

Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*

José Ramón Mantilla*, Ibonne García, Paula Andrea Espinal y Emilia María Valenzuela

Resumen

Para la tipificación de *K. pneumoniae* se evaluaron los resultados de tres variantes de la técnica de amplificación de secuencias repetidas (rep-PCR) comparándolos con los resultados de la tipificación con electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). Se analizaron dos poblaciones de *K. pneumoniae*: una constituida por aislamientos causantes de infección nosocomial, recolectados durante un año en un hospital de tercer nivel y otra asociada a un brote intrahospitalario en una unidad de cuidado intensivo neonatal. La tipificación por PFGE se realizó con macrofragmentos obtenidos con *Xba*I. La rep-PCR se realizó con tres conjuntos de iniciadores correspondientes a las secuencias, BOX, ERIC y REP. Todos los aislamientos fueron tipificables por los tres sistemas rep-PCR y fueron discriminados de manera similar a lo obtenido con PFGE ($D = 0.978$). El buen poder discriminatorio ($D = 0.974$) obtenido con los procedimientos rep-PCR estandarizados permite sugerir el empleo de REP-PCR y BOX-PCR para tipificación rápida de aislamientos de *K. pneumoniae*, aplicada a estudios de epidemiología molecular de la infección nosocomial.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, PFGE, rep-PCR, genotipificación

Summary

Standardization and evaluation of three rep-PCR systems for typefication of *Klebsiella pneumoniae*

The results of three variations of the repeated sequence (rep-PCR) amplification technique for typing *K. pneumoniae* were evaluated by comparing them with the results of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing. Two *K. pneumoniae* populations were analysed; one was constituted by isolates causing nosocomial infection, collected throughout a year from a third-level hospital and the other was associated with an intra-hospital outbreak in a neonatal intensive-care unit. PFGE typing was done with macro-fragments obtained with *Xba*I. Rep-PCR was done with three sets of primers corresponding to BOX, ERIC and REP sequences. All isolates were typable by all three rep-PCR systems and were discriminated similarly to results obtained with PFGE ($D = 0.978$). The good discriminatory power ($D = 0.974$) obtained with standardised rep-PCR procedures leads to the suggestion that using REP-PCR and BOX-PCR for rapid typing of *K. pneumoniae* isolates can be applied to molecular epidemiology studies of nosocomial infection.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, PFGE, rep-PCR, genotyping

Recibido para evaluación: 15 de febrero de 2004
Aceptado para publicación: 20 de mayo de 2004

* Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología, A.A.:14490. E.mail: jrmantillaa@unal.edu.co

Introducción

Las técnicas microbiológicas convencionales tales como la biotipificación, el análisis de susceptibilidad a los antimicrobianos y algunas otras basadas en el fenotipo, han mostrado limitaciones para la tipificación con fines epidemiológicos de aislamientos bacterianos de origen clínico (1), por lo cual en los últimos años se han desarrollado procedimientos basados en el análisis del genoma; entre estos se encuentra la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) que ha sido considerada, por su excelente poder de discriminación, el estándar de oro de la tipificación bacteriana a nivel de subespecie (2-4). Si bien, la PFGE ha sido aplicada exitosamente en estudios genéticos y epidemiológicos de diferentes organismos, es una técnica laboriosa, requiere de equipos y reactivos costosos y consume mucho tiempo para la obtención de resultados. 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 (5-7) que agrupa diferentes metodologías basadas en la utilización de iniciadores, diseñados a partir de secuencias repetidas presentes en diferentes especies bacterianas, entre ellas se han referenciado las secuencias repetidas palindrómicas extragénicas (REP), las secuencias consenso intergénicas repetidas enterobacteriales (ERIC) y el elemento BOX, las cuales se encuentran aleatoriamente distribuidas a través del genoma y pueden llegar a ser indicativos de su estructura y evolución (8-10). Investigaciones previas han demostrado la utilidad de la rep-PCR como una herramienta promisoriosa para estudios de epidemiología molecular en bacterias Gramnegativas y Grampositivas (5-7). Sin embargo, no se han publicado estudios que muestren la aplicación de estas técnicas en poblaciones del género *Klebsiella* de origen hospitalario.

Para la evaluación de los tres sistemas rep-PCR se analizaron dos conjuntos de aislamientos de *K. pneumoniae*, asociados a infección nosocomial, provenientes de dos centros hospitalarios de tercer nivel de atención. Las agrupaciones genéticas obtenidas con los tres conjuntos de iniciadores se compararon entre sí y con las obtenidas mediante PFGE.

Materiales y Métodos

Aislamientos bacterianos

Se estudiaron dos poblaciones de *Klebsiella pneumoniae* asociadas con infecciones nosocomiales de dos centros hospitalarios. La población A conformada por 11 aislamientos de *K. pneumoniae* asociados a un brote infeccioso intrahospitalario, acontecido entre enero y marzo de 2002 en el Hospital El Tunal de Bogotá; de estos, ocho fueron aislados desde pacientes y tres desde fuentes inanimadas relacionadas con la atención de los pacientes; adicionalmente se incluyeron dos cepas de *K. pneumoniae* no asociadas al brote pertenecientes al cepario del Laboratorio de Epidemiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Tabla 1). la población B constituida por 22 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de 18 pacientes del Hospital Universitario Clínica San Rafael de Bogotá (HUCSR) (Tabla 1). Los aislamientos fueron identificados por el sistema manual API 20E (bioMérieux®) y los patrones de susceptibilidad fueron determinados por el método automatizado MicroScan

Tipificación por sistemas rep-PCR

El ADN se obtuvo de células en fase logarítmica suspendidas en TE (Tris.HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8) lisadas con lisozima (0.2 mg/ml)

Tabla 1. Características de aislamientos de las poblaciones de *K. pneumoniae* evaluadas.

Población B											
Aislado	Fuente	Fecha ^a	Servicio	Aislado	Fuente	Fecha ^a	Servicio	Aislado	Fuente	Fecha ^a	Servicio
01-A	Sangre	25/01/2002	UCIN	3550	Páncreas	20/04/01	UCI	7803	L. bronquial	27/09/01	MedIn
02-A	Sangre	25/01/2002	UCIN	3995	Orina	07/05/01	UCC	9866	Orina	30/11/01	UCIN
03-A	Sangre	30/1/2002	UCIN	4255	Orina	17/05/01	Ped.	10045	Sec orotraq	07/12/01	UCIP
04-A	Sangre	13/02/2002	UCIN	5254	L. pleural	26/06/01	UCC	257	Sec orotraq	11/01/02	UCIP
05-A	Sangre	20/02/2002	UCIN	5747	Tejido	16/07/01	Med. In	1114	Sangre	12/02/02	UCIP
06-A	Sangre	26/02/2002	UCIN	5784	Tejido	17/07/01	Med. In	366	Sangre	15/01/02	UCC
07-A	Pesa-bebes	4/03/2002	UCIN	6084	Sangre	29/07/01	Med. In	1007	Sangre	07/02/02	UCC
08 -A	Careta	4/03/2002	UCIN	6353	Tejido	09/08/01	UCC	1993	Mediastino	16/03/02	UCC
09-A	Termóm.	4/03/2002	UCIN	6722	Sangre	23/08/01	Ped..	1308	Sangre	19/02/02	MedIn
10-A	Sangre	28/02/2002	UCIN	7331	Cateter	11/09/01	UCIP	1939	Cateter	15/03/02	UCIP
11-A	Sangre	4/03/2002	UCIN	7408	L. bronquial	14/09/01	Med.In	2420	Sangre	01/04/02	Ped

Fecha^a: Fecha de colección de la muestra. UCIN: unidad de cuidado intensivo neonatal. UCI: unidad de cuidado intensivo; UCC: unidad de cuidados coronarios; Ped.: Pediatría. UCIP: unidad de cuidado intensivo pediátrico; Med. Int.: medicina interna; L. pleural: líquido pleural; L. bronquial: lavado bronquial; Sec. Orotraq.: secreción orotraqueal.

durante 10 minutos a 37°C y luego con proteínasa K (0.6 mg/ml) durante 15 minutos a 37°C. El lisado se sometió una vez a extracción con fenol saturado durante cinco minutos, la fase acuosa se separó por centrifugación a 4°C, durante 40 minutos a 12.000 g. Luego se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo y dos con cloroformo-isoamílico, con separaciones de la fase acuosa por centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 12.000 g. El ADN de la fase acuosa se precipitó con un volumen de acetato de amonio 10 M y dos volúmenes de etanol absoluto. El ADN recuperado por enrollamiento en capilar de vidrio y lavado con etanol al 70%, se disolvió en TE pH 7.5 y se almacenó a -20°C hasta la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés Polymerase Chain Reaction). El ADN se cuantificó por valoración electroforética comparándolo con concentraciones conocidas de ADN de fago lambda (11).

Para la tipificación ERIC-PCR (8) se utilizaron como iniciadores a las secuencias ERIC1R: 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' y ERIC2:

5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'; para REP-PCR a las secuencias

REP1R: 5'-IIINCGNCGNCATCNGGC-3' y

REP2-Dt: 5'NCGNCTTATCNGGCCTAC-3'

(5) y para BOX-PCR la secuencia BOXA1R: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (5).

En un termociclador Perkin-Elmer® 2400 se amplificaron 100 ng de ADN dispuestos en un volumen de reacción de 25 µl que contenía 200 µM de cada dNTP, 6 mM de cloruro de magnesio, 2 mM de cada iniciador, 0.16 mg/ml de BSA, 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) para REP-PCR y 10% de DMSO para ERIC y BOX-PCR y una unidad de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen®). Para la amplificación REP-PCR el ADN se desnaturizó durante 7 minutos a 94 °C, luego se

amplificó durante 30 ciclos que comprenden: desnaturización (92°C, 30 segundos), asociación (60°C, 1 minuto) y extensión (70 °C, 3 minutos) seguidos por un paso de extensión final a 70 °C durante 8 minutos. Para ERIC-PCR se siguieron las mismas condiciones de tiempo-temperatura, excepto que la temperatura de asociación fue de 52°C, 1 minuto. Para BOX-PCR las condiciones fueron un paso inicial de desnaturización de 5 minutos a 95°C y luego 30 ciclos de: desnaturización (92 °C , 30 segundos), asociación (60 °C, 1 minuto) y extensión (65 °C, 8 minutos) seguidos por un paso de extensión final a 65 °C durante 8 minutos. Los productos amplificados se separaron electroforéticamente a 4.6 V/ cm por 3 horas en geles de agarosa al 2% con buffer TBE 0.5X. Los geles se tñeron con solución de bromuro de etidio (1.0 µg/ml) durante 5 minutos y se lavaron con agua durante una hora. El patrón de bandas se registró y almacenó en el sistema Gel-Doc® (Bio-Rad).

La reproducibilidad de los protocolos modificados para los tres sistemas de rep-PCR, se evaluó amplificando por duplicado el mismo conjunto de muestras en diferentes días.

Tipificación por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Para la electroforesis en gel de campos pulsados, las células obtenidas de un cultivo en caldo BHI (Oxoid®) se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en solución PIV (Tris.HCl 1M y NaCl 1M, pH 7.6), la suspensión celular se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión (Boheringer Mannheim®) a 50 °C y se adicionó en moldes (Bio-Rad). Los bloques de agarosa se removieron e incubaron en solución de lisis (Tris.HCl 1M y NaCl 1M EDTA 0.1M, Brij58 0.5%, deoxicolato 0.2%, lauril sarcosinato de sodio 0.5%, ribonucleasa A 50

$\mu\text{g/ml}$ y lisozima 1 mg/ml, pH 7,6) a 37°C durante 24 horas; se reemplazó la solución de lisis por ESP (EDTA 0.4M, lauril sarcosinato de sodio 1% y proteinasa K 0.5 mg/ml pH 9.0) y se incubó a 50 °C por 24 horas. Los bloques se lavaron con TEF 1X (Tris 5 mM, EDTA 5 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, pH 7.5) a 37 °C y posteriormente con TEF 0.1 X a 37 °C. La digestión con 10 U de XbaI (Gibco-BRL) por bloque se realizó durante 18 horas. Los bloques se colocaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. La electroforesis se realizó con el equipo para campos pulsados Chef-DRIII (Bio-Rad), con pulsos de 5 a 60 segundos por 20 horas a 200 voltios (12). Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (1 g/ml) durante 5 minutos y se lavaron con agua durante una hora. El patrón de bandas se registró y almacenó en el sistema Gel-Doc® (Bio-Rad).

Análisis de perfiles electroforéticos

Se generó una matriz de presencia/ausencia por inspección visual de los perfiles electroforéticos y se analizó mediante el software NTSYSpc versión 2.0 con el algoritmo de agrupamiento UPGMA.

El coeficiente de similitud o coeficiente de DICE (S) fue calculado de acuerdo con la ecuación: $S = 2 \cdot N_{AB} / A + B$; en donde N_{AB} es el número de bandas similares entre dos aislamientos y $A + B$ es la suma total del número de bandas de los aislamientos a y b. Índice de similitud es igual a S multiplicado por 100.

Criterios de evaluación de los procedimientos de tipificación

El poder discriminatorio puede ser definido como la probabilidad de que dos cepas escogidas al azar de una población de cepas no relacionadas sean distinguidas por el método de

tipificación (13). Con base en esta definición se creó el índice numérico de poder de discriminación (D).

$$D = 1 - \frac{1}{N(-1)} \sum_{j=1}^S x_j(x_j - 1)$$

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

La capacidad de tipificación de la técnica se determinó contando el número de aislamientos que se asignaron a un tipo específico, este número se dividió entre el número total de aislamientos y se multiplicó por cien, para obtener el porcentaje de tipificación

Resultados y discusión

Para la estandarización de las condiciones de amplificación con los tres sistemas rep-PCR fue necesario hacer modificaciones a protocolos propuestos para la tipificación de otros géneros de bacterias (6,7,14-16). En el procedimiento original se recomienda usar 1.25 mM de de la mezcla de nucleótidos (dNTPS). En este trabajo fue suficiente una concentración final 0.2 mM de dNTPs; concentraciones más altas (0.6 mM y 1.2 mM) causaron inhibición de la amplificación debida a una posible disminución de la concentración óptima efectiva del ión magnesio probablemente quelado por el exceso de nucleótidos (17). Los resultados de la amplificación con la variante REP-PCR, a la temperatura de asociación sugerida (8) no fueron satisfactorios. Para lograr amplificaciones reproducibles fue necesario incrementar en 20°C el valor de esta temperatura. La falta de reproducibilidad a temperaturas de asociación relativamente bajas (40 - 45°C) puede ser debida a la inespecificidad asociada con el uso de iniciadores "degenerados" que pueden generar un exceso de fragmentos inespecíficos.

Los patrones electroforéticos generados con el iniciador BOX mostraron entre 14 y 20 bandas de ADN con tamaños entre 0.3 y 2.5 Kb; con ERIC-PCR de 10 a 13 bandas y con REP-PCR entre 16 y 25 bandas (Figura 1).

Los 13 aislamientos de la población A se clasificaron por el sistema BOX-PCR en cuatro tipos electroforéticos (B1 a B4). Con este marcador 10 de los 13 aislamientos se agruparon en el mismo tipo electroforético con un 100% de similitud (Figura 1C). En este grupo clonal quedaron incluidos los 8 aislamientos de *K. pneumoniae* recuperados desde hemocultivos y dos de los tres aislamientos obtenidos de objetos inanimados. El patrón electroforético B2, correspondiente al aislamiento recuperado desde un termómetro (cepa 09-A), fue diferente en 4 fragmentos con respecto del grupo clonal y se asoció con este grupo con un porcentaje de similitud de 84% por lo cual solo fue considerado como epidemiológicamente relacionado. Igualmente este aislamiento mostró un patrón de susceptibilidad diferente a los observados con los aislamientos del clon B1, los

cuales fueron esencialmente iguales. Con este marcador los aislamientos (12-A y 13-A) fueron relacionados con respecto al clon con porcentajes de similitud del 78% y 76% respectivamente. Con el sistema REP-PCR, los trece aislamientos fueron agrupados de manera similar a lo encontrado con BOX-PCR; entre los 10 aislamientos estrechamente relacionados se observaron dos aislamientos con tipos electroforéticos que diferían en una sola banda con respecto al grupo de aislamientos que presentaron un 100% de similitud (Figura 1). Teniendo en cuenta los criterios de Malathum (6), quien propone que aislamientos que difieren en sólo una banda se deben considerar como pertenecientes al mismo grupo clonal; estos dos aislamientos se incluyeron como pertenecientes al clon epidémico R1. El aislamiento obtenido del termómetro también presentó un patrón electroforético diferente y fue relacionado con el clon epidémico R1 con un porcentaje de similitud de 83%. Los perfiles electroforéticos R3 y R4 correspondientes a los aislamientos utilizados como aislamientos de control, externos al

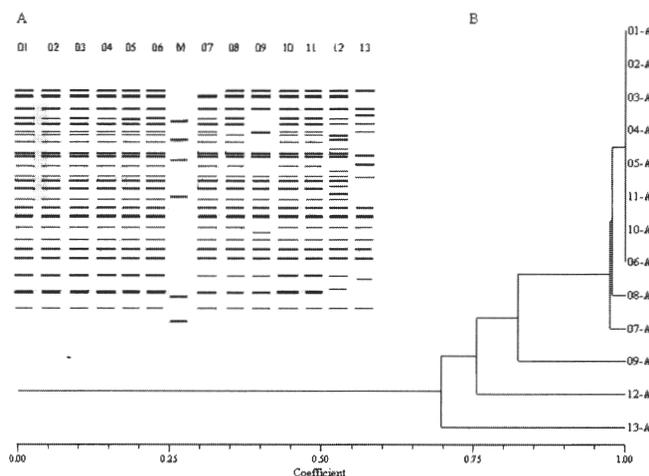


Figura 1. A. Diagrama de perfiles electroforéticos REP-PCR. Carriles 01 a 13 perfiles de los aislamientos 01-A a 13-A; M: Marcador de peso molecular. B. Dendrograma derivado del análisis UPGMA; Coefficient: Coeficiente de similitud.

brote, fueron diferentes y quedaron agrupados con porcentajes de similitud del 70 y 69% respectivamente. Con el sistema ERIC-PCR los aislamientos de la población A se clasificaron en 4 grupos electroforéticos (E1 a E4) de manera similar a las otras dos variantes de rep-PCR

La tipificación por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) de la población A se dificultó por la degradación del ADN de los aislamientos pertenecientes al clon causante del brote. Este problema fue parcialmente superado mediante la utilización de varios lavados con inhibidores de proteasas como el fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF). Con este tratamiento fue evidente la diferencia entre los patrones electroforéticos del aislamiento obtenido del termómetro y los de los aislamientos asociados al brote. La degradación del ADN en el proceso de campo pulsado también se ha informado con otros tipos de bacterias como *Vibrio parahemolyticus* (14) y *Clostridium difficile* (18) y estos investigadores sugieren la búsqueda de alternativas que aseguren mayor porcentaje de tipificación.

Para una mejor comparación del poder de discriminación de rep-PCR frente a PFGE, se estudió una población heterogénea (población B) constituida por un conjunto de aislamientos provenientes del Hospital Universitario Clínica San Rafael, asociados a infección nosocomial de tipo endógena. En el análisis de agrupamiento mediante PFGE de esta población se obtuvieron 22 patrones electroforéticos, uno por cada aislamiento, constituidos por 14 a 20 bandas de macrofragmentos con tamaños entre 48 Kb y 727 Kb. Teniendo en cuenta los criterios de Tenover (4) los aislamientos se agruparon en 17 tipos electroforéticos (P1 a P17) (Tabla 2 y Figura 2); cinco de ellos conformados por 2 aislamientos cada uno, relacionados con coeficientes de similitud superiores a 0.87 (índice de similitud del 87%) por lo cual fueron considerados como estrechamente relacionados entre sí. El análisis de

agrupamiento de este conjunto de aislamientos (población B) mediante el sistema REP-PCR utilizando puntos de corte en el dendrograma superiores a 0.87 (Figura 2) se presentaron 17 tipos electroforéticos: trece constituidos por un solo aislamiento, tres con dos aislamientos cada uno (R1, R10 y R 16) y uno con tres aislamientos (R4). Idénticas agrupaciones fueron encontrados con BOX-PCR y ERI-PCR, El análisis de agrupamiento de la población B con los sistemas rep-PCR mencionados fue similar al obtenido con PFGE, excepto para el caso de dos aislamientos que fueron considerados como estrechamente relacionados mediante PFGE (tipo electroforético P3) los cuales fueron discriminados como diferentes con REP-PCR y BOX-PCR (R11/B16 y R12/B17) (Tabla 2 y Figura 2).

En el análisis del contenido del ADN plasmídico de estos aislamientos, realizado de acuerdo a lo descrito con Sambrook y col (11), se observaron perfiles plasmídicos diferentes; así, el aislamiento 257 (R11/B16) contenía un plásmido con tamaño aproximado de 23 Kb y el aislamiento 1114 (R12/B17) dos plásmidos con tamaños entre 4 Kb y 6 Kb (estos resultados no se muestran). Aunque estos aislamientos provenían del mismo paciente, el patrón de susceptibilidad y el análisis del ADN plasmídico demostraron que eran genética y fenotípicamente diferentes. En este caso es posible que se trate de cepas con cromosomas muy parecidos que han adquirido elementos extracromosomales diferentes, que poseen secuencias amplificables por los sistemas rep-PCR y que generan patrones electroforéticos diferentes. Otra discrepancia entre los resultados obtenidos con las dos metodologías fue la agrupación del aislamiento 6353S, el cual fue relacionado, mediante rep-PCR como estrechamente relacionado con los aislamientos 7408S y 6722S en el tipo electroforético R4/B4, mientras que PFGE discrimino al

aislamiento 6353S en un tipo electroforético (P15) completamente diferente al del grupo P8, constituido por los aislamientos 7408S y 6722S. En este caso la PFGE logró una mejor discriminación que rep-PCR, puesto que el aislamiento 6353S, presentó un patrón de susceptibilidad muy diferente a los del grupo P8 y fue aislado en fecha y unidad de servicio hospitalario diferente. Las dos discrepancias mencionadas sugieren la necesidad de utilizar por lo menos dos marcadores de genotipificación diferentes para lograr establecer con más eficacia las posibles relaciones entre aislamientos. Con ERIC-PCR se obtuvo una menor capacidad de discriminación ($D = 0.944$). Los índices discriminatorios para los sistemas REP-PCR y BOX PCR fueron de igual valor: $D = 0.974$, semejante al obtenido con PFGE: $D = 0.978$

Además de la capacidad de discriminación, a los métodos de tipificación se les evalúa con base en la capacidad de tipificación, reproducibilidad, facilidad de interpretación y de ejecución

en el laboratorio (19). Teniendo en cuenta a las dos poblaciones estudiadas la capacidad de tipificación de PFGE fue solamente del 71% (o del 96%, si se considera el conjunto de aislamientos asociados al brote como una sola cepa). Por el contrario con los tres sistemas de rep-PCR, y usando ADN purificado la capacidad de tipificación fue del 100%. Los sistemas BOX-PCR y REP-PCR, bajo las condiciones establecidas mostraron buena reproducibilidad. Con el sistema ERIC-PCR la reproducibilidad fue menor y fue más dependiente de la concentración y pureza del ADN molde.

Otro criterio importante de evaluación de los métodos de tipificación es la facilidad de ejecución en el laboratorio. PFGE es sin duda una técnica más laboriosa, que consume más tiempo y requiere de equipos más especializados y costosos en comparación con las técnicas basadas en PCR. Para la ejecución de PFGE se requieren mínimo 6 días para la obtención de resultados y con rep-PCR solamente dos días.

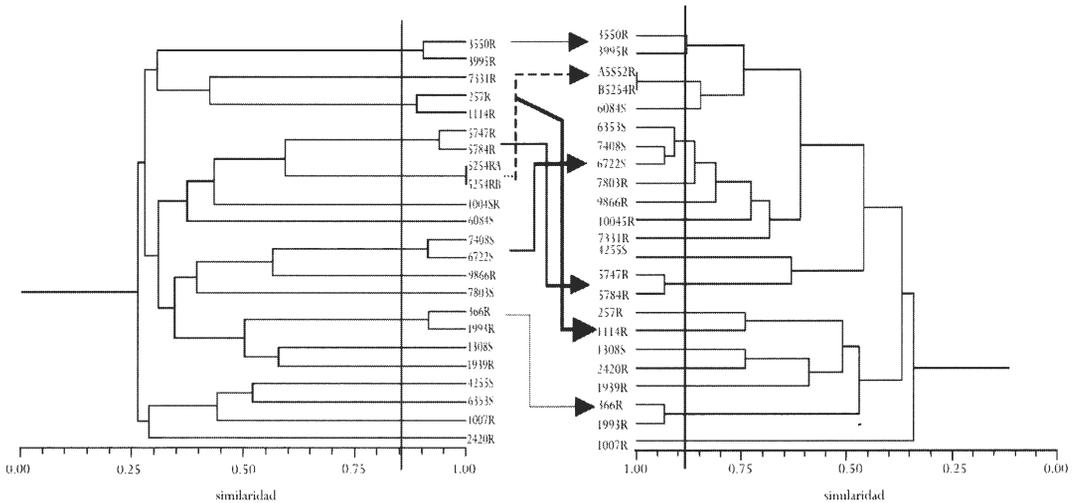


Figura 2. Análisis de agrupamiento con el algoritmo UPGMA de la población B: A la izquierda dendrograma mediante PFGE y a la derecha con REP-PCR. Flecha discontinua: aislamiento 5254 por duplicado. Flechas continuas y delgadas: aislamientos agrupados de manera similar. Flecha de trazo grueso: aislamientos que se agruparon diferente con las dos técnicas.

Tabla 2. Perfiles de susceptibilidad antibiótica y genotipos de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de la población B.

Aislamiento	Susceptibilidad antimicrobiana											Genotipos		
	ATM	CRO	CAZ	CTX	CEF	GN	AK	CIP	IMP	TZP	PFGE	REP	BOX	ERIC
4255	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P14	R9	B7	E6
6084	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P7	R3	B5	E4
7803	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P19	R5	B6	E3
6722	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P8	R4b	B4	E5
7408	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P8	R4b	B4	E5
6353	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	P15	R4a	B2	E5
1308	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	P12	R13	B11	E10
2420	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	P17	R14	B12	E14
10045	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	P6	R7	B9	E7
7331	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	P2	R8	B10	E8
1939	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	P13	R15	B14	E12
9866	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	P9	R6	B8	E9
3995	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	P1	R1	B1	E1
3550	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	P1	R1	B1	E1
5254	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	P5	R2	B3	E1
5747	R	R	R	R	S	R	R	R	S	I	P4	R10	B13	E11
5784	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	P4	R10	B13	E11
257	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	P3	R11	B16	E15
1114	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	P3	R12	B17	E16
366	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	P11	R16	B15	E16
1993	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	P11	R16	B15	E16
1007	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	P16	R17	B18	E13

ATM, aztreonam; CRO, ceftriaxona; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; CEF, cefepime; GN, gentamicina; AK, amikacina; CIP, ciprofloxacina; IMP, imipenem; TZP, piperacilina/tazobactam; S, sensible; R, resistente.
ERIC: Tipificación ERI-PCR

Además de considerar los criterios de evaluación, es importante mencionar que la relación de los resultados de tipificación con la información epidemiológica, permiten validar estas técnicas para su aplicación en estudios de epidemiología molecular de aislamientos bacterianos. En el presente estudio, se pudo establecer con ambas metodologías que 10 de los 11 aislamientos relacionados epidemiológicamente correspondían a un clon causante de un brote de origen hospitalario y se detectaron como fuentes de diseminación a objetos inanimados que fueron utilizados en el manejo de los pacientes.

En conclusión, los resultados obtenidos con las tres metodologías de rep-PCR fueron concordantes entre sí y con PFGE. Teniendo en cuenta los criterios de evaluación de los métodos de tipificación y la información epidemiológica, se puede considerar a rep-PCR como una metodología alternativa a la PFGE con una buena reproducibilidad y un similar poder de discriminación para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. De igual manera, puede ser muy útil para tamizar genotípicamente grandes poblaciones, para la detección rápida de brotes y como sistema de tipificación complementario de otros marcadores como, el antibiograma, el ribotipo, el perfil plasmídico o de sistemas más discriminatorios como PFGE, en estudios en donde sea necesario precisar el tipo de relaciones genéticas.

Agradecimientos

Los autores agradecemos la colaboración prestada por la doctora Narda Olarte del Hospital El Tunal Empresa Social del Estado y el doctor Carlos H. Saavedra del Hospital Universitario Clínica San Rafael por haber facilitado los aislamientos evaluados. A la doctora Celia Alpuche de la Universidad Nacional Autónoma de

México por la asesoría para la tipificación por PFGE. Este trabajo fue financiado en parte por la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Bibliografía

1. D. M. Olive y P. Bean, Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms, *J. Clin Microbiol.*, **6**, 1661 (1999).
2. A. Gouby, C. Neuwirth, G. Bourg, N. Bouziges, M. J. Carles-Nurit, E. Dexpaux y M. Ramuz., Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Geriatric Hospital, *J. Clin Microbiol.*, **32**, 301 (1994).
3. J. Silva, R. Gatica, C. Aguilar, Z. Becerra, U. Garza, M. Velazquez, G. Miranda, B. Leños, F. Solorzano y G. Echaniz, Outbreak of infection with extended spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexical hospital, *J. Clin Microbiol.*, **39**, 3193 (2001).
4. Tenover, F., R. Arbeit, R. Goering, P. Mickelsen, B. Murray, D. Persing y P. Swaminathan. Interpreting cromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed field gel electrophoresis. Criteria for bacterial strain typing, *J. Clin Microbiol.*, **33**, 2233 (1995).
5. K. Malathum, K. Singh, G. Weinstock y B. Murray. Repetitive sequence-based PCR versus Pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level, *J. Clin Microbiol.*, **36**, 211 (1998).
6. T. Conye, T. Spilker, A. Martin y J. LiPuma, Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of

- Burkholderia cepacia* Genomovar III, *J. Clin Microbiol.*, **40**, 3300 (2002).
7. D. Lozano, J. Cisneros, B. Becerril, L. Cu-beros, T. Prados, C. Ortiz, E. Canas y J. Pachón, Comparison of a repetitive extra-genic palindromic sequence-based PCR methods and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia, *J. Clin Microbiol.*, **40**, 4571 (2002).
 8. J. Versalovic, T. Koeuth, and J.R. Lupski. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finger printing of bacterial genomes. *Nucleic Acids. Res.*, **25**, 6823 (1991).
 9. F. Louws, D. Fulbright, C. Stephens F. Bruijin, Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudo-monas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2286 (1994).
 10. K. Tyler, G. Wang, D. Tyler W. Johnson. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin Microbiol.* **35**, 339 (1997).
 11. J. Sambroock, E. F. Fritsh T. Maniatis. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edn. 3 vols. Cold Spring Harbory Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 12. G. Miranda, C. Kelly, F. Solórzano, B. Leanos, R. Coria y J.E. Patterson, 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.*, **34**, 3138 (1996).
 13. P. R. Hunter y M. A. Gaston, Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin Microbiol.* **26**, 2465 (1988).
 14. H. Speijer, P. H. M Savelkoul., M.J. Bonten, E. E. Stobberingh, J. H. T Tjhie, Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit, *J. Clin Microbiol.*, **37**, 3654 (1999).
 15. H. C. Wong y C. H. Lin, Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers., *J. Clin Microbiol.* **39**, 4233 (2001).
 16. M.M. Pettigrew, B. Foxman, Z. Ecevit, C. Marrs y J. Gilsdorf, Used of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontypeables *Haemophilus influenza.*, *J. Clin Microbiol.*, **40**, 660 (2002).
 17. D.H. Gelfand. Polimerase chain reaction. In Current protocols in Molecular Biology. By John Wiley & Sons, Inc, 1999, Supp 46, p. 15.1.12.
 18. P. Spigaglia, and P. Mastrantonio, Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing methods for *Clostridium difficile*, *J. Clin Microbiol.*, **41**, 2454 (2003).
 19. R. Arbeit. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A., Pfaller, F. C., Tenover and R. H. Tenover. Ed. Manual of clinical microbiology 7 th ed. American Society for Microbiology. Washington D.C., 1999. p. 116-137