

ARTICULO ORIGINAL

INFECCIONES NOSOCOMIALES Y MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS

Ruano C,^{1,2} Saez J,³ Vindel A,³ Martínez F.⁴

1 Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central, Quito-Ecuador, 2 Ex Becario OPS/ISCIII, Programa Formación de Investigadores, 3 Servicio de Bacteriología, Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, 4 Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid-España.

Resumen

Las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias continúan siendo en la actualidad un grave problema de salud pública principalmente por falta de monitoreo y control permanentes. En los últimos años, el análisis epidemiológico de las infecciones nosocomiales ha evolucionado y ha experimentado importantes cambios, desde la caracterización fenotípica hasta el desarrollo de técnicas de biología molecular y la utilización del genoma de los microbios e investigaciones basadas en la utilización de chips de ADN. En el presente trabajo hacemos una revisión de algunas publicaciones sobre este tema y analizamos las ventajas y desventajas de varios métodos de tipificación y su utilidad epidemiológica.

Palabras clave: Infecciones nosocomiales, Caracterización fenotípica y genotípica.

Summary

The nosocomial or intrahospital infections mainly continue being at the present time a serious problem of public health by lack of permanent monitored and control. In the last years, the analysis epidemiologist of the nosocomiales infections has evolved and experienced important changes, from the phenotypic characterization to the development of techniques of molecular Biology and the use of the genome of the microbes and investigations based on the use of DNA Chips. In the present work we make an overhaul of some publications on this subject and analyzed the advantages and disadvantages of several methods of typing and their utility epidemiologist.

Key words: Nosocomial infections, Phenotypic and genotypic characterization

INTRODUCCION

La infección nosocomial (IN) es la que adquiere un paciente durante su hospitalización, que no la padecía antes ni la estaba incubando al momento de su admisión.¹ La infección es nosocomial si los signos, síntomas y/o cultivos son positivos después de 48-72 horas de la admisión del paciente al hospital,² en cambio, una infección no se considera nosocomial cuando está asociada a una complicación o una diseminación que ya estaba presente en el momento del ingreso, si no ha cambiado el germen causal ni han

aparecido síntomas muy sugestivos de que el paciente ha adquirido una nueva infección.³

Se ha demostrado que en las IN es prioritaria la vigilancia y control, lo que puede proporcionarnos importantes datos epidemiológicos como la identificación de epidemias, en base a lo cual se implementarán las actividades prioritarias para su control. Esta vigilancia puede efectuarse en todo el hospital, desgraciadamente con costos altos, o bien observando las zonas de alto riesgo, con lo cual se logra disminuir significativamente los mismos.

En los últimos 20 años se han desarrollado técnicas especiales para reconocer y tipar la mayoría de organismos que producen infecciones hospitalarias. Estos métodos ayudan a diferenciar o a agrupar organismos cercanos, de la misma especie, en base a caracteres sencillos de los organismos a los que se

Dirección para correspondencia: Dr. César I. Ruano Nieto, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central, Centro de Biomedicina, Iquique N° 14-121 y Sodiro, POBOX 17-11.6120, Teléfonos 593 2 2528810 y 593 2 2528690, E mail: HYPERLINK "mailto:cruano@med.ucentral.edu.ec" cruano@med.ucentral.edu.ec - HYPERLINK "mailto:cesarruano@andinanet.net" cesarruano@andinanet.net, Quito, Ecuador.

denominan marcadores. Cuando estos organismos muestran diferencias de acuerdo con el marcador aplicado, se considera que son epidemiológicamente distintos, mientras que cuando presentan el mismo patrón, tomamos como evidencia de que existe una relación epidemiológica entre las cepas.⁴

En muchos casos es fácil obtener evidencia acerca del origen nosocomial de una infección pero en otros hace falta aplicar métodos de tipificación más sofisticados para descubrir la fuente de infección. El estudio microbiológico de las infecciones nosocomiales se puede dividir en dos niveles, el primero se lleva a cabo en el laboratorio del hospital mediante el aislamiento e identificación del agente causal y el segundo que se realiza en un laboratorio de referencia mediante la tipificación de los microorganismos aislados en el primer nivel por medio de métodos que reconocen caracteres elementales del agente. La aplicación de estos marcadores permite reconocer la existencia de relaciones epidemiológicas entre los organismos.^{5,6}

En la presente revisión enfocaremos la importancia de la vigilancia y control de las IN y el rol esencial del laboratorio microbiológico e intentaremos valorar los más actuales y mejores estudios epidemiológicos que analicen la importancia de las IN.

CARACTERIZACION E IDENTIFICACION EPIDEMIOLOGICA

Como habíamos señalado, la vigilancia y control de las IN es de fundamental importancia. Este control tiene que basarse en una visión holística y multidisciplinaria, en la cual la caracterización del germen y los datos clínicos disponibles deben ser aplicados para determinar la naturaleza del problema epidemiológico.⁷ En cambio, la valoración epidemiológica se relaciona en gran parte con la búsqueda de una caracterización definitiva del patógeno causante de la IN, mediante la comparación de características específicas que identifiquen una cepa causante de una diseminación en la población, sin pasar por alto variantes epidemiológicas relevantes como los subtipos o discriminando muestras que no tengan ninguna relación.⁸

El desarrollo de la epidemiología hospitalaria basada en el análisis de marcadores epidemiológicos representa uno de los campos de la microbiología que ha experimentado cambios fundamentales en los últimos años. Se han desarrollado una serie de técnicas rápidas que acortan enormemente el tiempo requerido para reconocer la presencia de un agente en comparación con los métodos tradicionales, sin embargo, ello no significa que deban abandonarse los

métodos clásicos de aislamiento e identificación de los microorganismos pues son muy necesarios para cualquier estudio epidemiológico posterior así como para la realización de antibiogramas absolutamente necesarios para llevar a cabo un tratamiento correcto, por lo que es recomendable que los aislados epidemiológicamente importantes, tanto si proceden de brotes como de casos aislados de una enfermedad poco frecuente o potencialmente epidémica, sean subcultivados y conservados.⁹ La identificación correcta de aislados relacionados con IN así como la recogida y transporte de las muestras, son de importancia capital pues una identificación errónea puede dar lugar a la aparición de brotes falsos o por el contrario a la no detección de un brote.

La identificación epidemiológica utiliza métodos de laboratorio para caracterizar diferentes cepas de microorganismos dentro de una especie. Estos métodos pueden clasificarse en fenotípicos y genotípicos. Las técnicas fenotípicas detectan características expresadas por el organismo, mientras que las genotípicas examinan directamente el contenido genético del mismo. Como es conocido, la variedad de organismos implicados en infecciones hospitalarias aumentan día a día, lo que hace necesario el desarrollo de nuevos métodos para su identificación, por lo que estas técnicas están continuamente evolucionando. En la actualidad se da mayor importancia a los caracteres genotípicos que a los fenotípicos, pasando de buscar el agente común a buscar el fragmento de DNA de uno o varios genes que sea común.

El laboratorio clínico puede llevar a cabo un tipado de aislados con fines epidemiológicos basándose en los perfiles biológicos (biotipo), en la sensibilidad a antibióticos (antibiotipo) y serológico (serotipo), mientras que el laboratorio de referencia aplica normalmente métodos de tipificación más precisos tales como, sensibilidad a fagos (fagotipia), sensibilidad o producción de bacteriocinas (bacteriocinotipia), resistencia a productos químicos (resistotipia) o análisis de DNA.¹⁰

CARACTERIZACION FENOTIPICA

Desde hace varias décadas la identificación y clasificación taxonómica de los microorganismos se llevaba a cabo por análisis fenotípico,¹¹ y ha servido de base, durante todos esos años, para la evaluación epidemiológica. En los últimos años la biotipificación, la susceptibilidad a los antimicrobianos, la serotipia, fagotipia y la electroforesis de enzimas, son las pruebas más frecuentemente usadas para el seguimiento epidemiológico.^{12,13} Sin embargo, todas

las pruebas fenotípicas tienen una desventaja, las características observadas que van a servir de base para la identificación del germen, son solamente una expresión que esta por debajo de la caracterización genotípica, lo que ha conducido a que los niveles moleculares sean llevados hacia la identificación genética del organismo, por lo que una comparación de rasgos fenotípicos no refleja el estado genético de un grupo de muestras y en algunas ocasiones da a conocer un cuadro epidemiológico incompleto,^{14,15} pero no hay que desconocer que la caracterización fenotípica de muestras continuas juega un rol importantísimo en el manejo de todas las enfermedades infecciosas y junto con la determinación de la susceptibilidad antibiótica y resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología, sirven como un anuncio temprano de una inminente epidemia.^{16,17}

Biotipia. Emplea un panel de reacciones bioquímicas que producen un código numérico que es usado en el laboratorio clínico para identificar los organismos hasta el nivel de género y especie. En epidemiología es utilizada para la evaluación de situaciones en que se detecta un aumento de frecuencia de ciertas especies acompañada de la presencia de factores especiales como la localización específica en un servicio del hospital. En relación a otros métodos, la biotipificación tiene un pobre poder de discriminación, por lo tanto es raramente usada en la investigación epidemiológica. Puede ser utilizada en la caracterización de *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y estafilocos coagulasa negativos.¹⁸

Susceptibilidad a los antimicrobianos. Es el tipado de aislados por sus patrones de resistencia a antibióticos. Es muy utilizado en los laboratorios hospitalarios donde no suele haber acceso a otros métodos de tipificación más complicados. En muchos casos, los patrones de sensibilidad son relativamente estables y se correlacionan muy bien con los resultados de otros métodos de tipificación, sin embargo, la susceptibilidad antimicrobiana es una característica inestable y por lo tanto no es un método de tipificación indicado en epidemiología.^{18,19}

Serotipia. Es uno de los más viejos métodos de tipificación. Consiste en el tipado por determinación de antígenos somáticos (O), flagelares (H), capsulares (K) y de pared o membrana externa. Este método puede producir rápidos y reproducibles resultados. Es utilizado tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, determinando en unas ocasiones solo los antígenos somáticos y en otras, los somáticos y alguno de los otros. En algunos casos, los resultados de la serotipia tienen correlación con la virulencia o con el síndrome clínico, como por ejemplo la *E. coli*

O157:H7 es causa de diarrea y de síndrome hemolítico urémico. Sin embargo, este método tiene limitado poder discriminatorio en muestras dentro de un serogrupo.¹⁸

Los organismos que son rutinariamente analizados por serotipia incluyen al *S. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella species*, *Shigella species*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria meningitidis*. Están disponibles reactivos serológicos para tipificación de algunas especies, sin embargo, algunos reactivos estandarizados no sirven para identificar otras especies, por lo tanto muchas muestras de algunas especies, incluido el *Haemophilus influenzae*, son no tipables. Otros organismos como el *S. aureus* no tienen la suficiente heterogenicidad antigénica para dar un adecuado poder discriminatorio.¹⁸

Una variedad de la serotipia es la prueba conocida con el nombre de "quellung" o hinchazón de la cápsula en organismos como *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella*, en los que esta adquiere una presencia muy significativa.^{20,21}

Fagotipia. Consiste en reconocer los aislados por los patrones de lisis obtenidos al aplicar sobre ellos un juego de fagos conocido. Ha sido aplicada en gran cantidad de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas pero sobre todo en *S. aureus*,²² para el que existe un juego internacional de fagos que se aplica por igual en todos los países (Figura 1). En los últimos años se ha desarrollado una nueva modalidad de este método denominada "Fagotipia Inversa",²³ que consiste en inducir la liberación de los fagos de aislados y estudiar los patrones de lisis que producen sobre una serie de cepas conocidas.

Bacteriocinotipia. Este método se basa en la propiedad de algunas especies bacterianas de producir unas sustancias, las bacteriocinas, capaces de inhibir el crecimiento de organismos cercanos pero no a los que derivan de la misma célula parenteral. Al igual que la fagotipia se puede realizar por el método directo (efecto de las bacteriocinas producidas por varias cepas patrón sobre los aislados a tipar) o por el método indirecto (induciendo la liberación de bacteriocinas de los aislados a estudiar y analizando los patrones de inhibición que producen sobre una serie de cepas conocidas). Este método es utilizado para *P. aeruginosa* (piocinotipia),²⁴ *S. marcescens* (marcescencinotipia),²⁵ *E. coli* (colicin tipado)²⁶ y *Shigella sonnei*.²⁷

Análisis de DNA. Consiste en analizar la presencia de material genético común entre los aislados ya que se ha demostrado que existe transferencia de DNA entre distintos organismos, independientemente de la presencia o ausencia de plasmidos. Estos fragmentos de DNA transferible reciben el nombre de

transposones²⁸ y su estudio se lleva a cabo por técnicas de hibridación de DNA (midiendo el porcentaje de reasociación) o por endonucleasas de restricción (analizando los fragmentos de DNA comunes). El análisis de DNA está siendo ya aplicado como método de tipificación en epidemiología hospitalaria y abre nuevas expectativas en el estudio de los genes que codifican para resistencia a antibióticos, lo que permite trazar su presencia en el medio hospitalario y por tanto su control y probable eliminación.

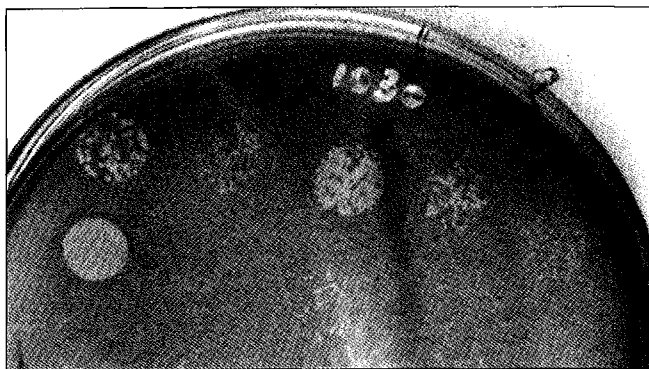


Figura 1. Fagotipia Directa. Efectos de lisis de fagos del juego internacional de *S. aureus* de una cepa control. (Cortesía Dra. Ana Vindel, Servicio de Bacteriología, Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid)

Electroforesis de enzimas. Electroforesis en gel de polyacrylamide. (PAGE). Este método separa las proteínas celulares o de membrana de acuerdo a su respectivo peso molecular. Identifica especies de algunos organismos que son difíciles de evaluar por métodos de laboratorio de rutina y puede detectar diferentes muestras dentro de las especies, sin embargo, el método posee patrones que siempre son complicados y difíciles de interpretar.^{29,30}

Immunoblotting (Western Blot). Un inmunoblot es preparado por transferencia de material celular a través de una membrana de nitrocelulosa después de haber sido separado electroforéticamente por PAGE (Western Blot). La membrana de nitrocelulosa cuando reacciona con anticuerpos, una enzima antisuero y un sustrato, cambia de color. Este método es utilizado en el estudio de *C. difficile* y *S. aureus*. Esta prueba es relativamente barata y rápida, sin embargo, se necesita experiencia para interpretar los resultados.¹⁸

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE). En este método, diferentes organismos son analizados por la movilidad de sus numerosas enzimas metabólicas en un gel de almidón. La localización de cada enzima es detectada por exposición del sustrato en el gel, lo que produce una reacción a color con las enzimas

específicas. La movilidad de las enzimas reflejan variaciones en numerosos locis genéticos. El panel de movilidad produce un tipo de electroforesis para cada muestra. Se puede utilizar análisis matemático para cuantificar la diferencia entre dos muestras con diferentes tipos de electroforesis. Este método permite analizar rigurosas variaciones genéticas dentro de las especies, sin embargo para algunas de ellas, éste método puede tener menos poder discriminatorio que otros.¹⁸

CARACTERIZACION GENOTIPICA

En la actualidad existen varios métodos de tipificación genotípica que son aplicados según el desarrollo y grado de complejidad de el laboratorio de referencia, citaremos los principales.

Análisis Plasmídico. Desde la década de los 70 la biología molecular comenzó a aplicarse en las áreas clínicas incluyendo el análisis epidemiológico. Los primeros estudios en donde se aplicó la primera generación de las técnicas moleculares epidemiológicas, se basaron en los descubrimientos de Meyers y Falkow,³¹ que aplicaron un método rápido y barato para identificación bacteriana, basado en la determinación del contenido de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa. Inicialmente solo pudieron conocer que existía un transporte de plásmidos en las muestras bacterianas.^{32,33} Los plásmidos están compuestos por ácido desoxirribonucleico (DNA) extracromosomal, que puede ser extraído de la bacteria y separado por electroforesis en gel de agarosa. Estos plásmidos son detectados por la presencia de manchas características en gel con bromuro de etidio y exposición de éste gel a luz ultravioleta. El perfil plasmídico está determinado por el número y el tamaño de plásmidos presentes.

El propósito principal, en el campo epidemiológico, es la identificación de cepas bacterianas transmitidas de paciente a paciente que tengan igual contenido plasmídico, pero como los plásmidos son moléculas transitorias que pueden aumentar o disminuir y están sujetas a reordenamiento constante dentro de la bacteria, resulta difícil su interpretación. El poder discriminatorio de este método mejoraría si se sometiera al DNA plasmídico a digestión con enzimas de restricción antes de la electroforesis, sin embargo, algunas cepas bacterianas pueden llevar solamente un plásmido no detectable, lo que limita la utilidad del método para análisis epidemiológico. Su reproducibilidad es pobre porque los plásmidos circulares pueden existir en forma molecular y migran

de diferente manera durante la electroforesis, de tal modo que un plasmido puede producir diferente número de bandas en cada test.

Análisis de plasmidos por endonucleasas de restricción. El ADN plasmídico puede estar cortado en una secuencia específica de nucleótido por enzimas llamadas endonucleasas de restricción. Este paso adicional elimina los problemas de interpretación causados por el ADN plasmídico circular, produce patrones firmes por electroforesis y da una mejor discriminación y reproducibilidad por lo que es el método de análisis plasmídico más utilizado en la actualidad. Comparado con los otros métodos, este método es técnicamente simple, barato y rápido. Ha sido utilizado en algunos estudios para la identificación epidemiológica de algunos organismos especialmente estafilococos.

Enzimas de restricción. El cromosoma bacteriano es la molécula de identificación más importante dentro de la célula y una de las últimas medidas para interrelacionar diferentes aislados o muestras. Los esfuerzos iniciales para identificar esta molécula pueden ser considerados como la segunda generación de las técnicas moleculares epidemiológicas de identificación bacteriana. Todas las células bacterianas poseen ADN cromosomal y pueden ser analizadas teóricamente por cada una de estas técnicas. En estos procedimientos la totalidad del ADN de un aislado es digerido con enzimas de restricción dando como resultado un patrón con fragmentos de diferente extensión que pueden ser separados y comparados por electroforesis en gel de agarosa. Una ventaja de este método es que todas las muestras son tipables, incluyendo aquellas que carecen de plasmidos, mientras que uno de los problemas es que no remueve en su totalidad el ADN plasmídico, de este modo, las muestras que posean genéticamente idéntico ADN cromosomal pueden tener diferentes patrones de restricción causados por la presencia o ausencia de plasmidos.¹⁸

El análisis por endonucleasa de restricción cromosomal es diferente al que se obtiene del análisis por endonucleasa de restricción plasmídico, se caracteriza por la presencia de cientos de bandas, lo que da como consecuencia que su interpretación sea muy difícil y demorada y su evaluación requiera experiencia, por lo que es un método muy poco utilizado, aunque en estudios epidemiológicos con organismos como el *Clostridium difficile* hayan sido de gran utilidad.¹³

Southern Blot. Esta técnica se basa en la utilización de membranas de nitrocelulosa o nylon por donde se filtran los fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel de agarosa. Sirve para investigar con sondas de ADN y ligaduras de cromosomas homólogos o fragmentos de ADN plasmídico.

Cuando la membrana de nitrocelulosa o nylon es expuesta a un film radiográfico, se pueden observar fragmentos de diferente tamaño como bandas negras llamados fragmentos largos de restricción o polimorfismos. Se puede utilizar ADN marcado con radioisótopos o con componentes quimioluminiscentes no radioactivos.¹⁸

Esta técnica también es difícil y toma gran tiempo para su realización en comparación con otros métodos utilizados para tipificación de la mayoría de patógenos intrahospitalarios.

También puede ser utilizada en estos estudios, la inserción de secuencias y transposones que son componentes genéticos dentro del cromosoma. Así por ejemplo, el análisis por Southern blot usando IS6110 como sonda, es el método más utilizado en la actualidad para la tipificación de *Mycobacterium tuberculosis* o el análisis por polimorfismo de restricción de fragmento largo de *mec*, el gen que codifica la resistencia a la meticilina y Tn554 que contiene el gen que codifica la resistencia a la eritromicina, que son usados para la tipificación de *S. aureus*.³⁴

Electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Corresponde a la tercera generación de las técnicas moleculares epidemiológicas de identificación bacteriana junto con el PCR.

Los fragmentos de enzimas bacterianas que por su gran tamaño tienen dificultad de separación utilizando los métodos convencionales de electroforesis en gel de agarosa. Desde la década de los 80, con el desarrollo de técnicas con fragmentos de macro-restricción basadas en la respuesta que dan, según su tamaño, a la electroforesis con corriente de pulsos en diferentes direcciones por diferentes períodos largos de tiempo, se ha podido resolver ese problema.³⁵

Este método es una poderosa herramienta para la tipificación de numerosos organismos. La orientación del campo eléctrico es cambiado o pulsado periódicamente por lo que puede separar grandes fragmentos de ADN. Los organismos a tipificar son depositados en fragmentos de agarosa y el ADN es liberado in situ, minimizando la fragmentación del ADN antes de la digestión con enzimas de restricción. La electroforesis en campo pulsado es un método altamente discriminatorio y reproducible, en teoría puede ser capaz de tipificar todas las muestras bacterianas. Algunos laboratorios de referencia han evaluado este método concluyendo que es excelente para tipificar las bacterias patógenas más comunes incluido el *Mycobacterium avium* (Figura 2). Es un método no muy rápido y requiere equipos relativamente caros.

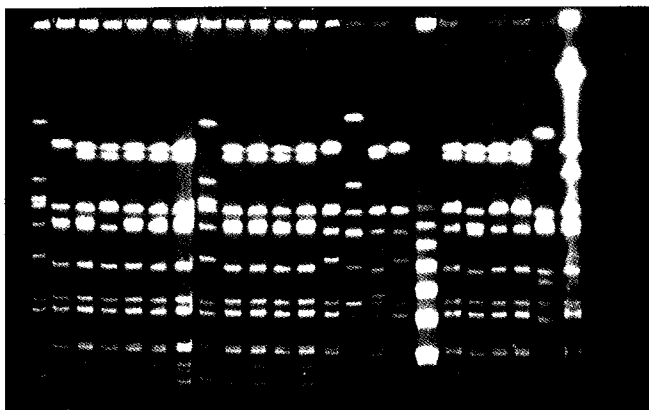


Figura 2. Patrones obtenidos por campo pulsado mediante digestión de cepas de *S. aureus* digeridas con SMA I. Se pueden observar distintos patrones en los cuales se identifica un brote epidémico (Canales 3,5,6,7,9,10,11 y 12 iguales). (Cortesía Dra. Ana Vindel, Servicio de Bacteriología, Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid)

Reacción en cadena de polimerasa (PCR). Como un complemento al desarrollo de la electroforesis en campo pulsado, a mediados de la década de los 80 se desarrolla y aplica para tipificación epidemiológica de las bacterias la reacción en cadena de polimerasa (PCR).³⁶

Económica, rápida y relativamente fácil de realizar, esta técnica tiene muchas aplicaciones incluyendo los análisis epidemiológicos. Utiliza ADN polimerasa y dos iniciadores, oligonucleótidos que corresponden al final de la plantilla o una replicación a amplificación de una secuencia de ADN o una plantilla rápida y exponencial. Los iniciadores representan cualquiera de las secuencias conocidas de ADN cromosomal, que son específicas para cada especie en estudio y no tienen ninguna relación con secuencias seleccionadas arbitraria o randomizadamente. El ADN puede ser digerido con enzimas de restricción y sometido a electroforesis luego de lo cual se pueden analizar los fragmentos de restricción. (Figura 3)

Una de las principales características de esta prueba es la capacidad de detectar ADN en organismos que no han podido ser cultivados, en cambio su mayor problema es la contaminación que fácilmente puede sufrir el ADN, lo que produce falsos resultados.

Actualmente es utilizada para el estudio de bacterias, hongos y virus. En comparación con otros métodos de tipificación, este es un buen método para realizar estudios epidemiológicos, sin embargo, la no reproducibilidad de la técnica ha hecho que su uso sea limitado.¹⁸ Algunos estudios han demostrado que este método es propenso al artefacto y a la variación entre las comparaciones del análisis de las muestras intra e inter laboratorios.³⁷⁻³⁹

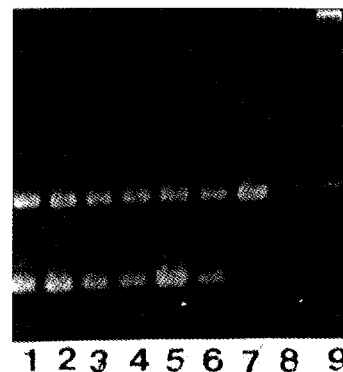


Figura 3. Detección del gen MEC mediante PCR utilizando un gen MEC A de 310 pares de bases y el 16S RNA de 529 pares de bases. Canales 1-6 cepas con gen MEC meticillin resistentes, canal 7 cepa sensible que posee gen RNA meticillin sensible, canal 8 control negativo y canal 9 control de peso molecular. (Cortesía Dra. Ana Vindel, Servicio de Bacteriología, Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid)

Una alternativa para la realización de estudios epidemiológicos es el PCR interrepetitivo, que se basa en la tipificación de la presencia de secuencias cortas extragénicas, las cuales se repiten en varias locaciones cromosomales en una variedad de microorganismos clínicamente importantes. En esta técnica, los primers o iniciadores de PCR, se designan específicamente para alinear las terminaciones de dichas secuencias hacia fuera, permitiendo de esta manera la amplificación de las regiones cromosomales entre ellos,^{37,39} lo que le da un alto grado de homología entre el primer o el iniciador y las secuencias objetivo que permiten que el proceso ocurra a determinadas y estrictas condiciones por lo que el proceso es más confiable.

Las secuencias que se repiten con la suficiente cercanía para permitir la amplificación de las regiones repetitivas pueden ser analizadas comparativamente por electroforesis en gel de agarosa. Por lo tanto, este método solo es aplicable para la tipificación de organismos que contienen un gran número de secuencias repetitivas con distancias interrepetitivas cortas. La relativamente alta exactitud de este acercamiento unida a la velocidad y la economía del proceso de PCR hace que este método sea en la actualidad el más atractivo para el análisis epidemiológico basado en la amplificación de PCR. (Figura 4)

Otro método de tipificación recientemente descrito es el llamado AFLP (amplified fragment length polymorphism),⁴⁰ basado en una combinación de enzimas digestivas de restricción y PCR. En este método el ADN es separado por dos endonucleasas de restricción diferentes, que son escogidas para que corten el ADN a una velocidad distinta que la otra.

Aunque la utilidad de la AFLP esta siendo evaluada en la actualidad, recientes reportes sugieren que este

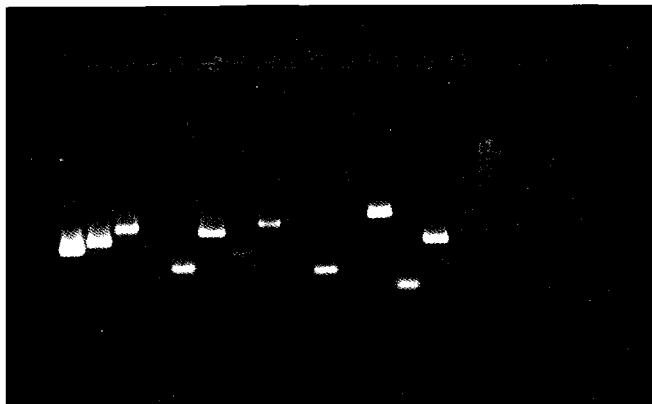


Figura 4. Patrones obtenidos de cepas de *Paeruginosa*, productoras de fibrosis quística, por PCR, utilizando primers específicos para la flagelina tipo A y B. (Cortesía Paloma Rius, Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid)

método posee un potencial definido para descubrir las interrelaciones de los patógenos nosocomiales (Figura 5).⁴¹

Epidemiología molecular de cuarta generación: análisis de secuencia de nucleótidos. Como hemos señalado anteriormente, el cromosoma es la molécula más importante para la identificación de la célula, razón por la cual, la comparación de la secuencia cromosómica es la manera más confiable para estudiar las relaciones potenciales entre los microorganismos causantes de IN. El análisis de las secuencias de nucleótidos es una técnica que está comenzando a ser utilizada como método epidemiológico, en la actualidad ya es considerada como la base de lo que se podría denominar como una epidemiología molecular de cuarta generación.

En la actualidad, la tipificación de secuencia de nucleótidos (MLST) está siendo utilizada solamente para el estudio de *Neisseria meningitidis*⁴² y *Streptococcus pneumoniae*.⁴³ No ha sido rigurosamente evaluada y comparada con la electroforesis en campo pulsado (PFGE) y el PCR y requiere de un experto en la técnica y de la maquinaria necesaria, sin embargo, éste método ha demostrado un potencial de tipificación basado en secuencias que han generado perfiles aislados reproducibles y que tienen una alta capacidad para ser estandarizados.

En el futuro, la tipificación epidemiológica se la realizará mediante el estudio del genoma de los microbios y seguramente se desarrollarán investigaciones basadas en el estudio de chips de ADN, para el análisis de secuencias.⁴⁴

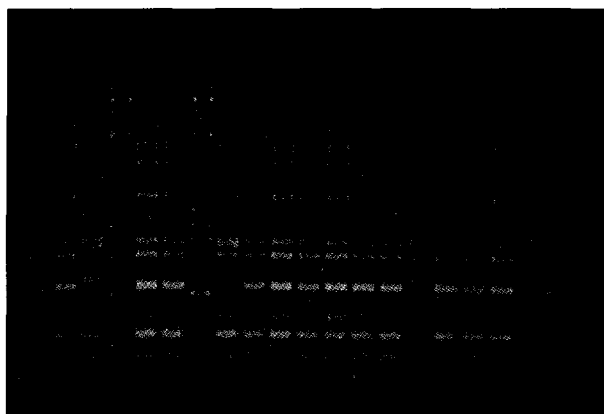


Figura 5. Patrones de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 utilizando la técnica AFLP, digestión con PCT1 y amplificación con primers específicos de NPI. Canales 1 y 2 (desde la izquierda) cepas de origen humano del año 1998, que fueron identificadas como *Legionella pneumophila* serogrupo 1 pontiac, canal 3 cepa ambiental de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 olda, canal 4 control de peso molecular, canales 5 y 6 cepas humana y ambiental de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 pontiac del año 2000, canal 7 control de peso molecular, canal 8 cepa humana y 12 canales con cepas ambientales de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 pontiac, año 2000. (Cortesía de Beatriz Baladron y Carmen Pelaz, Laboratorio de Legionella Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid)

CONCLUSIONES

El desarrollo de la epidemiología hospitalaria basada en el análisis de marcadores epidemiológicos, representa uno de los campos de la microbiología que ha experimentado cambios más notorios en los últimos años. Por una parte, la variedad de organismos implicados en las infecciones hospitalarias aumentan día a día, lo que hace necesario el desarrollo de nuevos métodos para los organismos que van apareciendo y por otra, los métodos utilizados también van evolucionando en el sentido de dar menor importancia a caracteres fenotípicos y mayor importancia a los genotípicos. La aplicación de estos métodos de tipificación, ha pasado de circunscribirse a una determinada especie o grupo taxonómico a aplicarse a organismos menos cercanos, no solo de distinta especie, sino de distinto género, es decir, la evolución de los marcadores epidemiológicos va a pasar de buscar el agente común a buscar el fragmento de ADN común.

Según nuestro punto de vista, los métodos más confiables para realizar tipificación de muestras bacterianas en base a marcadores epidemiológicos son los de tercera generación por ser más baratos y fáciles de realizar, pero tomando en cuenta que deben ser efectuados en un centro de referencia y no en cada hospital, lo cual facilita la utilización e investigación de las técnicas PFGE y PCR, los resultados podrían obtenerse en 1 o 2 semanas, a un costo razonable y pueden incluir comentarios acerca de las interrelaciones de las muestras analizadas además de

- Academic Press. London, New York, San Francisco 1978; 1-38.
24. Gillies RR, Govan JRW: Typing of *Pseudomonas pyocianea* by pyocin production. *J Pathol Bact*, 1966; 91: 339-345.
 25. Farmer JJ: Epidemiological differentiation of *Serratia marcescens*: Typing by bacteriocin production. *Appl Microbiol*, 1972; 23: 218.
 26. Hettiaratchy IGT, Cooke EM, Shooter RA: Colicine production as an epidemiological marker of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol*, 1973; 6: 1.
 27. Morris GK, Wells JG: Colicin typing of *Shigella sonnei*. *Appl Microbiol*, 1974; 27: 312.
 28. Datta N, Hughes VM, Nugent ME, Richards H: Plasmids and transposons and their stability and mutability in bacteria isolated during an outbreak of hospital infection. *Plasmids*, 1979; 2: 182-196.
 29. Tabaqchali S: Epidemiologic markers of *Clostridium difficile*. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 192S-199S.
 30. Tanner AR: Characterization of *Wolinella* species. *Campylobacter concissus*, *Bacteroides gracilis*, and *Eikenella corrodens* by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 562-565.
 31. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S: Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid the deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 1976; 127: 1529-1537.
 32. Schaberg DR, Tompkins LS, Falkow S: Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 1105-1108.
 33. Taylor DN, Wachsmuth IK, Shangkuan YH, et al: Salmonellosis associated with marijuana: a multistate outbreak traced by plasmid fingerprinted. *N Engl J Med* 1982; 306: 1249-1253.
 34. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, et al: Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993; 259: 227-230.
 35. Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldemberg M, Cantor CR: New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1983; 47: 189-195.
 36. Mullis KB: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56-65.
 37. Arbeit RD: Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 7ma edición. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Washington DC. ASM Press. 1999; 116-137.
 38. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997; 18: 426-439.
 39. Goering RV: The molecular epidemiology of nosocomial infections: an overview of principles, application, and interpretation. In: *Rapid detection of infectious agents*. Specter S, Bendinelli M, Friedman H (eds). New York. Plenum Press. 1998; 131-157.
 40. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al: AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 1995; 23: 4407-4414.
 41. Van Eldere J, Janssen P, Hoefnagels-Schuermans A, Van Lierde S, Peetermans WE: Amplified-fragment length polymorphism analysis versus macro-restriction fragment analysis for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2053-2057.
 42. Maiden MC, Bygraves JA, Fiel E, et al: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 3140-3145.
 43. Enright MC, Spratt BG: A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 1998; 144: 3049-3060.
 44. Ramsay G: DNA chips: state-of-the art. *Nature Biotechnol*, 1998; 16: 40-44.