Romi R, Severini C, Casadio GP, Sarta G, Tampieri G, et al. Patient-to-patient transmission of nosocomial malaria in Italy. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002;23:338-41.
5. Velasco C, Rodríguez-Baño J, García L, Díaz P, Lupión C, Durán L, et al. Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum beta-lactamase. *J Hosp Infect.* 2009;73:157-63.
6. Conejo MC, Domínguez MC, López-Cerero L, Serrano L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying bla_{IMP-8}, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1071-3.
7. Robustillo Rodela A, Díaz-Agero Pérez C, Sánchez Sagrado T, Ruiz-Garbajosa P, Pita López MJ, Monge V. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro Surveill.* 2012;17.
8. Rodríguez-Baño J, García L, Ramírez E, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Fernández-Cuenca F, et al. Long-term control of hospital-wide, endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive "bundle" approach. *Am J Infect Control.* 2009;37:715-22.
9. Peña C, Suárez C, Tubau F, Juan C, Moya B, Domínguez MA, et al. Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 β -Lactamase. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2381-7.
10. Rodríguez-Baño J, García L, Ramírez E, Lupión C, Muniain MA, Velasco C, et al. Long-term control of endemic hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the impact of targeted active surveillance for MRSA in patients and healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31:786-95.
11. Montesinos I, Campos S, Ramos MJ, Ruiz-Garbajosa P, Riverol D, Batista N, et al. Study of the first outbreak of vanA *Enterococcus faecium* in the Canary Islands. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:430-4.
12. Sánchez García M, De la Torre MA, Morales G, Peláez B, Tolón MJ, Domingo S, et al. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *JAMA.* 2010;303:2260-4.
13. Bustinza A, Solana MJ, Padilla B, López-Herce J, Santiago MJ, Marín M. Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease in a pediatric intensive care unit in Madrid. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30:199-201.
14. Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Ruíz M, Peña C, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis.* 2010;50:40-8.
15. Manzur A, De Gopegui ER, Domínguez M, Mariscal D, Gavaldá L, Pérez JL, et al. Clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in residents in community long-term-care facilities in Spain. *Epidemiol Infect.* 2012;140:400-6.
16. Fernández-Cuenca F, López-Cortés LE, Rodríguez-Baño J. The microbiology laboratory's contribution to the surveillance and control of outbreaks caused by nonfermentative Gram-negative bacilli. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Suppl 3:40-6.
17. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:512-30.
18. Blanc DS. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol.* 2004;4:193-7.
19. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol.* 2009;9:430-40.
20. Fernández-Cuenca F. Applications of PCR techniques for molecular epidemiology of infectious diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:355-60.
21. Threlfall EJ, Hampton MD, Chart H, Rowe B. Use of plasmid profile typing for surveillance of *Salmonella enteritidis* phage type 4 from humans, poultry and eggs. *Epidemiol Infect.* 1994;112:25-31.
22. Sougakoff W. Molecular epidemiology of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:800-5.
23. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010;10:866-75.
24. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV; CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:382-9.
25. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Van der Reijden T, Van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4328-35.
26. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, De Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1574-85.
27. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:7213-8.
28. Eckert C, Van Broeck J, Spigaglia P, Burghoffer B, Delmée M, Mastrantonio P, et al. Comparison of a commercially available repetitive-element PCR system (DiversiLab) with PCR ribotyping for typing of *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3352-4.
29. Decker BK, Pérez F, Hujer AM, Hujer KM, Hall GS, Jacobs MR, et al. Longitudinal analysis of the temporal evolution of *Acinetobacter baumannii* strains in Ohio, USA, by using rapid automated typing methods. *PLoS One.* 2012;7:e33443.
30. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:658-85.
31. Savelkoul PHM, Aarts 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.
32. Vázquez JA, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:113-20.
33. Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla (OXA-51-like) genes. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2476-83.