

Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de *Enterobacter cloacae* productores de β -lactamasas de espectro extendido

Natividad Castro-Alarcón,* Alberto Alonso-Morales,* Jesús Silva-Sánchez,** Adakatia Armenta-Solís***

RESUMEN

Enterobacter cloacae es un importante patógeno oportunista, causante de infección nosocomial, del cual el número de cepas multi-resistentes se ha incrementado en la última década. La electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE) para la detección de la clonalidad es considerada el estándar de oro, no obstante los métodos basados en PCR son más baratos, fáciles de realizar y proveen resultados rápidos. El objetivo fue validar los resultados obtenidos de la tipificación molecular de aislados de *E. cloacae* mediante dos variantes de la técnica de amplificación de secuencias repetidas (rep-PCR), comparándolos con los resultados de la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). Se analizaron 26 cepas, a las cuales se les realizó un tamiz para confirmar la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y sus respectivos puntos isoeléctricos (pIs). Las cepas fueron tipificadas por la PFGE utilizando la enzima *XbaI* y por rep-PCR utilizando iniciadores correspondientes a las secuencias REP y ERIC. Los aislados productores de BLEEs mostraron multi-resistencia, los pIs más frecuentes fueron de 5.4 (88.4%) y de 8.2 (76.9%). Epidemiológicamente todos los aislados fueron claramente discriminados por ambos métodos. Las variantes rep-PCR agruparon a los aislados en 18 grupos clonales y la PFGE en 20 grupos clonales. El poder de discriminación mostrado por las dos variantes rep-PCR fue de 0.97, mientras que el poder de discriminación para la PFGE fue de 0.98. La rep-PCR puede ser una herramienta molecular alternativa en el laboratorio de microbiología para una rápida tipificación de aislados de *E. cloacae* en la investigación de brotes.

ABSTRACT

Enterobacter cloacae is an important opportunistic pathogen known to cause nosocomial infection. Reports of multidrug-resistant isolates have increased during the last decade. An increasing number of clonal outbreaks caused by *Enterobacter cloacae* are being reported. For the detection of clonality, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is considered the golden standard, but PCR-based methods are cheaper, easier to performed, and provide faster results. The objective of this study was to validate the results from the molecular typing of *Enterobacter cloacae* isolates by two variants of amplification technique: repeated sequences (rep-PCR) compared with the results of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns. Twenty-six isolates were analyzed, which ones a screening was performed to confirm extended-spectrum β -lactamases (ESBL) producing, isoelectric points from β -lactamases were identified too. The strains were typing by PFGE using the enzyme *XbaI*, to perform the rep-PCR was used two sets of initiators related to REP and ERIC sequences. The ESBL isolates producer showed multidrug resistance, the most frequent isoelectric points were 5.4 (88.4%) and 8.2 (76.9%). Epidemiologically, all isolates were clearly discriminated by both methods. The isolates were grouped in 18 clonal groups through variants rep-PCR, whereas the PFGE grouped into 20 clonal groups. The power of discrimination showed for the two variants, rep-PCR was 0.97, while the power of discrimination for PFGE was 0.98. The rep-PCR is proposed as an alternative molecular tool in the microbiology laboratory for typing of *E. cloacae* clinical isolates in the investigating of outbreaks.

* Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero.

** Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública.

*** Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guerrero.

Correspondencia:

Dra. Adakatia Armenta-Solís. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. JF Ruiz-Massieu s/n, Hornos-Insurgentes, 39350 Acapulco, Guerrero, México. Fax. 744 4455921, E-mail: adakatia@prodigy.net.mx

Recibido: 22-10-2009

Aceptado: 26-11-2009

Palabras clave: *E. cloacae*, β -lactamasas, tipificación molecular, rep-PCR, PFGE.

Key words: *E. cloacae*, β -lactamases, molecular typing, rep-PCR, PFGE.

INTRODUCCIÓN

El empleo de técnicas moleculares para el estudio de la epidemiología de las enfermedades infecciosas permite determinar la relación clonal que existe entre diversas cepas aisladas de la misma especie. Conocer el origen clonal es útil, sobre todo cuando se presentan 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; así mismo, evaluar la eficiencia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y distinguir entre infección y recidiva.¹ Las técnicas moleculares que analizan propiedades o polimorfismos genéticos en bacterias, han ampliado notablemente el campo de la tipificación en microbiología. Los fundamentos de estas técnicas son variables: estudios de restricción de ADN cromosómico y extracromosómico, análisis del número de copias de determinada secuencia de inserción o repetitivas a lo largo del genoma o amplificación arbitraria de fragmentos genéticos.² Los sistemas de tipificación pueden caracterizarse en términos de tipabilidad (proporción de cepas que un marcador puede clasificar como perteneciente a un tipo determinado), reproducibilidad (capacidad de un marcador para clasificar a una cepa en el mismo tipo cuando se realizan varios ensayos independientes), poder de discriminación (probabilidad promedio de que el marcador utilizado clasifique en 2 tipos distintos a 2 cepas no relacionadas escogidas al azar de la población de un determinado taxón), fácil realización e interpretación y costos (en términos de tiempo y dinero).³

La electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) ha sido considerada, por su excelente poder de discriminación y alto nivel de reproducibilidad, el estándar de oro para la tipificación de la mayoría de las bacterias, hongos y parásitos de importancia clínica a nivel de subespecie; si bien la PFGE ha sido aplicada exitosamente en estudios genéticos y epidemiológicos de diferentes procariontes, es una técnica muy costosa y requiere de tiempo para la obtención de resultados.⁴ Como alternativa para la rápida obtención de huellas genómicas se han diseñado diferentes técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, como la rep-PCR. Esta técnica utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (secuencias rep) que

se encuentran distribuidas en el genoma de muchas enterobacterias, algunas bacterias Gram positivas y hongos. 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.⁵⁻⁷ 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 por bacterias Gram negativas. 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 costo.^{8,9}

Cada vez más, las infecciones adquiridas en los hospitales con patógenos multirresistentes representan un importante problema de salud. La resistencia a antimicrobianos está típicamente asociada con las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Dentro de esta familia, *Enterobacter cloacae* es la causa más frecuente de infecciones del tracto urinario, heridas quirúrgicas e incluso bacteriemias.¹⁰ Durante la última década se han reportado brotes causados por *E. cloacae* multirresistentes productoras de BLEE, las cuales han sido tipificadas utilizando la PFGE.¹¹⁻¹³ Así mismo, investigaciones previas han demostrado la utilidad de la rep-PCR como una herramienta útil para estudios de epidemiología molecular de bacterias Gram negativas;^{6,7} no obstante, no se han publicado estudios donde se comparen ambos métodos mostrando la aplicación de la rep-PCR como una metodología alternativa para la tipificación molecular de *E. cloacae*. El presente trabajo tuvo como objetivo validar los resultados obtenidos de la tipificación molecular de *E. cloacae* mediante las variantes REP-PCR y ERIC-PCR, comparándolas con los resultados obtenidos utilizando el estándar de oro: la PFGE. Debido a la facilidad de ejecución, rapidez, reproducibilidad y alto poder de discriminación la rep-PCR puede ser empleada como una herramienta molecular alternativa para la tipificación de brotes de *E. cloacae* multirresistentes en los diferentes hospitales del estado de Guerrero.

MÉTODOS

Cepas bacterianas y pruebas de susceptibilidad

Se analizaron 26 aislados de *E. cloacae* provenientes de pacientes hospitalizados en las diferentes áreas del Hospital General de Acapulco, recuperados durante el periodo comprendido de Enero 2004 a Agosto 2006. Los aislados fueron recuperados a partir de muestras de orina, sangre y secreción de heridas, e identificados por el sistema semiautomatizado API 20E (BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia). La determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos se llevó a cabo con la técnica de difusión en disco en agar Müller-Hinton y la detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante la prueba de doble disco combinado (DDCT), siguiendo en ambos casos las recomendaciones del CLSI.¹⁴ Los agentes antimicrobianos probados fueron: cefalotina, cefuroxima, cefpodoxima, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, ceftaxima, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloramfenicol y tetraciclina. Se incluyó el aislamiento de *E. sakazakii* como control externo inter-especie para la validación.

Determinación de puntos isoeléctricos de las β -lactamasas

Los extractos crudos de β -lactamasas se obtuvieron mediante ruptura con perlas de vidrio de una suspensión de bacterias en solución amortiguadora de fosfatos, los cuales se analizaron por isoelectroenfoque (IEF) sobre geles de poliacrilamida con rangos de pH 3-9, en el equipo PhastSystem (Pharmacia). Las β -lactamasas se detectaron por hidrólisis de nitrocefina (500 mg/mL). El valor del punto isoeléctrico (pI) se determinó comparándolo con valores conocidos de β -lactamasas 5.4 (TEM-1), 7.0 (SHV-3), 7.6 (SHV-2), 7.8 (SHV-4), 8.2 (SHV-5), 9.0 (CTX-M-1).¹⁵

Tipificación molecular por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

El ADN de cada cepa fue aislado dentro de discos de agarosa como se describió previamente.¹⁶ La macrorestricción fue realizada dentro de los discos de agarosa usando 45 μ L de solución amortiguadora de restricción con 15 unidades de la enzima *XbaI* (Invitrogen, Carisbad, California, EUA), se incubó a 30°C durante toda la noche. La separación de los fragmentos se realizó por electroforesis de campos

pulsados en un sistema de electroforesis CHEF Mapper II (BioRad, Hercules, EUA). Se utilizó un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en amortiguador TBE al 0.5X a un voltaje de 6 V/cm con pulsos de cambio de linealidad de 1 a 30 segundos a 14°C durante 23 horas.^{4,16} Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/mL) para posteriormente visualizarlos con luz UV.

Tipificación molecular por rep-PCR

La extracción del ADN total de cada cepa se llevó a cabo por el método de choque térmico. Las cepas se hicieron crecer en agar Luria-Bertoni toda la noche a 37°C. Después de la incubación dos o tres colonias fueron resuspendidas en 100 μ L de agua estéril en un tubo Eppendorf; para lisar las células, el tubo fue calentado por 10 minutos a 95°C, al término del calentamiento, el tubo fue incubado por 5 minutos en hielo. El ADN se obtuvo por centrifugación a 9.3 x g durante 10 minutos¹⁷ y se cuantificó en un biofotómetro (Eppendorf BioPhotometer, EUA). En la tipificación molecular por la técnica rep-PCR, se utilizaron dos pares de iniciadores que hibridan con las secuencias rep reportados previamente por Versalovic *et al.*, 1991: REP1 5' IIINCGNCGNCATCNGGC 3' y REP2 5' NCGNCTTATCNGGCCTAC 3' (para secuencias REP); ERIC1 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3' y ERIC2 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3' (secuencias ERIC). En un termociclador (Applied Biosystems 2400, Singapur) se amplificaron 100 ng de ADN en un volumen final de reacción de 25 μ L que contenía: solución amortiguadora de reacción 1X, cloruro de magnesio 1.5 mM, 200 μ M de cada dNTP, 2 mM de cada iniciador, dos unidades de Taq-ADN polimerasa recombinante (Invitrogen Carisbad, California, EUA), 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) para REP-PCR y 10% de DMSO para ERIC-PCR. La amplificación de la REP-PCR se realizó con un paso inicial de desnaturalización (94°C durante 7 minutos) y luego 35 ciclos de: desnaturalización (92°C durante 30 segundos), asociación (60°C durante 1 minuto) y extensión (70°C durante 3 minutos) seguidos por un paso de extensión final (70°C durante 8 minutos). Para la amplificación de la ERIC-PCR se realizó un paso inicial de desnaturalización (94°C durante 7 minutos), luego 35 ciclos de: desnaturalización (92°C durante 30 segundos), asociación (55°C durante 1 minuto) y extensión (70°C durante 3 minutos) seguidos por extensión final (70°C durante 8 minutos).^{6,9,17,18} Los productos amplificados se separaron electroforéticamente a 100 volts durante 75 minutos en geles de

agarosa al 2% con solución amortiguadora TAE 1X. Los geles fueron teñidos con solución de bromuro de etidio (1 µg/mL) durante 15 minutos y posteriormente fueron visualizados con luz UV.

Análisis de los perfiles electroforéticos

Los patrones de bandas generados por la PFGE, REP-PCR y ERIC-PCR fueron inspeccionados de manera visual y se generó una matriz de presencia/ausencia de bandas; el análisis de agrupación del patrón de bandas de la electroforesis se realizó con base al coeficiente de similitud de Dice. El coeficiente de similitud, el dendograma y la probabilidad se generaron con el software NTSYSpc versión 2.0 (Applied Biostatistics Inc. Setauket, EUA).

Criterio de evaluación

El poder de discriminación puede definirse como la probabilidad de que dos cepas escogidas al azar de una población de cepas no relacionadas sean distinguidas por el método de tipificación, por lo que el poder de discriminación puede ser calculado con la siguiente ecuación:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N - 1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

Donde S número de tipos, X_j es la frecuencia del j-ésimo tipo y N es el tamaño de la población.¹⁹

RESULTADOS

Todos los 26 aislados de *E. cloacae* analizados fueron productores de BLEE y la frecuencia de susceptibilidad a antimicrobianos se presentan a continuación: el 96.1% de los aislados fueron resistentes a cefalotina, cefuroxima, cefpodoxima y aztreonam, el 57.6% a cefotaxima, el 92.3% a ceftazidima, el 26.9% a cefepima e imipenem, 84.6% a cefoxitina, 61.5% a amikacina, el 80.7% a gentamicina, el 23% ciprofloxacina, el 73% a trimetoprim-sulfametoxazol, el 9.2 a cloramfenicol y el 46.1% a tetraciclina; todos los aislados fueron sensibles a meropenem. Los aislados de *E. cloacae* presentaron multiresistencia a los diversos antibióticos, mostrando resistencia a por lo menos a una cefalosporina de tercera generación.

Todas las cepas analizadas fueron tipificables por la PFGE, el promedio de bandas obtenidas al utilizar la enzima de restricción *XbaI* fue de 22; se observaron bandas con tamaños de entre 48 y 583 kb (Figura 1). El perfil de restricción fue analizado de manera visual y se generó una matriz con base en la presencia o ausencia de fragmentos, presente en el perfil de restricción de cada aislamiento. Tenover y cols. señalan que los aislados que tienen el mismo número de fragmentos con el mismo peso molecular son denominados como genéticamente idénticos, los aislados que difieren en dos a tres fragmentos son denominados como estrechamente relacionados y los aislados que difieren en más de siete fragmentos son denominados como sin relación alguna.²⁰ Entonces, tomando en cuenta estos criterios y un coeficiente de similitud de 0.85 derivado del dendograma, los

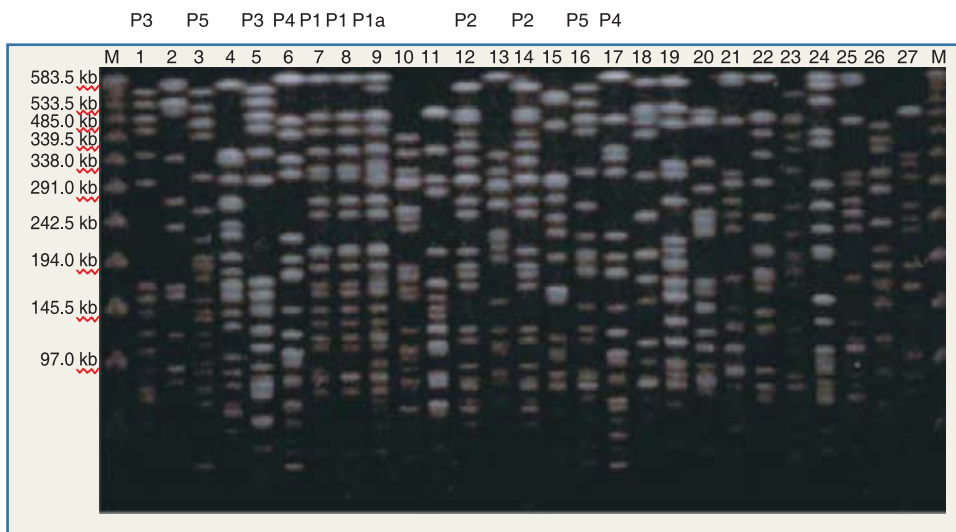


Figura 1. Patrón de restricción obtenido mediante la PFGE de los 26 aislados de *E. cloacae*. M: marcador de peso molecular, carril 1-26: *E. cloacae*, carril 27: *E. sakasakii* como especie no relacionada. En la parte superior aparecen los grupos clonales (P1 a P20) establecidos por el análisis visual.

aislados de *E. cloacae* fueron discriminados en 20 diferentes grupos clonales (P1-P20), cada uno de los patrones P2, P3, P4 y P5 agrupó dos aislados, el patrón P1 agrupó tres aislados, el resto de los patrones agrupó cada uno un aislamiento (*Figura 2*). Los aislados 636 y 642 correspondientes al patrón P2 fueron discriminados como genéticamente idénticos (el mismo número de bandas con el mismo peso molecular y un coeficiente de similitud del 100%). En cuanto al patrón P1, dos de los tres aislados fueron discriminados como genéticamente idénticos (579 y 597), pero el aislamiento 603 difirió en tres bandas, por lo que fue discriminado mediante esta técnica, como estrechamente relacionado y fue considerado como un subclon P1a (presentó un coeficiente de similitud del 87%). Los aislados correspondientes a los patrones P3, P4 y P5 fueron discriminados como estrechamente relacionados, difiriendo en un número de dos a tres bandas y un coeficiente de similitud mayor al 85%.

Al igual que en la técnica de PFGE, las 26 cepas de *E. cloacae* fueron tipificables por las dos variantes rep-PCR. La tipificación molecular mediante la variante REP-PCR mostró después de la separación electroforética, un número de entre 5 a 12 bandas, con tamaños de 250 pb a 2000 pb (*Figura 3, panel A*). El número de bandas observadas en la ERIC-PCR fue de entre 5 a 10 bandas, con tamaños de 300 pb a 1400 pb (*Figura 3, panel B*). Los perfiles de amplificación

de ambas variantes fueron igualmente analizados de manera visual y se generó una matriz, para posteriormente obtener el dendrograma. Los aislados se agruparon de acuerdo a los criterios de Tenover y se consideró un coeficiente de similitud superior de 0.92; este valor se definió mediante la comparación de las agrupaciones obtenidas con la PFGE, la técnica de referencia.

La REP-PCR al igual que la ERIC-PCR, agrupó a los 26 aislados en 18 diferentes grupos clonales (R1-R18 para la REP-PCR y E1-E18 para la ERIC-PCR); cada uno de los patrones R2/E2, R3/E3, R4/E4, R5/E5, R6/E6 y R7/E7 agrupó dos aislados, el patrón R1/E1 agrupó tres aislados y el resto de los patrones quedó conformado por un solo aislamiento (*Figura 4*). Los aislados agrupados por las dos variantes rep-PCR en los patrones R1/E1, R2/E2, R3/E3 y R4/E4 presentaron el mismo número de bandas con el mismo peso molecular y por lo tanto un coeficiente de similitud del 100%, por lo que fueron discriminados como genéticamente idénticos. Las dos variantes de la rep-PCR agruparon a dos patrones genéticos más, patrones que la PFGE discriminó como sin relación; estos patrones estuvieron conformados por los aislados 525837 y 1045 correspondientes al patrón R6/E6, y los aislados 1231 y 3246 correspondientes al patrón R7/E7, mostrando un coeficiente de similitud del 100%. El poder de discriminación derivado de la tipificación de los aislados de *E. cloacae* fue de 0.97 tan-

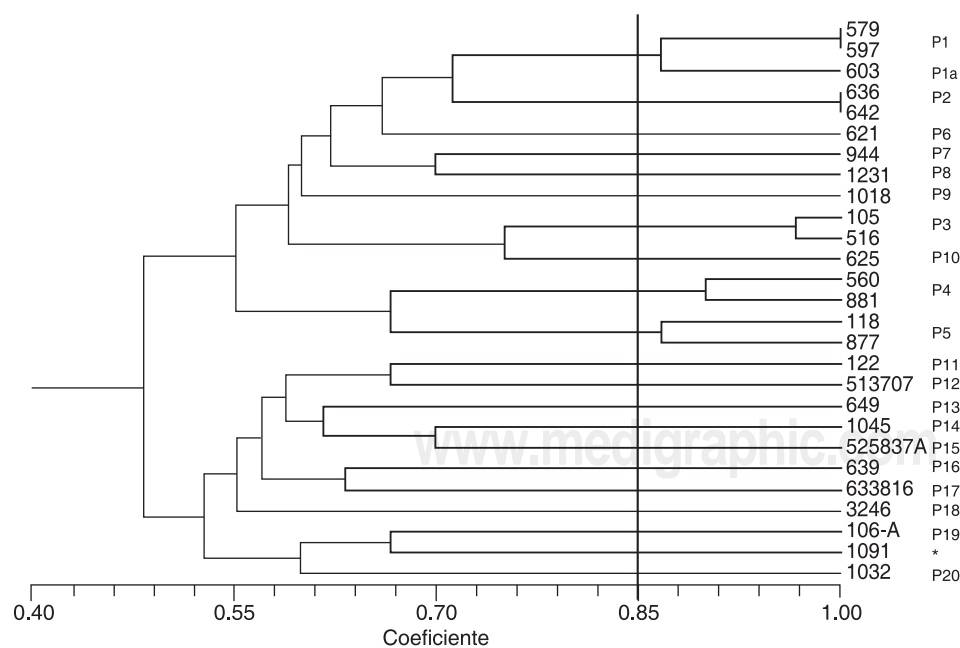


Figura 2. Dendrograma derivado del agrupamiento por UPGMA obtenido del perfil electroforético de PFGE. Los aislados estrechamente relacionados se agruparon con un coeficiente de similitud mayor de 0.85, como lo indica la línea vertical. P1, P2: genéticamente idénticos; P3, P4, P5: estrechamente relacionadas; **Enterobacter sakazakii*.

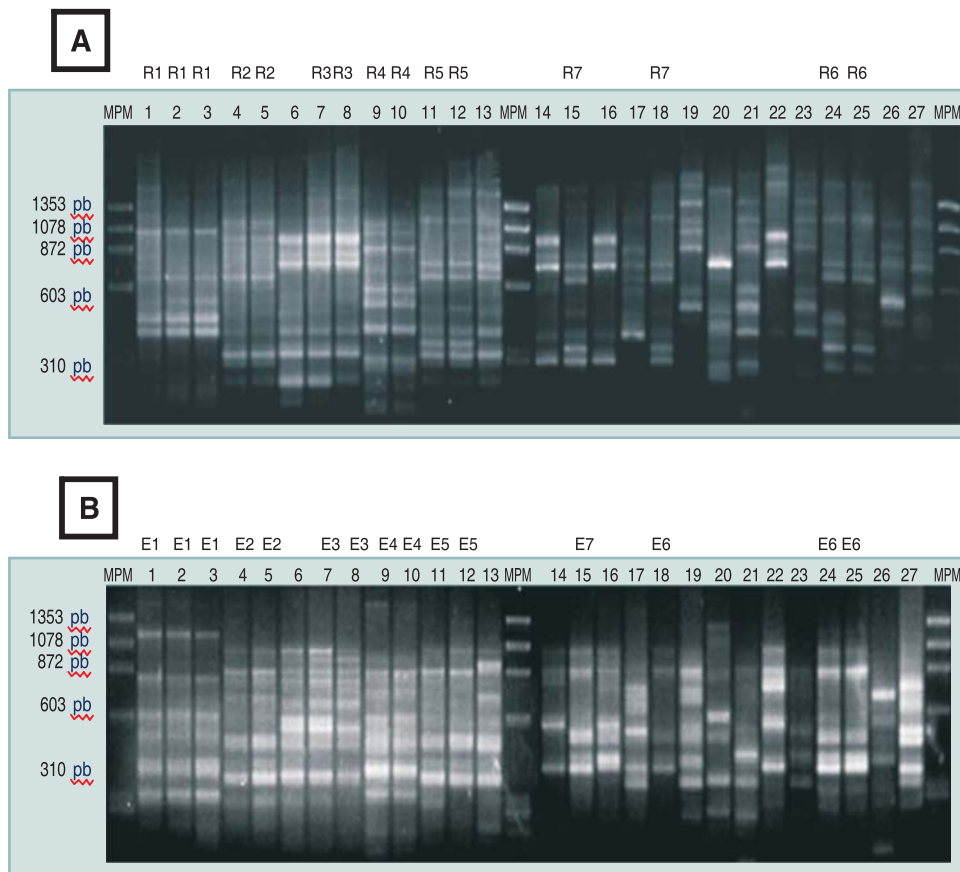


Figura 3. Perfil electroforético de los fragmentos obtenidos de rep-PCR de los 26 aislados de *E. cloacae*. Panel A: separación de los fragmentos obtenidos mediante la REP-PCR. Panel B: separación de los fragmentos derivados de la ERIC-PCR. M: marcador de peso molecular, carril 17: corresponde a una cepa *E. sakazakii* como especie no relacionada. En la parte superior de cada figura aparecen los grupos clonales P1 a P20 establecidos por el análisis visual.

to para la variante REP-PCR, así como para la variante ERIC-PCR, mientras que el poder de discriminación de la PFGE fue de 0.98.

La correlación entre las características fenotípicas de *E. cloacae* productoras de BLEE y la tipificación molecular se presentan en el cuadro I. Los aislados presentaron entre 1 y 4 β -lactamasas con pI de 5.4, 6.5, 7, 7.6, 7.8, 8.2 y 9 de manera combinada. Los pI más frecuentes fueron de 5.4 en el 88.4% de los aislados y de 8.2 en el 76.9% de los aislados, valores que sugieren la presencia de β -lactamasas de tipo TEM y SHV.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se compararon dos técnicas de tipificación molecular para discriminar grupos clonales en cepas de *Enterobacter cloacae*, una de ellas que corresponden a la amplificación azarosa del ADN (rep-PCR) y la segunda que corresponde a la PFGE. En la población analizada, ambas técnicas fueron capaces de identificar 18 y 20 grupos clonales, respectivamente. Debido a la accesibilidad de la metodología,

bajo costo y rapidez en el procesamiento, la técnica de rep-PCR es una herramienta muy útil para la tipificación molecular de cepas de *E. cloacae* en unidades hospitalarias.

El hallazgo de *E. cloacae* multirresistente se ha incrementado en la última década, probablemente como resultado del uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro. La resistencia de *E. cloacae* a antibióticos betalactámicos ha sido asociada a la sobreproducción de β -lactamasas cromosómicas AmpC, así como a la producción de BLEEs, siendo la causa de varios brotes hospitalarios en diferentes partes del mundo. La diseminación de esta resistencia puede deberse a la transferencia de plásmidos entre las diferentes enterobacterias y a la diseminación de clonas endémicas, lo cual ocasiona un problema de morbimortalidad.^{12,21,22} En la literatura científica se han documentado varios reportes de enterobacterias multirresistentes a antibióticos causantes de brotes intrahospitalarios, entre ellos el de las regiones de Asia-Pacífico y Sudáfrica, donde el 36% de las cepas de *E. cloacae* aisladas fueron productoras de BLEE.²³

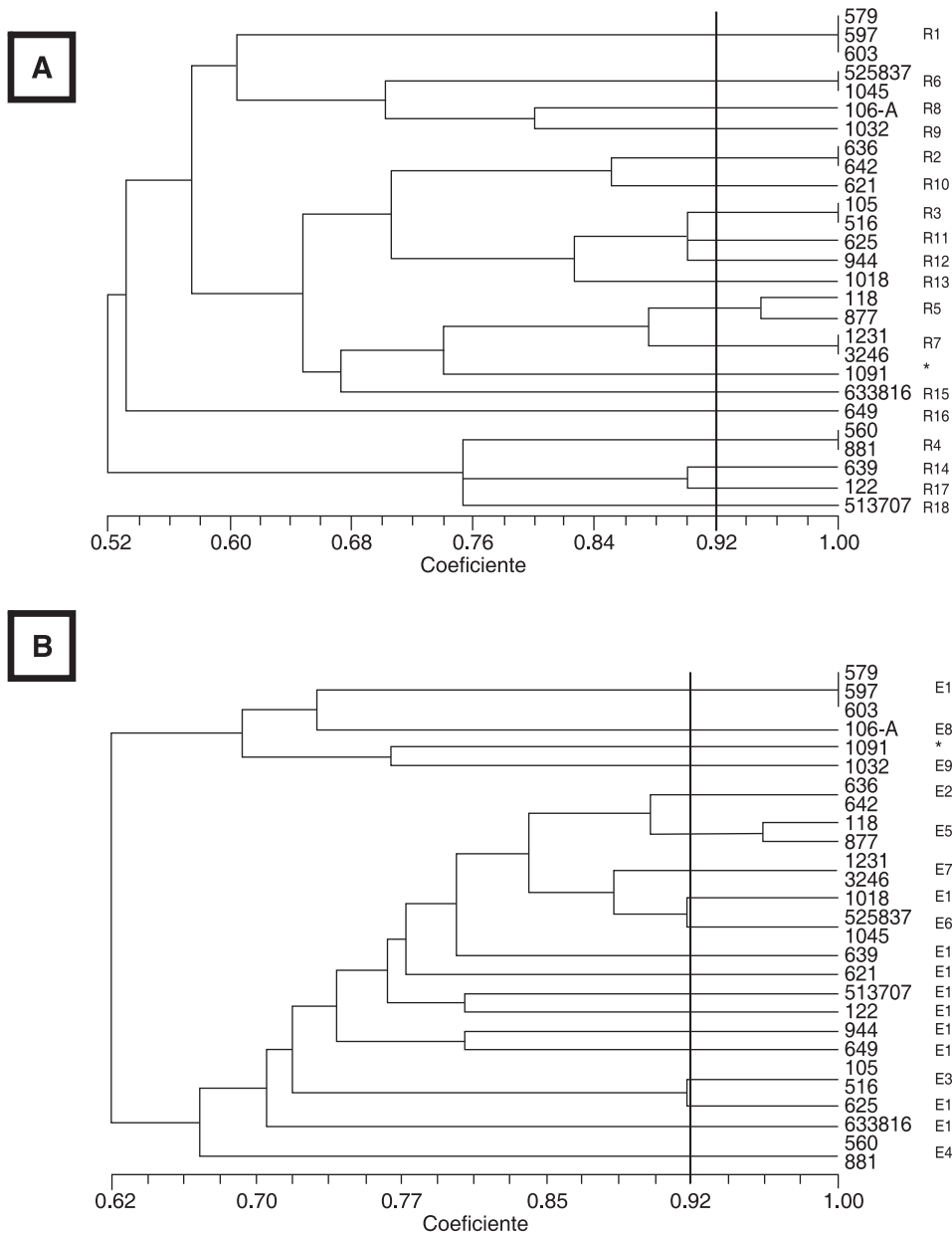


Figura 4. Dendrograma derivado del agrupamiento por UPGMA obtenido del perfil electroforético de rep-PCR. Panel A: Dendrograma obtenido del perfil REP-PCR. Panel B: Dendrograma obtenido del perfil ERIC-PCR. Los aislados estrechamente relacionados se agruparon con coeficientes de similitud mayores de 0.92, como lo indica la línea vertical. R1, R2, R3, R4, R6, R7: genéticamente idénticos; R3: estrechamente relacionadas; **Enterobacter sakazakii*.

En México, Silva y cols., reportaron la producción de BLEE en *E. coli* y *E. cloacae* con una frecuencia del 59%.²⁴ En este tipo de estudios la tipificación molecular es una herramienta muy útil para la implementación de intervenciones e identificación de las vías de diseminación de las bacterias. De aquí la importancia del empleo de las técnicas moleculares más accesibles y de bajo costo en los centros hospitalarios.

Los métodos convencionales para la caracterización bacteriana, tales como la biotipificación, patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos y algunos otros

basados en el fenotipo, no son confiables para determinar el origen o su posible diseminación entre los pacientes hospitalizados. No obstante, con el aporte adicional de las técnicas moleculares, y la información clínico-epidemiológica, es factible proponer el origen y las posibles rutas de diseminación en el ambiente hospitalario. Estos sistemas moleculares alternativos aportan información más confiable sobre las características de los brotes, lo cual puede ser útil para proponer medidas de contención para un control eficiente de las infecciones intrahospitalarias.^{3,25}

Cuadro I. Características moleculares de los aislados de *E. cloacae* productores de BLEE.

Cepa	Perfil de resistencia*	Perfil de β -lactamasas (pI)	Patrón PFGE	Patrón REP-PCR	Patrón ERIC-PCR
579	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P1	R1	E1
597	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P1	R1	E1
603	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P1a	R1	E1
636	CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2	P2	R2	E2
642	CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2	P2	R2	E2
105	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P3	R3	E3
516	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P3	R3	E3
560	CAZ, CDP	5.4, 8.2, 9	P4	R4	E4
881	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2	P4	R4	E4
118	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2	P5	R5	E5
877	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.8	P5	R5	E5
621	CDP	6.5	P6	R10	E10
944	CTX, CAZ, CPD	8.2, 9	P7	R12	E12
1231	CPD	5.4, 7.8, 8.2	P8	R7	E7
1018	CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P9	R13	E13
625	CAZ, CPD	5.4, 7.8	P10	R11	E11
122	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.6, 9	P11	R17	E17
513707	CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P12	R18	E18
649	CAZ	5.4, 8.2, 9	P13	R16	E16
1045	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2	P14	R6	E6
525837A	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P15	R6	E6
639	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7, 7.6, 7.8	P16	R14	E14
633816	CAZ, CPD	5.4, 8.2	P17	R15	E15
3246	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2, 9	P18	R7	E7
106 ^a	CTX, CAZ, CPD	7.6, 9	P19	R8	E8

*Resistencia a cefalosporinas de tercera generación, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, CPD: cefpodoxima.

En general, las técnicas moleculares basadas en la amplificación del ADN por PCR pueden presentar una mayor capacidad en la tipificación, reproducibilidad, facilidad de interpretación y de ejecución en el laboratorio. De inicio, en este trabajo se establecieron las condiciones óptimas de amplificación para las dos variantes rep-PCR, de aquéllas ya reportadas con anterioridad para la tipificación de otros géneros bacterianos.^{6,9,18} La amplificación en número y resoluciones de bandas obtenidas en los ensayos fue incrementada mediante una variación en la concentración de MgCl₂, temperatura de apareamiento del oligonucleótido, concentración de DMSO, y método de extracción y cantidad del ADN (ver métodos). Estas condiciones hicieron posible realizar el análisis confiable de las muestras ensayadas, así como han sido reportadas por otros autores.^{17,26,27} Los resultados del ensayo de REP-PCR fueron fáciles de interpretar, en cambio el patrón electroforético obtenido con la ERIC-PCR fue más difícil debido a la variación en la intensidad de las bandas. Los resultados obtenidos con las dos variantes siempre fueron reproducibles.

Como ya ha sido mencionado, el estándar de oro en la tipificación molecular es la PFGE, los resulta-

dos obtenidos en el presente estudio incluyeron esta técnica y las dos variantes rep-PCR, las cuales mostraron resultados concordantes con un poder de discriminación de 0.97 comparado con el poder de discriminación de 0.98 de la PFGE. Estos valores son aceptables, considerando que el número máximo de discriminación fue 1.0. La discordancia en los resultados se debió a que los métodos de rep-PCR fueron capaces de discriminar dos patrones clonales genéticamente más cercanos (R6/E6 y R7/E7) que incluyeron dos aislados por cada patrón, mientras que la técnica de PFGE los discrimina como no relacionados. Por otra parte, las técnicas basadas en PCR no fueron capaces de discriminar los subtipos, mientras que la PFGE incluyó un aislado (603) en el patrón P1 como un subtipo P1a. Las diferencias entre la rep-PCR y PFGE identificadas en este estudio, son similares a las reportadas en otros estudios,^{17,18} donde la primera no pudo discriminar subtipos y aislamientos agrupados por la PFGE; en el mismo patrón clonal la rep-PCR los discriminó como no relacionados.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir el empleo de las dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de *E. cloacae*,

ya que cumplieron con los criterios de evaluación de métodos de tipificación como: la capacidad de tipificación (el 100% de los aislados fueron tipificables), la reproducibilidad (se realizó por triplicado, obteniendo los mismos perfiles de clonalidad), la facilidad de interpretación (5 a 10 fragmentos amplificados) y la ejecución en el laboratorio. En cuanto a la relación existente entre las características genotípicas y fenotípicas de los aislamientos pertenecientes a un grupo clonal, se identificó que algunos de un mismo grupo clonal (P1/R1/E1, P2/R2/E2, P3/R3/R3) tuvieron el mismo perfil de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, así como los mismos pI de β -lactamasas; no obstante, en otros patrones esta similitud no fue compartida, posiblemente debido a la adquisición de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones) que determinan la diferencia fenotípica.

Una limitante de nuestro estudio fue el no incluir cepas provenientes de otras unidades hospitalarias que pudieran robustecer nuestros resultados. Sin embargo, la perspectiva para el empleo de las dos variantes rep-PCR para tipificar genotípicamente aislamientos clínicos de *E. cloacae* productoras de BLEE se apoya con el uso reciente de sistemas semiautomatizados comerciales por reacción en cadena de la polimerasa, basados en secuencias repetidas en *Acinetobacter baumannii*, especies de *Aspergillus* y *Escherichia coli* productoras de CTX-M-15; no obstante, esta técnica innovadora tiene un costo elevado.²⁷⁻²⁹

En conclusión, debido a la facilidad de ejecución, rapidez, reproducibilidad y alto poder de discriminación de la rep-PCR, esta técnica puede ser empleada como una herramienta molecular alternativa para la tipificación de brotes de *E. cloacae* multirresistentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico de la QFB Amparo Calderón Navarro por haber proporcionado los aislamientos clínicos.

REFERENCIAS

1. Healy M, Huang J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, et al. Microbiol DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 199-207.
2. Coll P, Coque MT, Dominguez MA, Vazquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2a ed. España: Seimc; 2005: 1-72.
3. 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.
4. Miranda G, Kelly C, Solorzano F, Leanos B, Coria, Patterson JE. Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of infection due to *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 3138-41.
5. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 25: 6823.
6. Spigaglia P, Mastrantonio P. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a Molecular Typing Method for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2454-7.
7. Johnson JR, O' Bryan T. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7: 265-73.
8. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1661-9.
9. Matín-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortíz-Leyba C, et al. Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 4571-5.
10. Sanders WE Jr, Sanders CH. *Enterobacter* spp: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 220-41.
11. Haertl R, Bandlow G. Epidemiological fingerprinting of *Enterobacter cloacae* by small-fragment restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 128-33.
12. Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, et al. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 826-31.
13. Paauw A, Verhoef J, Fluit AC, Titia EM, Hopmans EM, Troelstra A, et al. Failure to control an outbreak of qnrA1-positive multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* infection despite adequate implementation of recommended infection control measure. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1420-5.
14. CLSI/NCCLS. *Performance Standard for antimicrobial disk susceptibility test*. 8th edition. Phyladelphia, USA: Approved standard; 2005.
15. Mattew H, Harris Am, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of betalactamasas. *J Gen Microbiol.* 1975; 88: 169-78.
16. Chung M, Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug.* 2000; 6: 189-98.
17. Snelling AM, Gernet-smidt P, Hawkey PM, Heritage J, Parnell P, Porter C, et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (RER-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1193-202.
18. Mantilla JR, García I, Espinal PA, Valenzuela EM. Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Col Cienc Quím Farm.* 2004; 33: 48-58.

19. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 2465-6.
20. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2233-9.
21. Van Nierop WH, Duse AG, Stewart RG, Bilgeri YR, Koornhof HJ. Molecular epidemiology of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in the neonatal intensive care unit of a provincial hospital in Gauteng, South Africa. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3085-7.
22. Manzur A, Tubau F, Pujol M, Calatayud L, Dominguez MA, Peña C, et al. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2365-9.
23. Bell JM, Turnidge JD, Jones RN, SENTRY Asia-Pacific Participants. Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pacific region: Result from SENTRY Antimicrobial surveillance program 1998-2001. *Antimicrobial agent Chemother.* 2003; 47: 3989-93.
24. Silva J, Cano M, Contreras J, Donis J, Martinez G, Morfin R, et al. Prevalence and molecular typing of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* causing nosocomial infections in Mexico. *Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 42: abstract no. C2-1873.
25. Woods CR, Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 1927-31.
26. Shen W, Hohn B. DMSO improves PCR amplification of DNA with complex secondary structure. *Trends Genet.* 1992; 8: 227.
27. Ross TL, Merz WE, Farkosh M, Carroll KC. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5642-7.