

**Marcadores Moleculares  
en la Caracterización de  
Aislamientos Microbianos de  
Relevancia Clínica**

# Divergencia evolutiva

- ◆ Recombinación
- ◆ Mutaciones al azar
- ◆ Transferencia horizontal de genes



**DIVERSIDAD  
MICROBIANA**

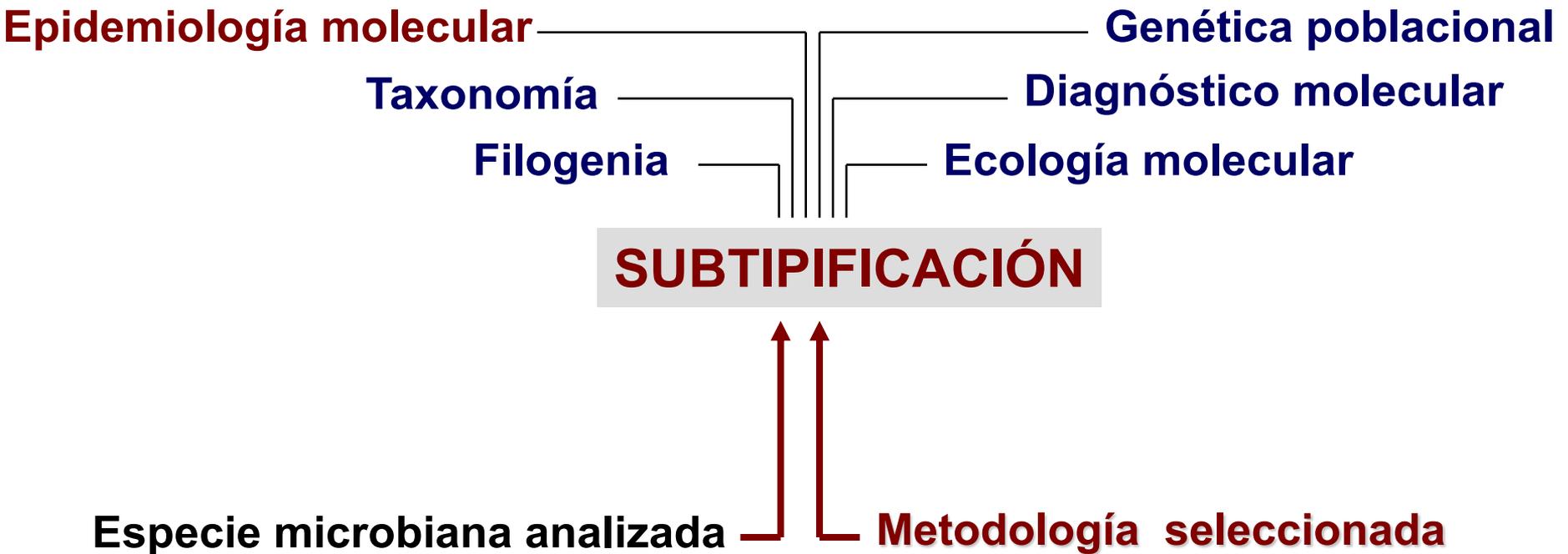


**Marcadores polimórficos**  
en la población, y estables ➤ detectan **clones o grupos clonales**  
para una cepa



**SUBTIPIFICACIÓN**

- Estudio de la patogénesis e historia natural de la infección.
- Investigación de brotes y control de infecciones.
- Establecimiento de estructuras clonales poblacionales.
- Vigilancia de enfermedades infecciosas.
- Análisis de la diseminación y evolución de clones y elementos genéticos.



# Epidemiología molecular en las Infecciones Intrahospitalarias

Establecer metodologías de laboratorio



Discernir si dos o más aislamientos de la misma especie son iguales, similares o distintos



**Relación clonal de los aislamientos**



Relacionados  
epidemiológicamente

No relacionados  
epidemiológicamente



- ✓ Detectar brotes intrahospitalarios y/o epidémicos.
- ✓ Detectar la fuente y/o el reservorio del agente causal.
- ✓ Analizar vías de diseminación de los agentes.
- ✓ Discriminar entre clones epidémicos, endémicos y esporádicos.
- ✓ Establecer la estructura poblacional de una especie microbiana.
- ✓ Detectar genotipos asociados a resistencia o virulencia.



Medidas de prevención y control apropiadas

- ✓ Monitorear la eficacia de las medidas de control.

Cambios genéticos ~~→~~ Efectos fenotípicos  
↓

Sujetos a condiciones ambientales, de cultivo y presión selectiva.

**Métodos genotípicos**

**Métodos fenotípicos**

**Elección de la Metodología**

**Eficacia**

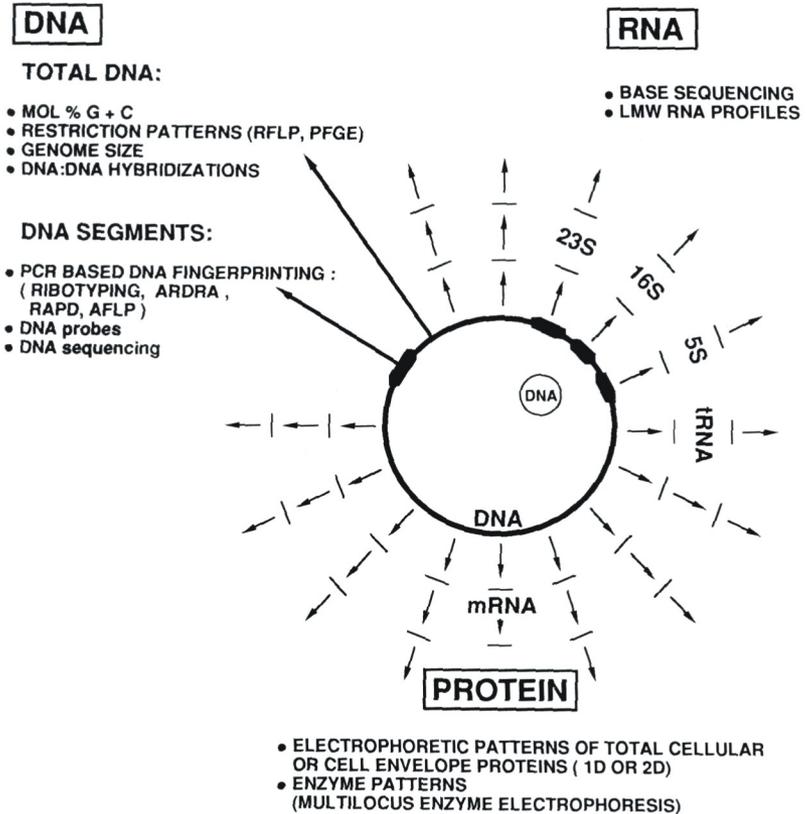
- Poder discriminatorio
- Estabilidad
- Reproducibilidad

**Eficiencia**

- Flexibilidad
- Rapidez
- Disponibilidad
- Bajos costos
- Simplicidad
- Facilidad de interpretación

# Representación esquemática de Marcadores Celulares

## GENOTYPIC INFORMATION



## CHEMOTAXONOMIC MARKERS

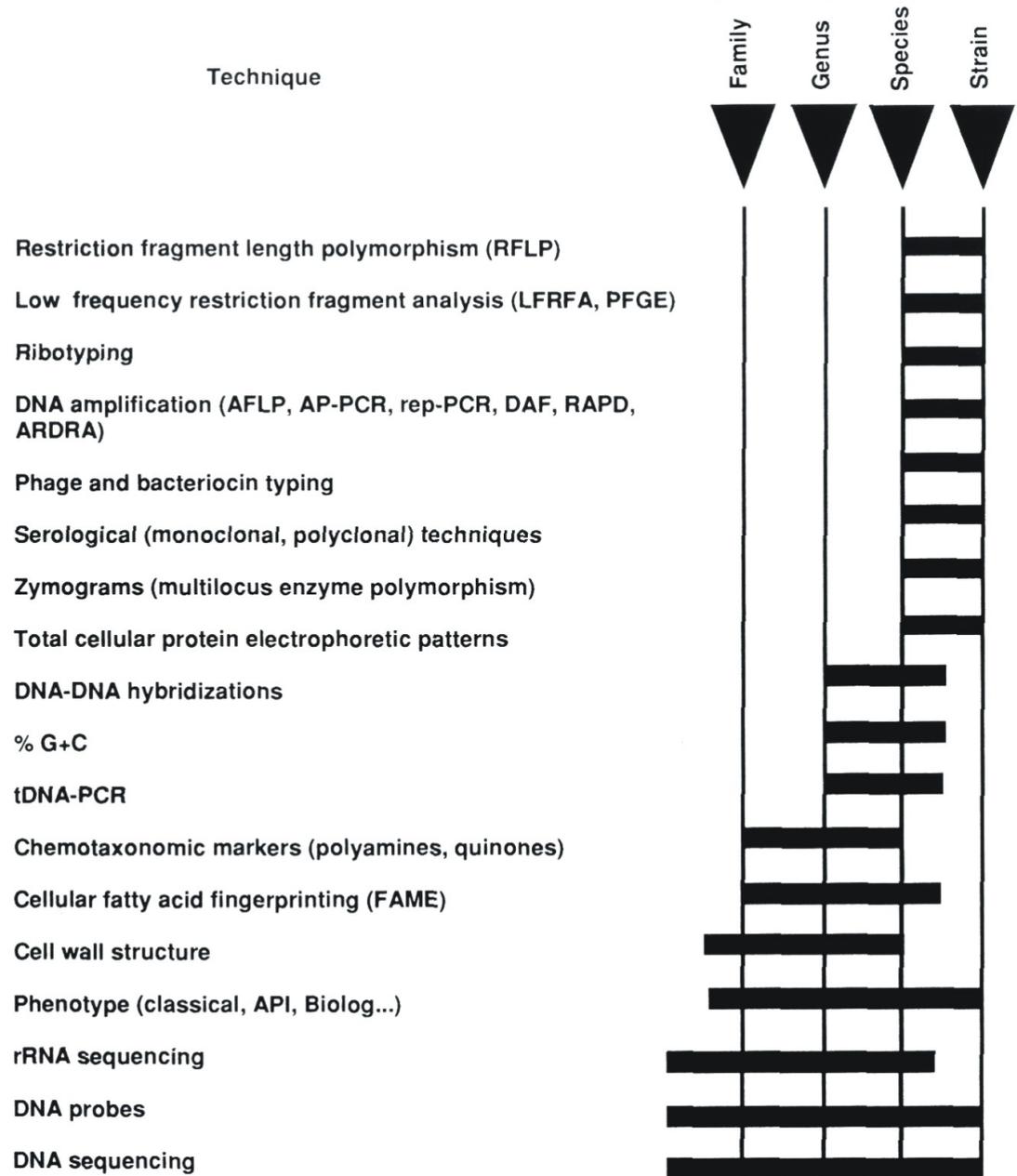
- CELLULAR FATTY ACIDS
- MYCOLIC ACIDS
- POLAR LIPIDS
- QUINONES
- POLYAMINES
- CELL WALLS COMPOUNDS
- EXOPOLYSACCHARIDES

## EXPRESSED FEATURES

- MORPHOLOGY
- PHYSIOLOGY (Biolog, API)
- ENZYMOLOGY (APIZYM)
- SEROLOGY (monoclonal, polyclonal)

## PHENOTYPIC INFORMATION

# Resolución taxonómica de distintas metodologías



# Epidemiología molecular

## Métodos genotípicos (Polimorfismo del ADN cromosomal)

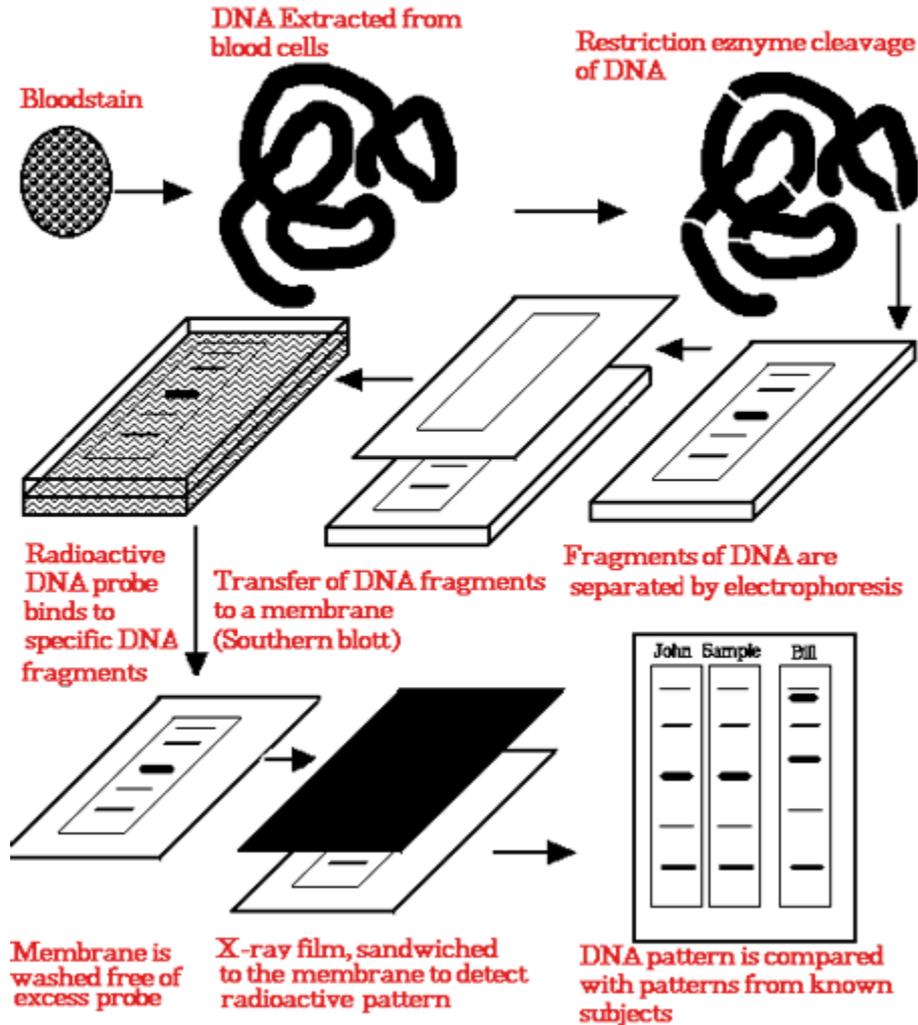
✓ **Digestión** del ADN cromosomal con enzimas de restricción/electroforesis convencional ► Polimorfismo de la longitud en los fragmentos de restricción (**RFLP**)

✓ **Digestión** del ADN cromosomal con enzimas de restricción/electroforesis en campo pulsado ► (**PFGE**)

✓ **Digestión** del ADN cromosomal con enzimas de restricción/electroforesis convencional ► **RFLP** ► Transferencia/Hibridización (Southern Blot). Ej.: ribotipificación (RNAr)

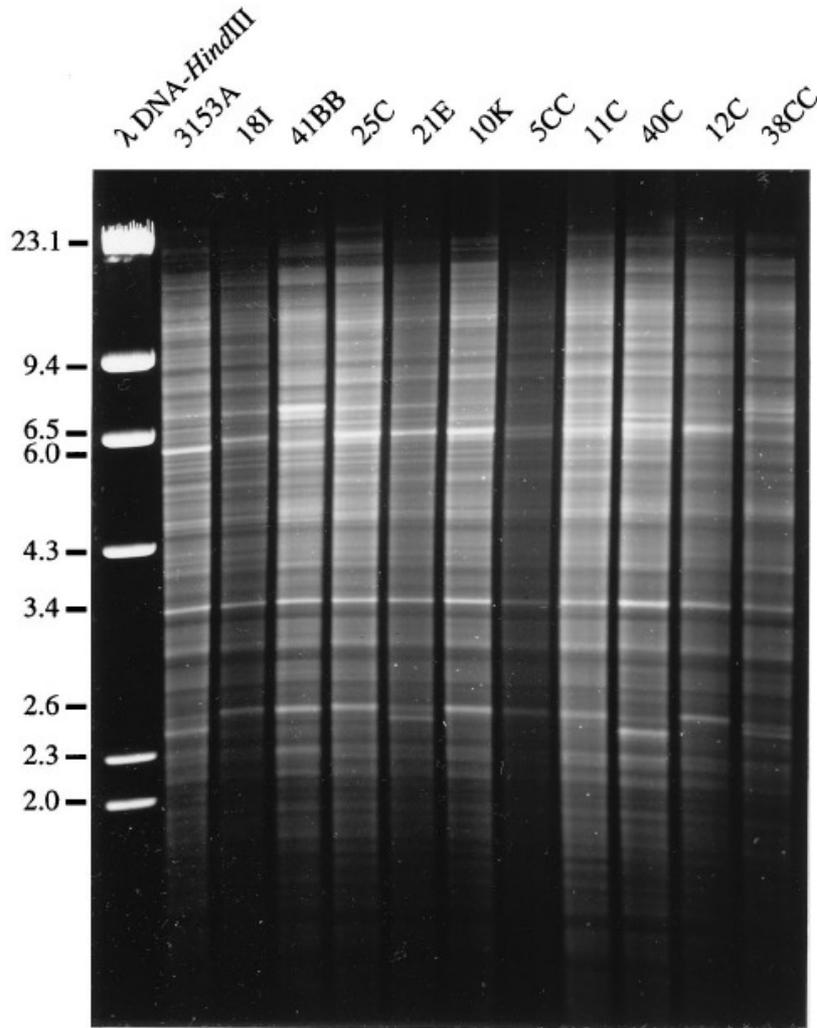
# RFLP

## Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)



# RFLP

## A. RFLP



## B. rDNA Probe

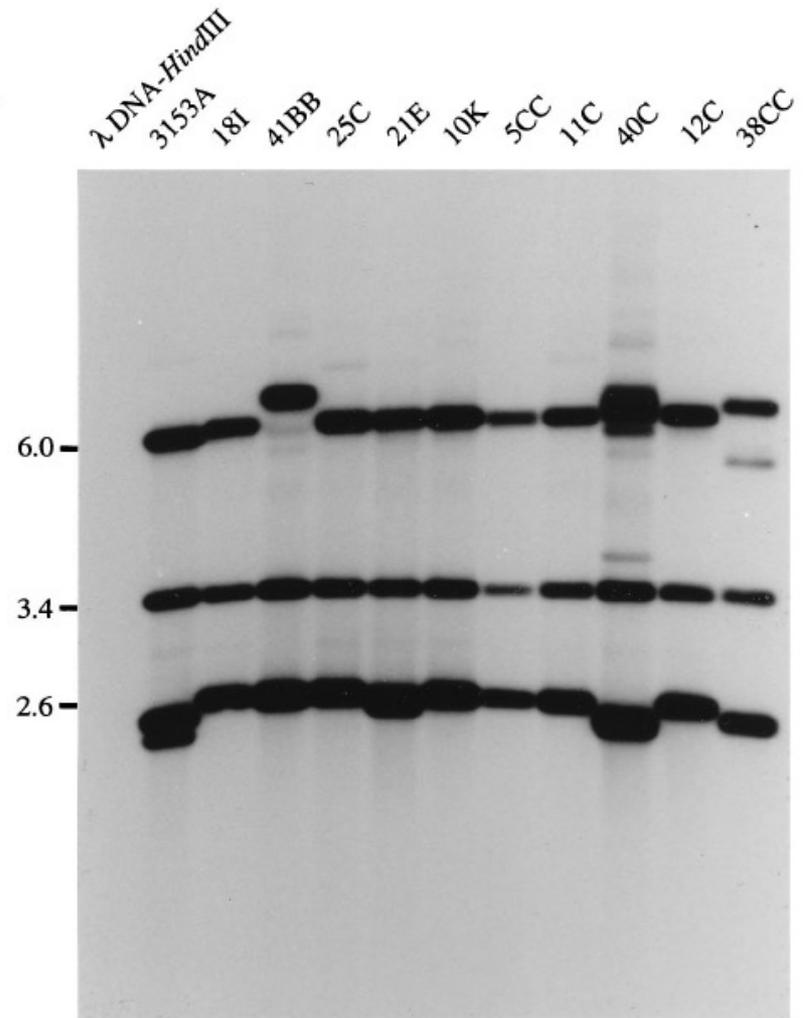


FIG. 3. (A) RFLP patterns for 11 *C. albicans* isolates. In each case, whole-cell DNA was digested with *Eco*RI, electrophoresed in an agarose gel, and stained with ethidium bromide. The resolution of bands in this gel is unusually good. (B) Southern blot hybridization of the gel in panel A with a radioactive ribosomal probe containing 28S, 18S, and 5S rDNA. Note that the most intense bands in the ethidium bromide-stained pattern are ribosomal.

# RFLP

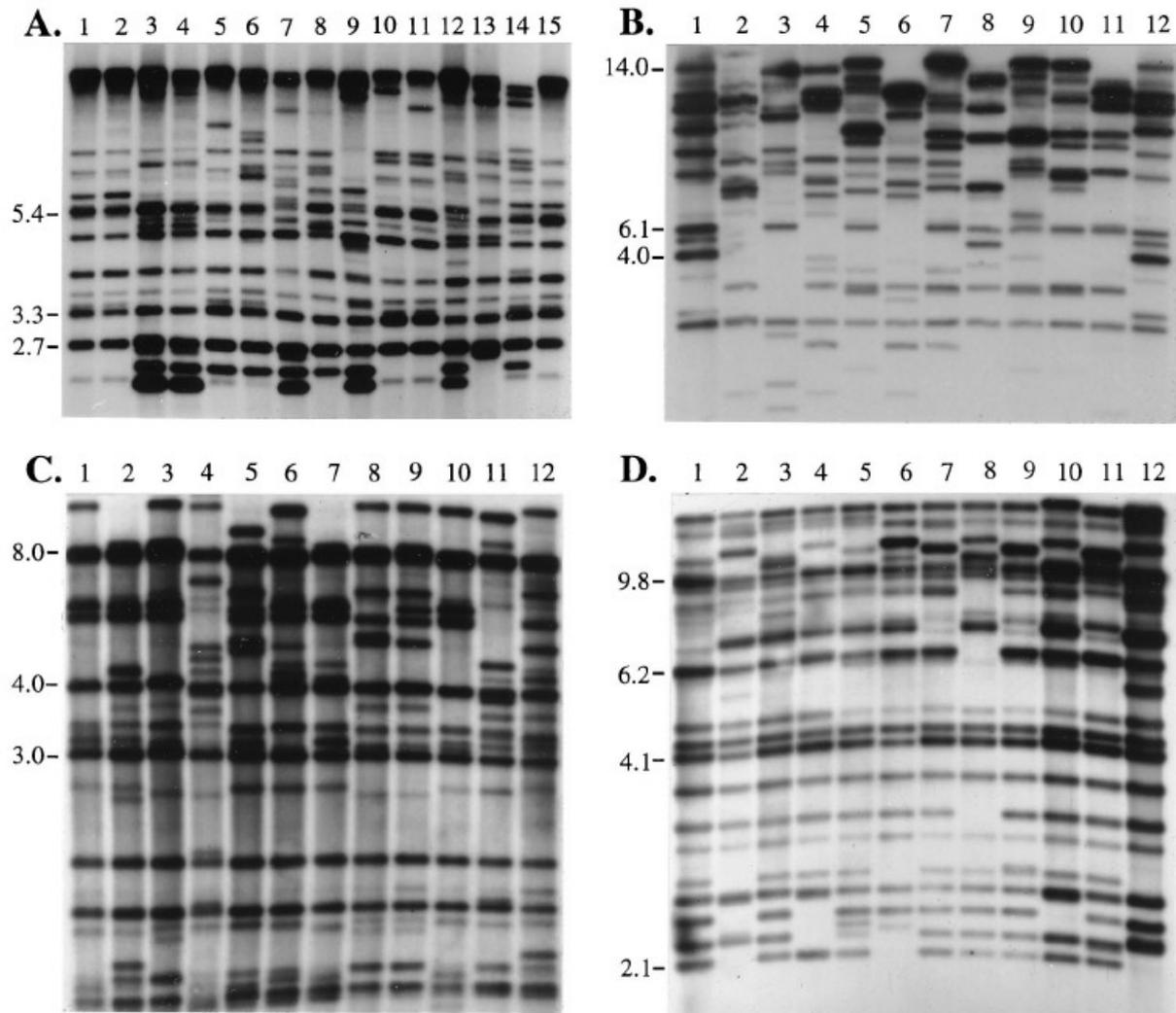
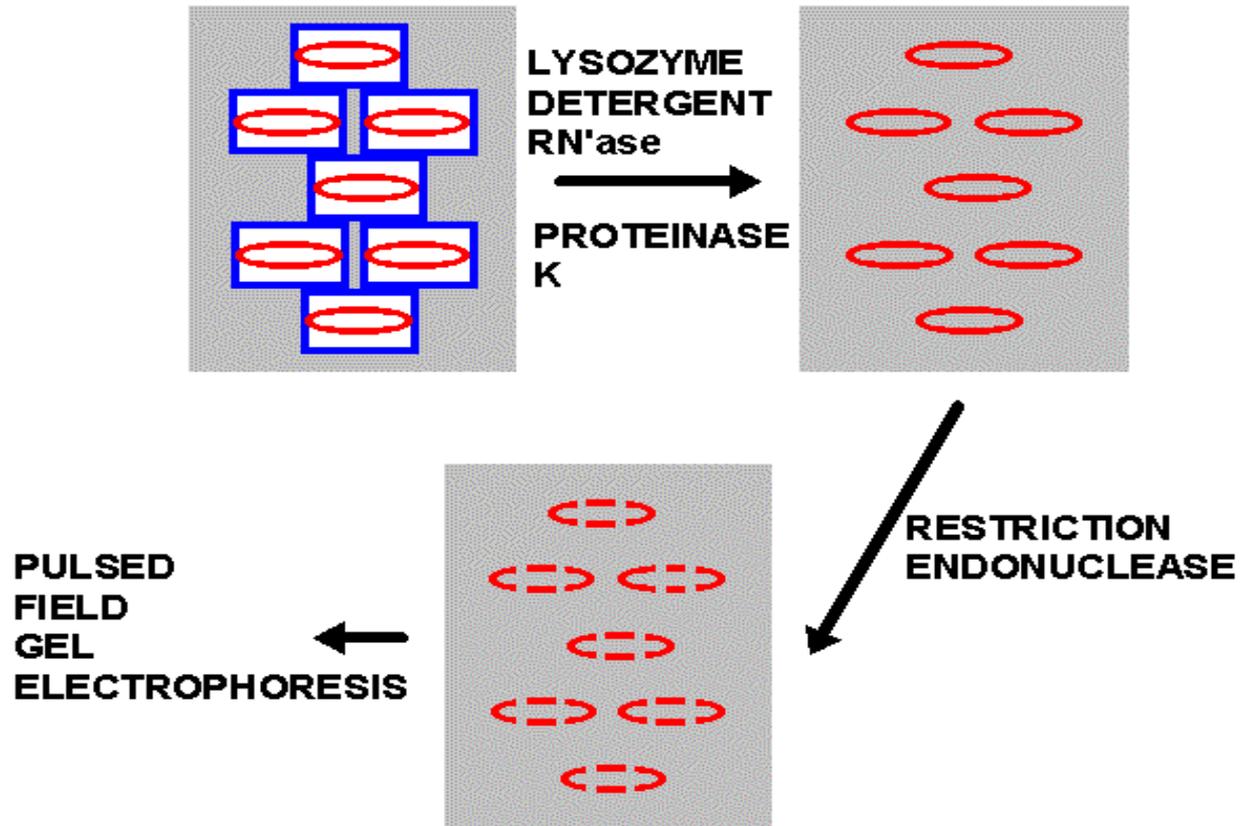
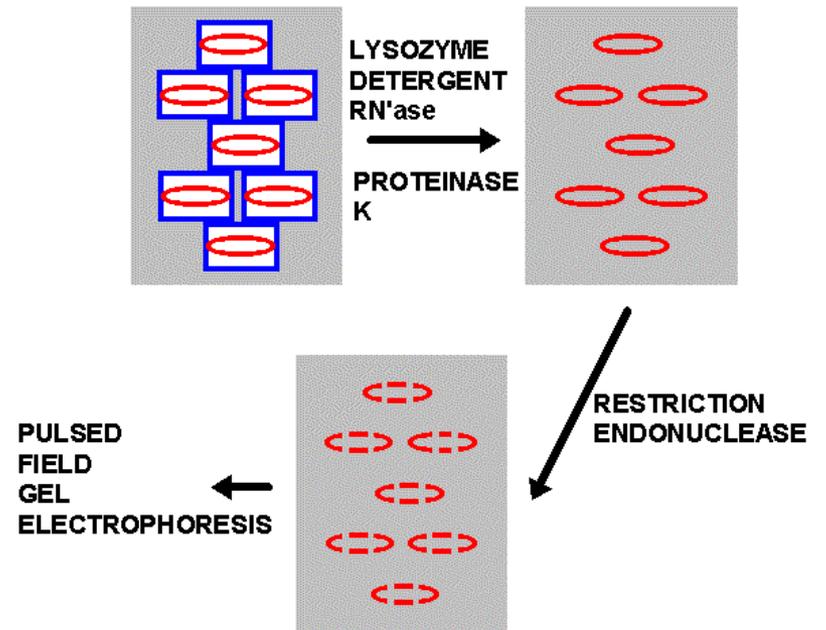


FIG. 6. Examples of Southern blot hybridization patterns generated with the complex probes Ca3 of *C. albicans* (A), Ct14 of *C. tropicalis* (B), Cg6 of *C. glabrata* (C), and Cd25-1 of *C. dubliniensis* (D).

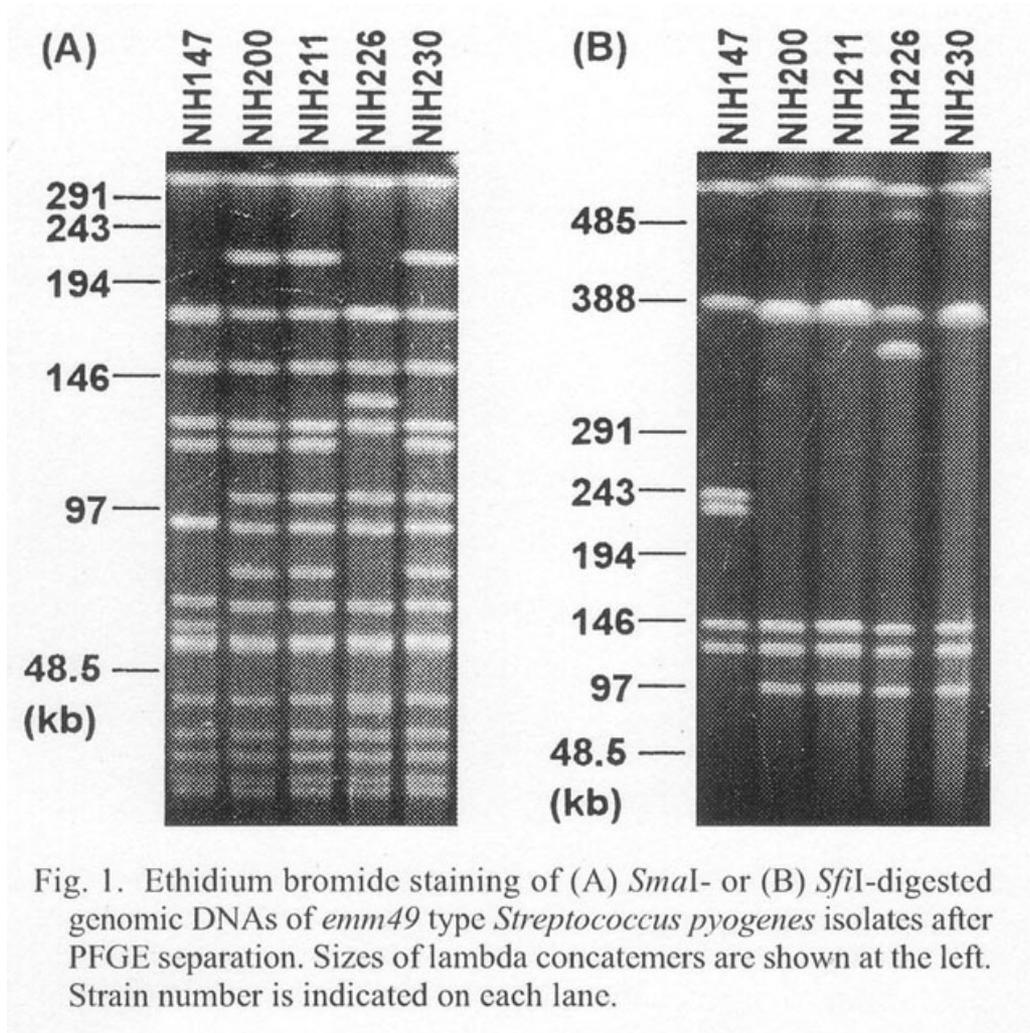
# PFLP (bacterias)



# PFLP (bacterias)



# PFLP (bacterias)

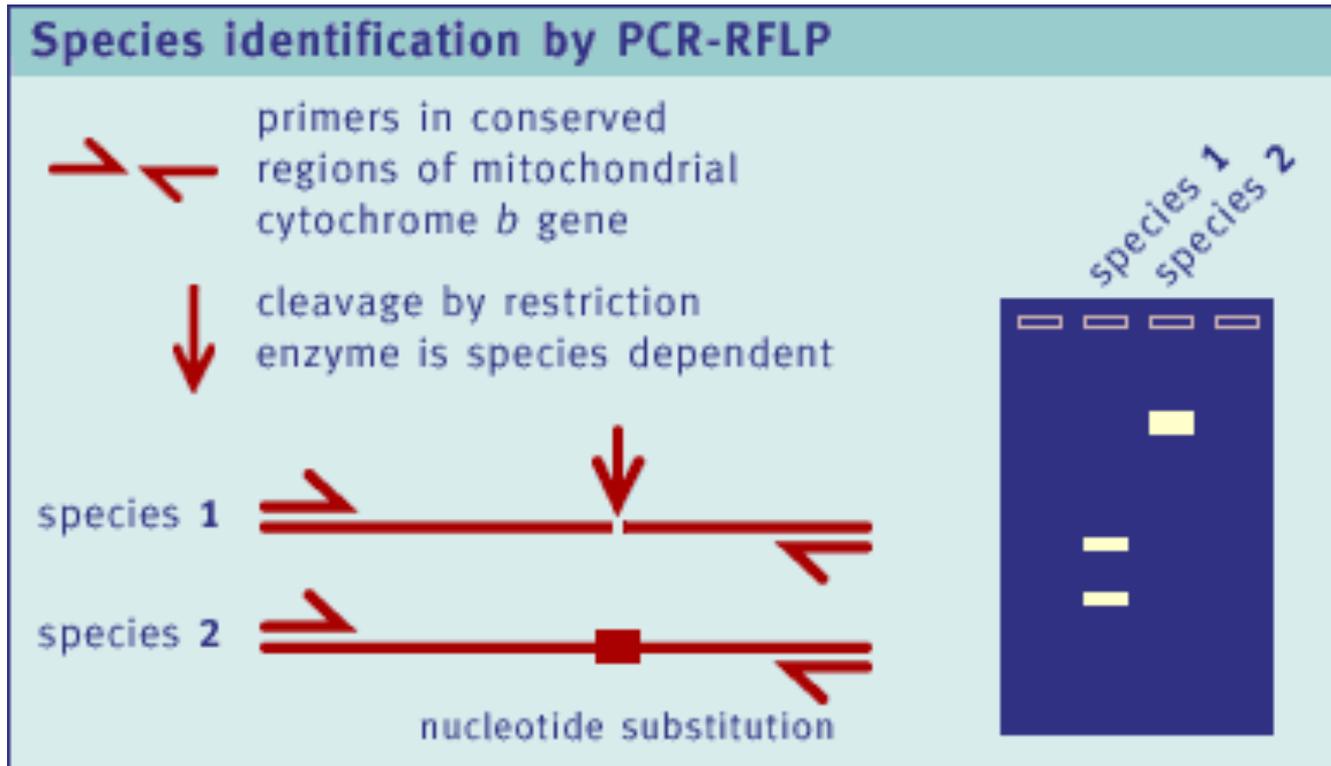


# Epidemiología molecular

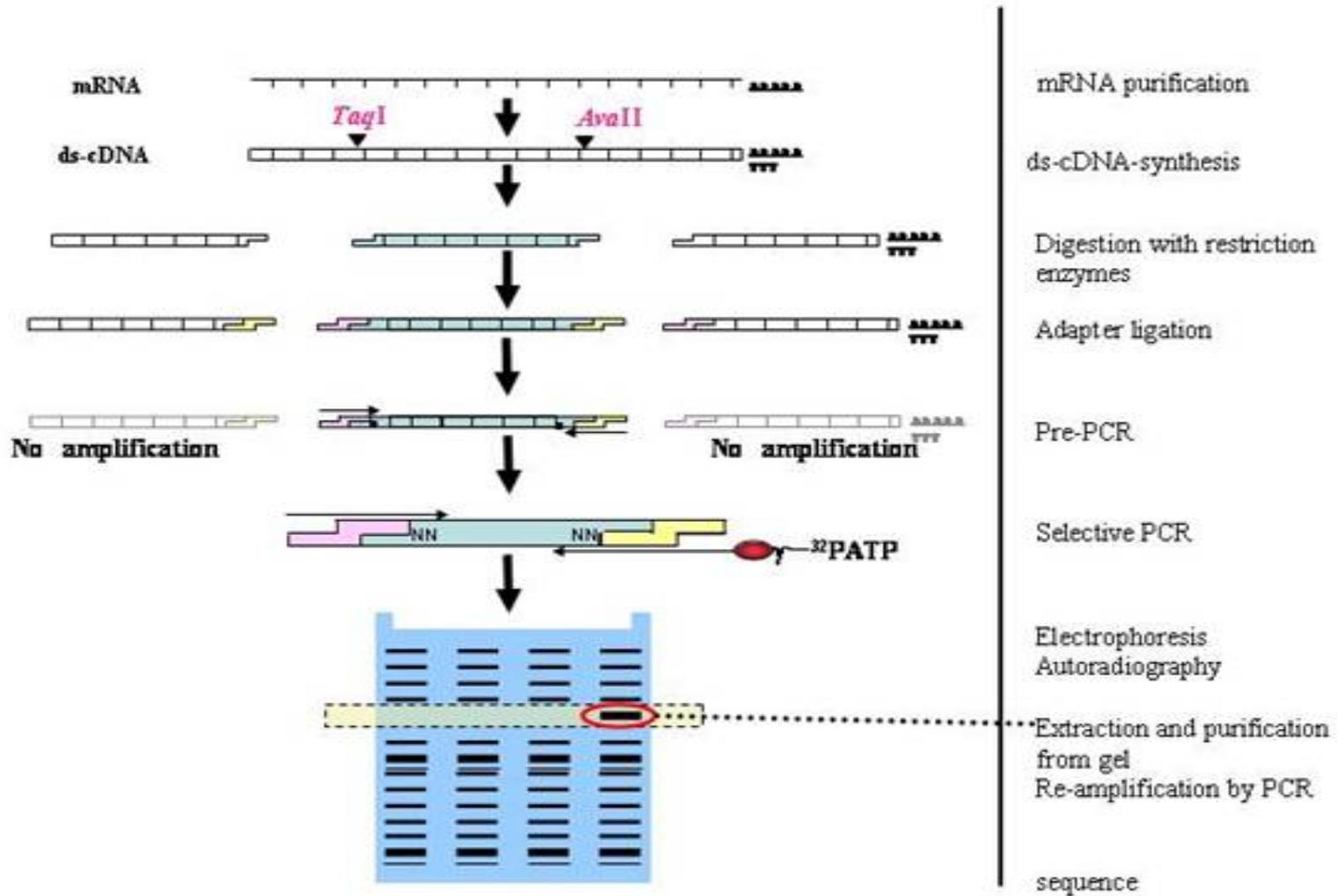
## Métodos genotípicos (Polimorfismo del ADN cromosomal)

- ✓ **Amplificación** del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**).
  
- ♣ **Con digestión del ADN**
  - ✓ PCR y posterior digestión con enzimas de restricción (**PCR-RFLP**)
  - ✓ Restricción del ADN, unión a ligandos y amplificación (**AFLP**)
  
- ♣ **Sin digestión del ADN**
  - ✓ PCR con cebadores únicos, arbitrarios (**AP-PCR, RAPD, DAF**).
  - ✓ PCR con cebadores homólogos a secuencias conservadas repetitivas (**REP-PCR, ERIC-PCR, Rep-PCR, BOX-PCR**).

# PCR-RFLP

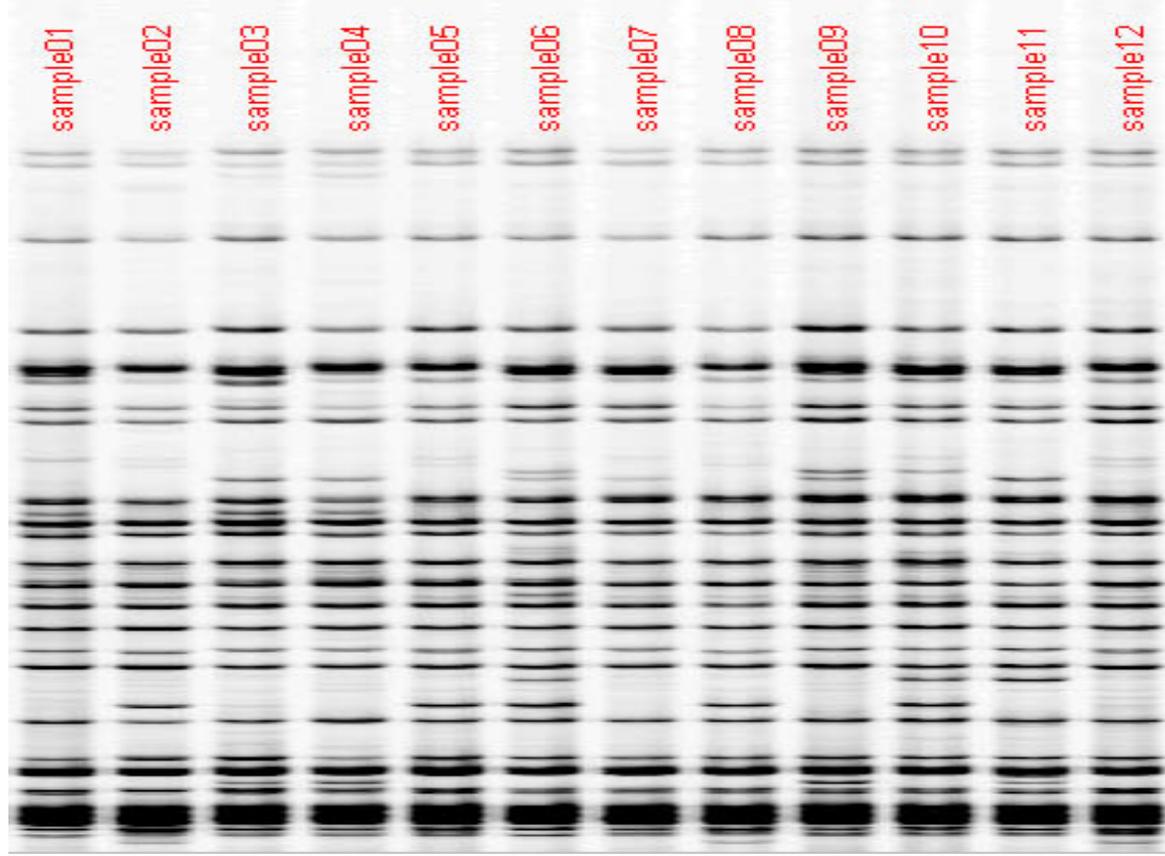


# AFLP



cDNA-AFLPの模式図

# AFLP



# Amplificación de ADN genómico

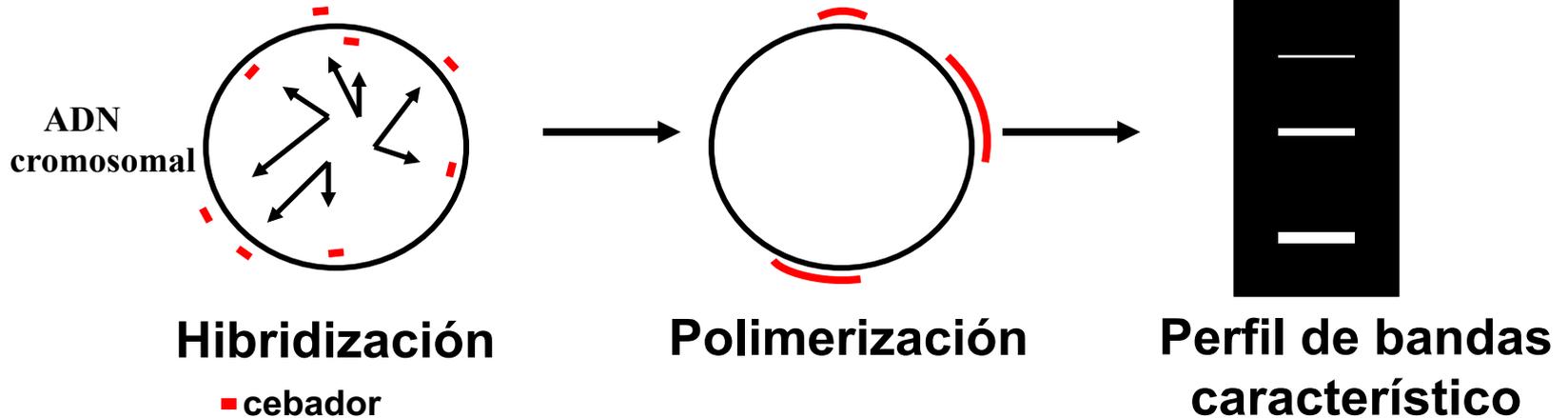
- **AP-PCR** (Welsh *et al.*, *NAR*, 1990)
- **RAPD** (Williams *et al.*, *NAR*, 1990)
- **DAF** (Caetano-Anolles *et al.*, *Biotechnology*, 1991)



- ◆ **Empleo de un único cebador**
- ◆ **Selección arbitraria del cebador**

La utilidad de estos cebadores radica en la posibilidad de amplificar segmentos de ADN en forma reproducible, sin requerir información específica de la secuencia del genoma en estudio

# RAPD



## Parámetros de la reacción

- Características del templado.
- Componentes de la reacción.
- Protocolo de amplificación.
- Atributos del cebador.**



Elevada capacidad de detección de variabilidad genómica.



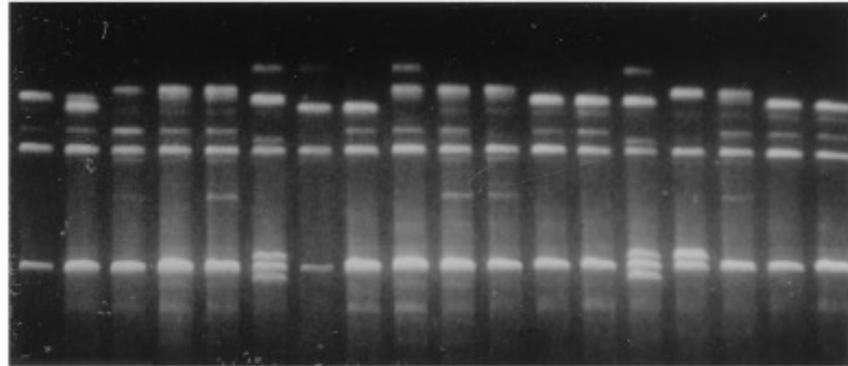
Selección criteriosa de condiciones de amplificación.

**Proceso de ensayo-error**

# RADP

## A. OPE-03

FC-27  
FC-25  
FC-13  
FC-14  
FC-17  
FC-7  
FC-10  
FC-9  
FC-16  
FC-8  
FC-24  
FC-6  
FC-1  
FC-29  
FC-4  
FC-18  
FC-12  
FC-15



## B. OPE-18

FC-27  
FC-25  
FC-13  
FC-14  
FC-7  
FC-10  
FC-26  
FC-16  
FC-9  
FC-8  
FC-24  
FC-6  
FC-1  
FC-29  
FC-4  
FC-18  
FC-12  
FC-15

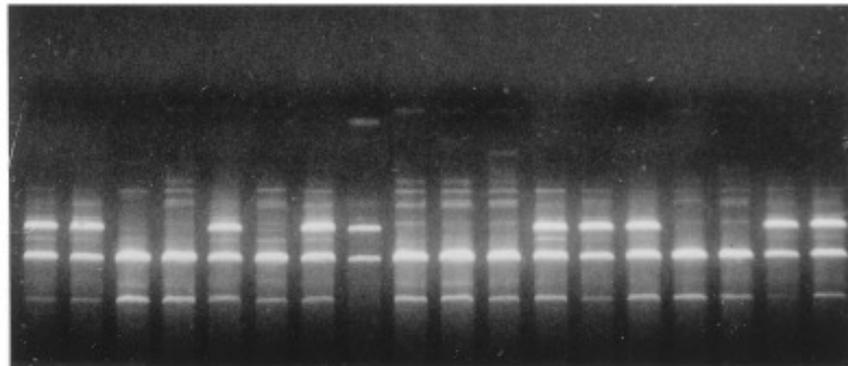


FIG. 9. Examples of RAPD patterns with the primers OPE-3 (A) and OPE-18 (B) for different *C. albicans* isolates. Reproduced from reference 288 with permission of the publisher.

# Epidemiología molecular

## Métodos genotípicos (Polimorfismo del ADN cromosomal)

- ✓ **Secuenciación del ADN**
  - ✓ **Secuenciación de múltiples locus (MLST)**
  - ✓ **Secuenciación y posterior digestión (MLRT)**

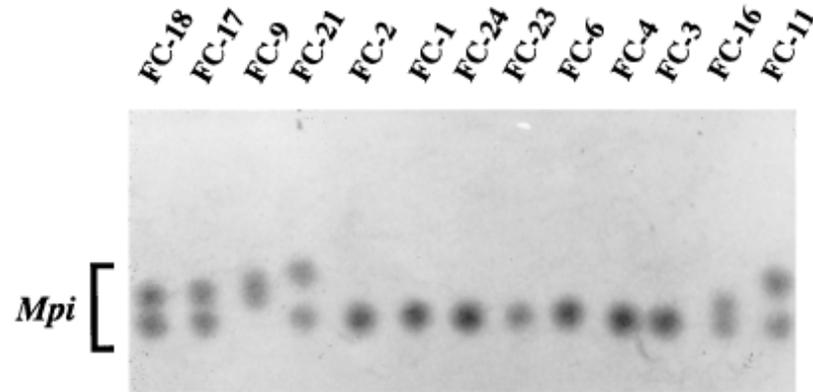
## **MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis)**

**Selander et al., Appl. Environ. Microb. 1986**

- **Detecta diferencias entre cepas de una especie en base a las diferentes movilidades electroforéticas de un conjunto de enzimas constitutivas metabólicas. *Los cambios en la movilidad de las enzimas resultan de la diferencia de cargas debidas a sustituciones aminoacídicas en la secuencia polipeptídica.***
- **Presenta resultados concordantes con algunos métodos genotípicos, y resulta útil para definir estructuras poblacionales. Sin embargo, es lento y poco accesible.**

# MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis)

## A. MPI



## B. HK

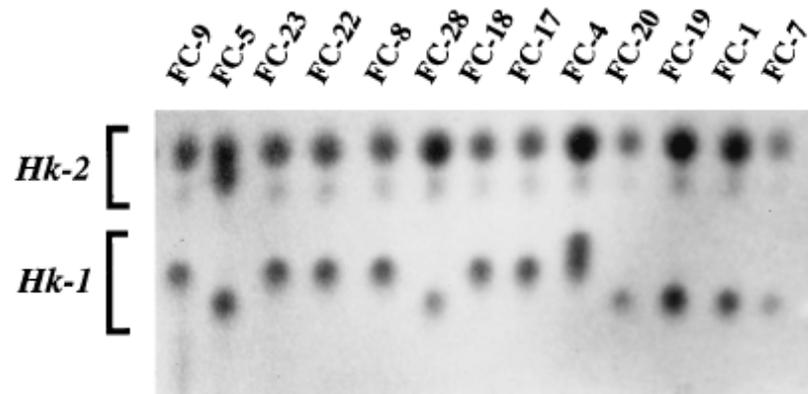


FIG. 2. Examples of starch gel electrophoresis patterns of two enzymes, mannose-6-phosphate isomerase (MPI) (A) and hexokinase (HK) (B), used in an MLEE analysis of 13 *C. albicans* isolates. While the mannose-6-phosphate isomerase activity was expressed by a single locus, the hexokinase activity was expressed by two loci, *Hk-1* and *Hk-2*. Reproduced from reference 288 with permission of the publisher.

## **MLST (Multilocus Sequence Typing)**

**Maiden *et al.*, PNAS 1998**

- **Detecta variaciones alélicas de los genes que codifican un grupo de enzimas constitutivas metabólicas, mediante la secuenciación nucleotídica de dichos fragmentos (usualmente 470 pb de 6 locus).**
- **Por ej. para la tipificación de una población de *N. meningitidis*, se encontraron 17 alelos por locus (1 variación nucleotídica definía 1 alelo nuevo). Potencialmente podrían detectarse 24 millones de STs.**
- **Resulta de utilidad para estudios poblacionales. Sin embargo, es caro y poco accesible.**



# MLST (Multilocus Sequence Typing)

MLST Database browsing

*Streptococcus pneumoniae*

Please enter your search criteria below:

Field (e.g. Country)

Value (e.g. UK)

Draw Tree of Search Results (For 3 or more distinct sequence types)

Average Distance Tree:

[Details of tree drawing program](#)

Results for query: Sequence Type = 18

Sequence Type	Strain Designation	Serotype	Country	Source	Year of Isolation	aroE	gdh	gki	recP	spi	xpt	ddl	Other Comments
18	<a href="#">VH17-14</a>	14.	Spain	Blood	1990.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">VH18-14</a>	14.	Spain	Blood	1990.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">VH20-14</a>	14.	Spain	Blood	1990.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">MS21-14</a>	14.	Spain	Nose	1990.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">MS22-14</a>	14.	Spain	Lung	1990.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">GM23-14</a>	14.	Spain	Blood	1993.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">C39-14</a>	14.	Spain	Blood	1994.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">C30-14</a>	14.	Spain	Eye	1994.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">B25-14</a>	14.	Spain	Sputum	1993.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">T13-14</a>	14.	Spain	Ear	1990.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">T9-14</a>	14.	Spain	Eye	1991.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">GM32-14</a>	14.	Spain	Pus	1990.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">GM24-14</a>	14.	Spain	Blood	1993.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).
18	<a href="#">VH19-14</a>	14.	Spain	Blood	1990.	1	5	4	11	9	3	16	Multiresistant Spanish serotype 14 clone (Spain14-5).



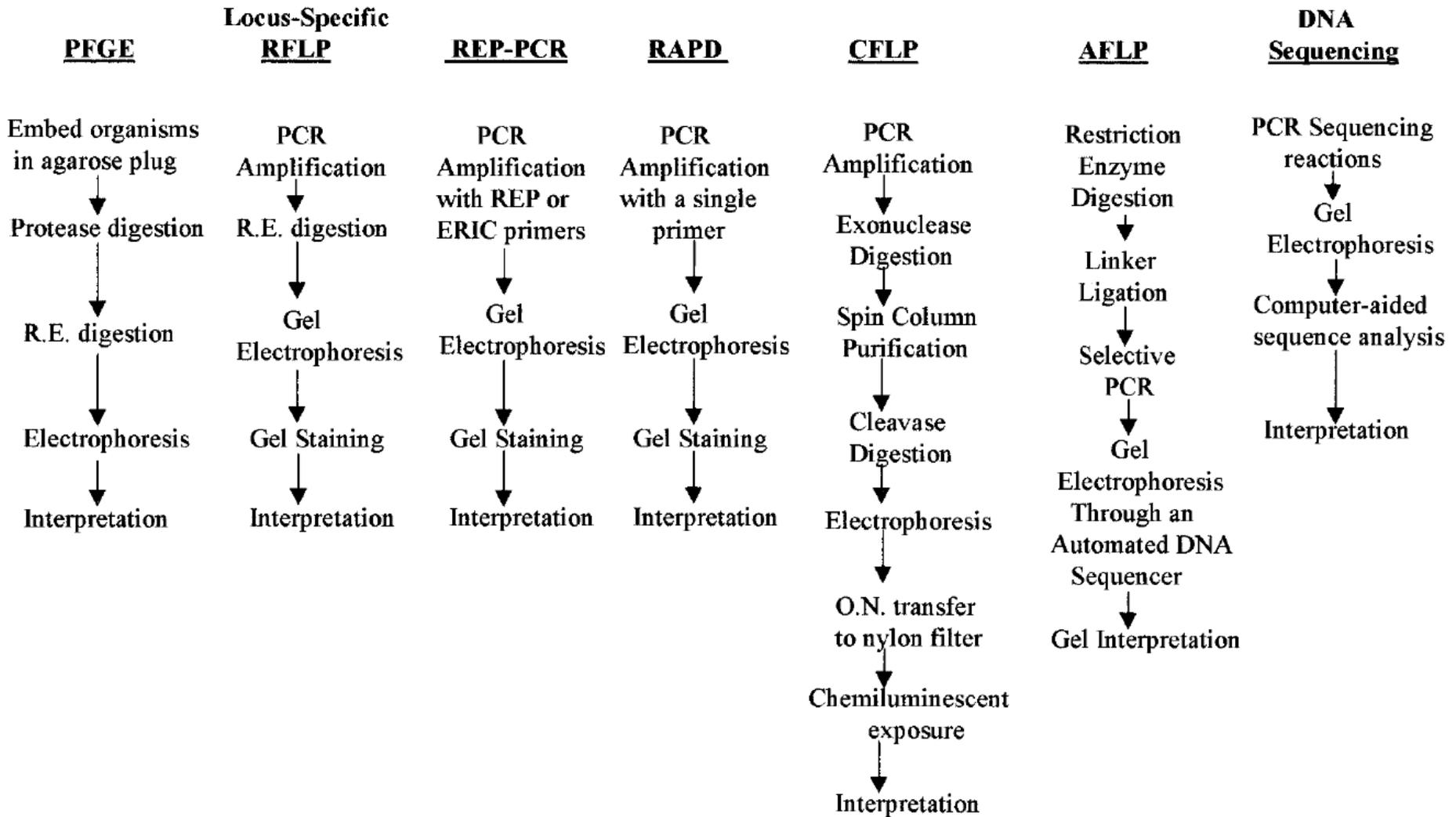


FIG. 1. Comparison of the procedural steps involved in various molecular typing methods. R.E., restriction endonuclease; O.N., overnight.

<b><u>PFGE</u></b>	<b><u>RFLP</u></b>	<b><u>RAPD or REP-PCR</u></b>	<b><u>CFLP</u></b>	<b><u>AFLP</u></b>	<b><u>DNA Sequencing</u></b>
*PFGE Power Supply	*PCR Amplification Reagents	*PCR Amplification Reagents	*PCR Amplification Reagents	*DNA Linkers	*PCR sequencing kits
*Gel boxes	*Thermocycler	*Thermocycler	*Thermocycler	*PCR Amplification Reagents	*Thermocycler
*Proteases	*Oligonucleotide Primers	*Oligonucleotide Primers	*Oligonucleotide Primers	*Oligonucleotide Primers	*Automated DNA Sequencer
*Restriction Enzyme(s)	*Restriction Enzyme(s)	*Gel Box & Low Voltage Power	*20 cm x 20 cm Gel Box	*Thermocycler	*Analysis Software
*Photography System	*Gel Box & Low Voltage Power Supply	*Photography System	*Sequencing Power Supply	*Automated DNA Sequencer	*Computer
	*Photograph System		*Exonuclease I	*Analysis Software	
			*Spin columns	*Computer	
			*CFLP kit		
			*Nylon Membranes		
			*Chemiluminescent Detection Kits		
			*Autoradiography Supplies		

## MINIREVIEW

### Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms

D. MICHAEL OLIVE\* AND PAMELA BEAN  
*Milwaukee Strategic Medicine, Wisconsin 53710*

TABLE 1. Summary of the characteristics of the various molecular typing methods

Methodology	Ease of use	Ease of interpretation	Discrimination power <sup>a</sup>	Time to result (days)	Intralaboratory reproducibility	Interlaboratory reproducibility	Setup cost	Cost per test
PFGE	Moderate	Easy	High	3	Good	Good	Moderate	Moderate
Locus-specific PCR-RFLP	Easy	Easy	Moderate	1	Good	Good	Moderate	Low
Rep-PCR	Easy	Easy	High	1	Good	Moderate	Moderate	Low
RAPD	Easy	Easy	High	1	Moderate	Poor	Moderate	Low
CFLP	Moderate	Moderate	Moderate	2	Good	Poor	Moderate	High
AFLP	Moderate	Easy	High	2	Good	Good	High	Moderate
Sequencing	Difficult	Moderate	High	2	Good	Good	High	High

<sup>a</sup> This table is intended to give a relative estimate of discrimination power. For more exacting comparisons, see the references cited in the text.



**La carencia de un sistema de caracterización de microorganismos de uso universal promueve la elección cuidadosa del mismo, que dependerá de la eficacia/eficiencia que demande el estudio.**

# SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR

## Interpretación de resultados

### ① Cálculo de coeficientes de similitud

Permite cuantificar la similitud entre dos aislamientos.

Ejemplo: Coeficiente de Dice

$$S: \frac{2 \cdot n}{a + b}$$

n: nro. de fragmentos o marcadores compartidos

a y b: nro. de fragmentos o marcadores de aislamientos a y b, respectivamente.

a	b
≡	≡
≡	—
≡	—
—	≡

$$S (a \text{ y } b): \frac{2 \cdot 3}{10} : 0,60$$

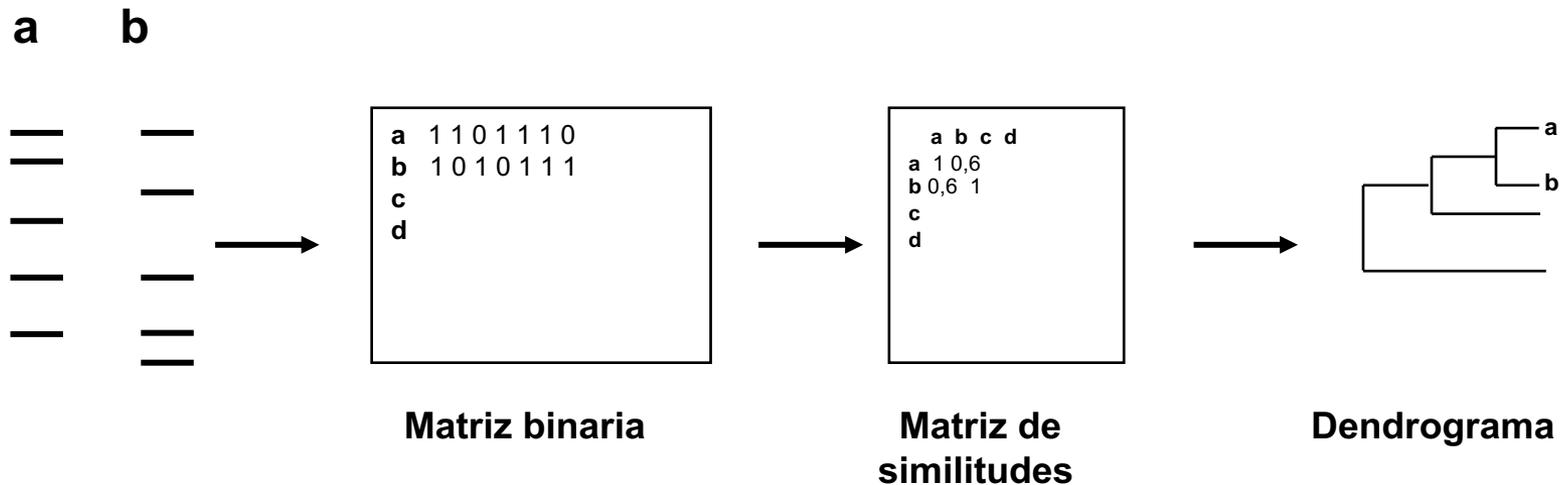
### Criterio sugerido

Aislamientos con  $S > 0,90$  presentan probable relación clonal.

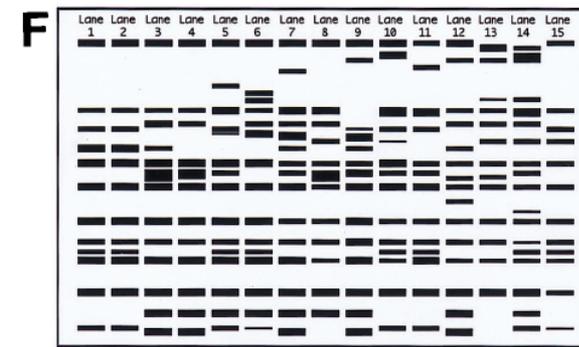
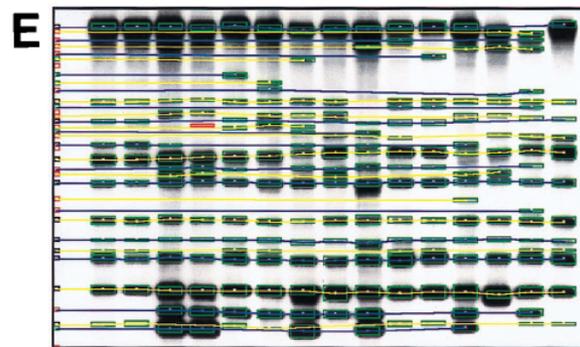
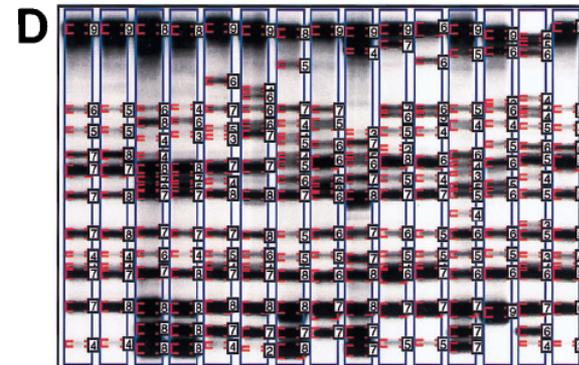
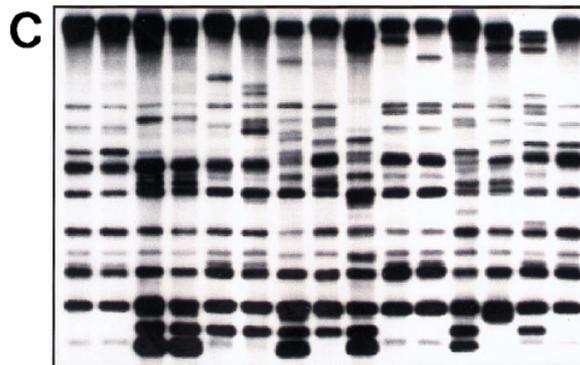
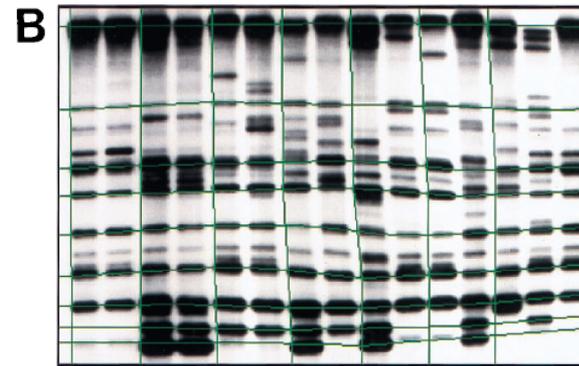
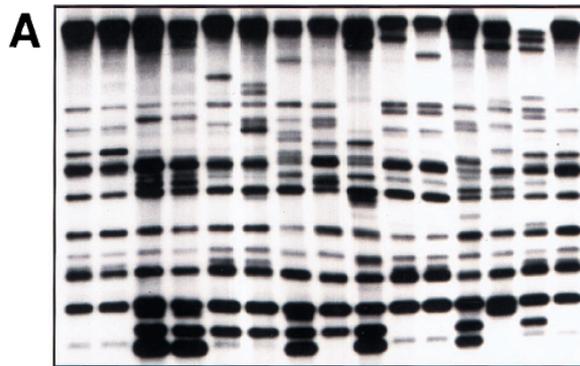
*Discutible, cuando presentan elevada divergencia.*

## ② Construcción de dendrogramas

Permite inferir la relación clonal entre cepas e hipotetizar la estructura de la población bacteriana.



# Análisis automático de polimorfismo y construcción de dendogramas



# Análisis automático de polimorfismo y construcción de dendogramas

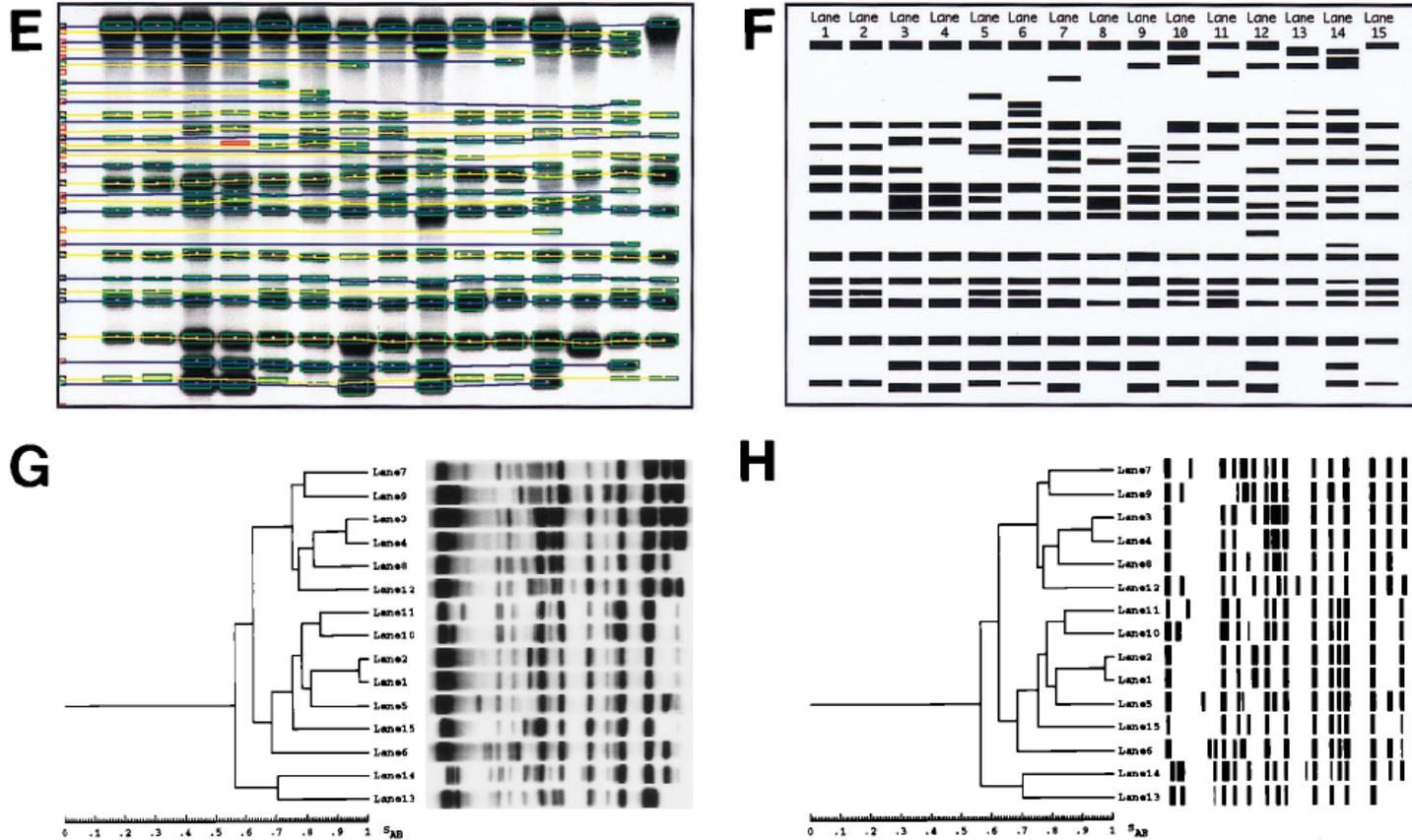


FIG. 11. Image-processing and analysis capabilities of a computer-assisted DNA fingerprint analysis Program. (A) Original digitized image with distortion. (B) The user aligns common bands by drawing horizontal connecting lines and traces interlane junctions. (C) The Program then straightens the gel according to the user-drawn lines. (D) The Program automatically identifies lanes and bands and uses the pixel density to assign an intensity class (1 to 10). (E) The Program then correlates bands with a universal standard. (F) The Program generates a model. (G) The Program aligns processed gel images with isolates in the dendrogram. (H) The Program can also align models with isolates in the dendrogram.

## Dendogramas construidos por distintos metodos

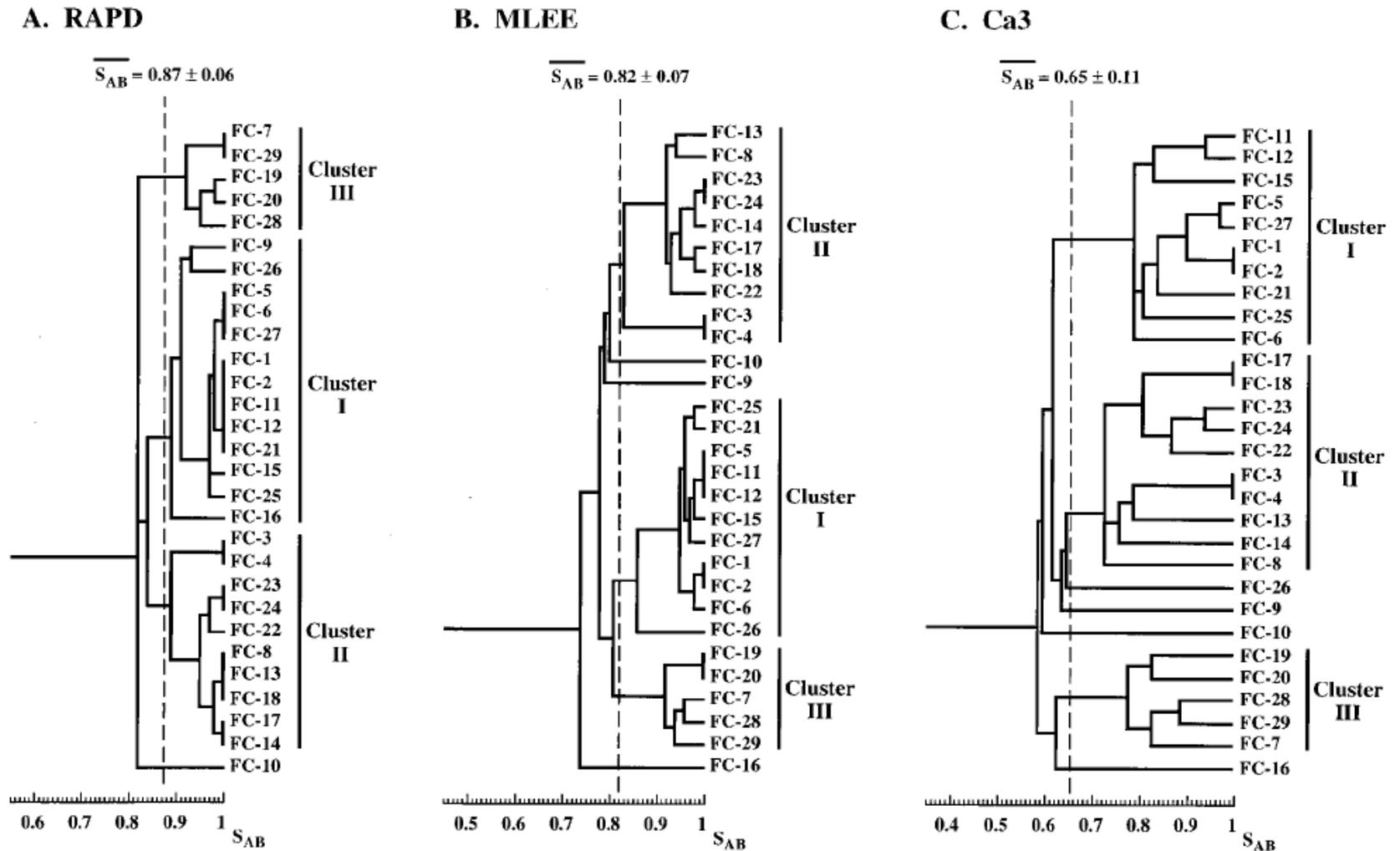
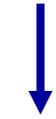


FIG. 8. Dendograms for a set of 29 isolates of *C. albicans* DNA fingerprinted by RAPD (A), MLEE (B), and Ca3 (C). Reproduced from reference 288 with permission of the publisher.

## Proceso de ensayo-error

Optimización de la reacción



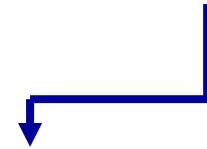
Análisis

Múltiples cebadores

Condiciones de amplificación

Ensayos

independientes



- Productos de amplificación discernibles.
- Polimorfismo entre aislamientos no relacionados.
- Flexibilidad para su aplicación a diferentes microorganismos.

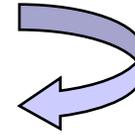
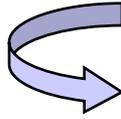
▶ Evaluación de la utilidad del empleo de oligonucleótidos parcialmente degenerados como cebadores de la reacción.



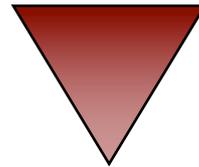
Diseño de metodologías de amplificación de elevada capacidad discriminatoria y amplio rango de aplicabilidad.

Epidemiología clásica

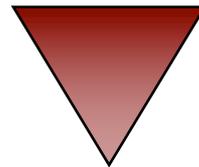
Epidemiología molecular



**Diagnóstico epidemiológico certero**



Revelar problemáticas diversas de la **diseminación clonal** y la **resistencia a antimicrobianos** de microorganismos intrahospitalarios, que conducen al **diagnóstico de la situación**



**Desarrollo de estrategias**



## **Aportes**

- ☺ **Interacción entre médicos infectólogos, enfermeras, y microbiólogos para el diagnóstico de la situación, a través de reuniones periódicas y seminarios conjuntos.**
- ☺ **Toma de conciencia mayor de la emergencia de infecciones nosocomiales provocadas por patógenos multirresistentes, promoviéndose la discusión sobre el empleo racional de antibióticos.**
- ☺ **Adopción de estrategias para el control de la diseminación de microorganismos:**
- ☺ **Formación de recursos humanos en metodologías derivadas de la biología molecular.**