



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

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

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

ALBERTO ALONSO MORALES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NATIVIDAD CASTRO ALARCÓN
CODIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS SILVA SÁNCHEZ

CHILPANCINGO, GRO., OCTUBRE DE 2008.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 22 días del mes de agosto de dos mil ocho, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “**Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae* productores de β -lactamasas de espectro extendido**”, presentada por el alumno Alberto Alonso Morales, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Natividad Castro Alarcón
Dirección de tesis

Dr. Jesús Silva Sánchez
Códirección de tesis

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dra. Adakalia Armenta Solís

Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado



Vo. Bo

Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



Vo. Bo

Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Natividad Castro Alarcón por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación, por su amistad, comprensión y valioso apoyo brindado durante la realización del trabajo.

Al Dr. Jesús Silva Sánchez, por haberme permitido hacer parte de mi trabajo experimental en su laboratorio, por su comprensión, disposición y valiosas aportaciones, gracias por todos esos consejos.

A mi comité tutorial: Dra. Mónica Espinoza Rojo, Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado, Dra. Adakatia Armenta Solís, por sus valiosas aportaciones que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A la Q.B.P. Etzel Damariz Carreón, por su apoyo técnico y sobre todo por brindarme su amistad.

A mis padres

Lucio Alonso y Socorrito Morales, por haberme dado su confianza y comprensión, gracias a usted hoy concluyo otra etapa más de mi vida académica y no tengo, ni tendré manera de pagarles todo lo que han hecho por mi, gracias por todos aquellos consejos brindados y todos aquellos principios enseñados, para mi han sido y seguirán siendo un ejemplo a seguir, de corazón gracias por ser como son.

A mi hermano

Carlos Alonso, por haber estado siempre en esos buenos y malos momentos que he tenido a lo largo de mi vida, tal vez nunca te lo he dicho y a pesar de que eres menor que yo, te admiro mucho. Te deseo lo mejor en tu próxima vida académica que se muy pronto empezara; cuenta conmigo siempre.

A mis amigos y compañeros

Por brindarme su apoyo siempre que lo necesite, por escucharme y darme siempre un consejo, les deseo lo mejor de la vida.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Microbiológica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero y en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

Bajo la dirección de la

Dra. Natividad Castro Alarcón

y la codirección del

Dr. Jesús Silva Sánchez

La asesoría de

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado

Dra. Adakatia Armenta Solís

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento del fondo PIFI 2007.

TITULO:

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

ÍNDICE

PÁGINA

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	10
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	17
REFERENCIAS	22

RESUMEN

El empleo de técnicas moleculares en la epidemiología de las enfermedades infecciosas nos permite determinar la relación clonal que existe entre diversos aislamientos de una misma especie, esta información es útil sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas bacterianas multi-resistentes. El objetivo fue validar los resultados obtenidos de la tipificación molecular de aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae* mediante dos variantes de la técnica de amplificación de secuencias repetidas (rep-PCR), comparándolos con los resultados de la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). Se analizaron 26 aislamientos clínicos, a los cuales se les realizó un tamiz para confirmar la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), también se determinaron los puntos isoeléctricos (pls) de las β -lactamasas. Las cepas fueron tipificadas por la PFGE utilizando la enzima *XbaI*, para la realización de la rep-PCR se utilizaron dos pares de iniciadores correspondientes a las secuencias REP y ERIC. Los aislamientos productores de BLEEs mostraron multi-resistencia, los patrones de pls más frecuentes fueron de 5.4 (88.4%) y de 8.2 (76.9%). Todos los aislamientos fueron tipificables por las dos variantes rep-PCR y por la PFGE. Las variantes rep-PCR agruparon a los 26 aislamientos en 18 grupos clonales, mientras que la PFGE los agrupó en 20 grupos clonales. El poder de discriminación mostrado por las dos variantes rep-PCR fue de 0.97, en tanto que el poder de discriminación para la PFGE fue de 0.98. El alto poder de discriminación obtenido en ambas variantes nos permite sugerir el empleo de la rep-PCR como una técnica alternativa para una rápida tipificación de aislamientos clínicos de *E. cloacae*.

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

ABSTRACT

The use of molecular techniques in the epidemiology of infectious diseases allows us to determine the existed clonal relationship between several isolated from the same species; this information is especially useful when there were epidemiological outbreaks caused by multidrug resistant strains. The objective of this study was to validate the results that we got from the molecular typing of *Enterobacter cloacae* by two variants of amplification technique repeated sequences (rep-PCR) compared with the results of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns. Twenty-six clinical isolates were analyzed, which ones a screening was performed to confirm extended-spectrum β -lactamases (ESBL) producing, isoelectric points from β -lactamasas were identified too. The strains were typing by PFGE using the enzyme *XbaI*, to perform the rep-PCR was used two sets of initiators related to REP and ERIC sequences. The ESBL isolates producer showed multidrug resistance, the most frequent isoelectric points were 5.4 (88.4%) and 8.2 (76.9%). All isolates were tipificables both by the two rep variants, as well as by PFGE. The 26 isolates were grouped in 18 clonal groups through variants rep-PCR, whereas the PFGE grouped into 20 clonal groups. The power of discrimination showed for the two variants, rep-PCR was 0.97, while the power of discrimination for PFGE was 0.98. The high power of discrimination obtained in both alternatives suggest us the use of rep-PCR for rapid molecular typing of *E. cloacae* clinical isolates.

Keywords. *E. cloacae*, molecular tipyng, rep-PCR, PFGE.

INTRODUCCIÓN

Enterobacter cloacae forma parte de la biota normal del tracto gastrointestinal; no obstante en los últimos años ha surgido como un patógeno nosocomial importante causante de infecciones del tracto urinario, heridas quirúrgicas e incluso bacteriemia^[1]. Se ha reportado la aparición de brotes por este microorganismo en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN), servicios quirúrgicos y unidad de quemados, los cuales se han asociado a la utilización de productos farmacéuticos contaminados o a una infección cruzada^[2]. Durante la última década se ha reportado un incremento en la multi-resistencia de los aislamientos, probablemente como resultado del uso inapropiado de antibióticos de amplio espectro^[3]. *E. cloacae* presenta resistencia intrínseca a la ampicilina y a cefalosporinas de espectro reducido, exhibe una alta frecuencia de mutaciones que le confiere resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y de espectro extendido^[4]. Se ha reportado que la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido es mediada por la sobre-expresión de la β -lactamasa AmpC cromosómica^[5].

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico de penicilinas, cefalosporinas y otros betalactámicos perdiendo capacidad de unión a las proteínas de unión a penicilinas (PBPs) y dando así lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. Las BLEE están codificadas por plásmidos, la mayoría de ellas pertenecen a la clase molecular A de Ambler, y sus características principales es poseer el aminoácido serina en su centro activo (posición 70), tener un peso molecular de 29 kDa y llevar acabo la hidrólisis preferentemente de penicilinas. La mayoría de las BLEE derivan de las enzimas TEM y SHV; mutaciones en el gen que las codifica incrementa el espectro fenotípico. Las BLEE se encuentran fundamentalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*, no obstante también se han descrito en otros géneros de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*^[6, 7].

Generalmente, el agente etiológico causante de un brote es derivado de una sola célula, cuya progenie es genéticamente idéntica o está estrechamente

relacionada^[8]. En términos epidemiológicos, los organismos involucrados en un brote están relacionados genéticamente, lo que significa que tienen un origen común, compartiendo factores de virulencia, características bioquímicas y genómicas; la inestabilidad del genoma acumula modificaciones a medida que se divide, habiendo mutaciones o recombinaciones, entonces la similitud absoluta que existía inicialmente entre los componentes de un clon va disminuyendo^[8].

El empleo de técnicas moleculares en la epidemiología de las enfermedades infecciosas permite determinar la relación clonal que existe entre diversos aislamientos de una misma especie. Esta información es útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multi-resistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, así mismo, evaluar la eficiencia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y distinguir entre infección y recidiva^[9].

La electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) ha sido considerada, por su excelente poder de discriminación y alto nivel de reproducibilidad, el estándar de oro para la tipificación de la mayoría de las bacterias, hongos y parásitos de importancia clínica a nivel de subespecie; si bien la PFGE ha sido aplicada exitosamente en estudios genéticos y epidemiológicos de diferentes microorganismos, es una técnica muy costosa y requiere de tiempo para la obtención de resultados^[10, 11, 12].

Como alternativa para la rápida obtención de huellas genómicas se han diseñado diferentes técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleídos, como la rep-PCR. Esta técnica utiliza cebadores que hibridan con secuencias de DNA repetidas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias Gram positivas y hongos. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la

distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de DNA. Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias rep que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos^[13, 14, 15]. La técnica de rep-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo costo^[8, 16].

En investigaciones previas se ha utilizado la PFGE para la tipificación molecular de aislamientos clínicos de *E. cloacae*, mostrando un alto poder de discriminación y un alto nivel de reproducibilidad^[2, 17]; así mismo, investigaciones previas han demostrado la utilidad de la rep-PCR como una herramienta útil para estudios de epidemiología molecular de diversos microorganismos; no obstante, no se han publicado estudios donde se comparen ambos métodos que muestren la aplicación de la rep-PCR como una metodología alternativa para la tipificación molecular de *E. cloacae*.

El presente trabajo tuvo como objetivo validar los resultados obtenidos de la tipificación molecular de aislamientos clínicos de *E. cloacae* productores de BLEEs mediante las variantes REP-PCR y ERIC-PCR, comparándolas con los resultados obtenidos del estándar de oro, que es la PFGE.

Debido a la facilidad de ejecución, rapidez, reproducibilidad y alto poder de discriminación la rep-PCR puede ser empleada como una herramienta molecular alternativa para la tipificación de brotes de *E. cloacae* multi-resistentes en los diferentes hospitales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y pruebas de susceptibilidad

Durante el periodo comprendido enero 2004 a agosto 2006, se colectaron 32 aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae* provenientes de pacientes hospitalizados en las diferentes áreas del Hospital General de Acapulco, Guerrero. Los aislamientos fueron recuperados a partir de muestras de orina, sangre y secreción de heridas, e identificados por el sistema semiautomatizado API 20E (BioMérieu, Marcy L'Etoile, Francia). La determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos se llevó a cabo con la técnica de difusión en disco en agar Mueller-Hinton y la detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante la prueba de doble disco combinado (DDCT), siguiendo en ambos casos las recomendaciones del CLSI^[18]. Los agentes antimicrobianos probados fueron: cefalotina, cefuroxima, cefpodoxima, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, cefoxitina, amikacina, gentamicina, el ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametazol, cloramfenicol y tetraciclina. A partir de estos aislamientos, se seleccionaron 26 cepas de *E. cloacae*, todas ellas productoras de BLEE con la finalidad de comparar el poder de discriminación de la rep-PCR frente a la PFGE y de conocer si los aislamientos pertenecientes a una clona comparten las mismas características genotípicas y fenotípica. Se incluyó el aislamiento de *E. sakazakii* como control externo inter-especie para la validación.

Determinación de puntos Isoeléctricos de las β -lactamasas.

Los extractos crudos de β -lactamasas se obtuvieron mediante ruptura con perlas de vidrio de una suspensión de bacterias en buffer de fosfatos. Los extractos se analizaron por isoelectroenfoque (IEF) sobre geles de poliacrilamida con rangos de pH 3-9, en el equipo PhastSystem (Pharmacia). Las β -lactamasas se detectaron por hidrólisis de nitrocefina (500 mg/mL). Los valores de los puntos

isoeléctricos (pI) se determinaron comparándolos con pI de β -lactamasas conocidos 5.4 (TEM-1), 7.0 (SHV-3), 7.6 (SHV-2), 7.8 (SHV-4), 8.2 (SHV-5), 9.0 (CTX-M-1)^[19].

Conjugación bacteriana

La transferencia de genes de resistencia a cefotaxima y ampicilina solo se realizó a 15 aislamientos (seleccionados de acuerdo al agrupamiento obtenido por los métodos de tipificación molecular) y está se realizó según el método de Miller *et al.* 1992^[20], usando como cepa receptora a *Escherichia coli* J53-2 (F-, *pro*, *met*, Rif^r), seleccionando en forma independiente en agar Luria suplementado con rifampicina (100 mg/ml) en combinación con cefotaxima (1 μ g/mL) o con ampicilina (100 μ g/mL).

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

Las células obtenidas de un cultivo en caldo BHI fueron colectadas por centrifugación a 13.4 x g durante 2 minutos y la pastilla se resuspendió en 200 μ L de solución PIV. La suspensión celular se mezcló con 150 μ L de agarosa de bajo punto de fusión Sea Plaque GTG (Bioproducts Rockland, EUA) al 1.5% para hacer los discos. Los discos se colocaron uno a uno en un tubo que contenía 1 mL de solución de lisis EC, estos se incubaron a 37°C durante 5 horas, posteriormente la solución de lisis EC se decantó y se sustituyó por solución ESP la cual contenía 1.0 mg/mL de proteinasa K; este se incubó a 50°C durante toda la noche. La solución ESP se decantó y se le adicionaron 13 mL de amortiguador TE para lavar los discos. Un disco se transfirió a un microtubo el cual contenía 45 μ L de buffer de restricción con 15 unidades de la enzima *Xba*I (Invitrogen, Carisbad, California, EUA), se incubó a 30°C durante toda la noche, la actividad de la enzima se detuvo adicionando 5 μ L de regulador de carga 6X y se equilibró por 10 minutos. La separación de los fragmentos se realizó por electroforesis de campos pulsados en un sistema de electroforesis CHEF Mapper II (BioRad, Hercules, EUA). Se utilizó un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en amortiguador TBE al 0.5X a un voltaje de 6 V/cm con pulsos de cambio de linealidad de 1 a 30 segundos a 14°C durante 23 horas^[10, 21]. El marcador Lambda escalera PFG Marker # 340 Biolabs se utilizó como

marcador estándar de peso molecular. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/mL) para posteriormente ser visualizados con luz UV.

Tipificación molecular por rep-PCR

La extracción del DNA total de cada cepa se llevó a cabo por el método de choque térmico. Las cepas fueron crecidas en agar Luria-Bertoni toda la noche a 37°C. Después de la incubación dos o tres colonias fueron resuspendidas en 100 µL de agua estéril en un tubo Eppendorff, para lisar las células el tubo fue calentado por 10 minutos a 95°C, al termino del calentamiento el tubo se incubó por 5 minutos en hielo. El DNA se obtuvo por centrifugación a 9.3 x g durante 10 minutos^[22] y se cuantificó en un biofotómetro (Eppendorf BioPhotometer, EUA).

En la tipificación molecular por la técnica rep-PCR, se utilizaron dos pares de iniciadores que hibridan con las secuencias rep. Para la REP-PCR fueron: REP1R-dt 5'-IIINCGNCGNCATCNGGC-3' y REP2 5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3' (la I corresponde a una inosina, la cual puede formar pares de base con cualquiera de los cuatro nucleótidos A, C, G y T), en el caso de la ERIC-PCR los iniciadores que se utilizaron fueron: ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' y ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' ambos reportados previamente por Versalovic *et al.* 1991^[13].

En un termociclador (Applied Biosystems 2400, Singapur) se amplificaron 100 ng de DNA en un volumen final de reacción de 25 µL que contenía: buffer de reacción 1X, Cloruro de magnesio 1.5 mM, 200 µM de cada dNTP, 2 mM de cada iniciador, dos unidades de Taq-DNA polimerasa recombinante (Invitrogen Carisbad, California, EUA), 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) para REP-PCR y 10% de DMSO para ERIC-PCR. La amplificación de la REP-PCR se realizó con un paso inicial de desnaturalización (94°C durante 7 minutos) y luego 35 ciclos de: desnaturalización (92°C durante 30 segundos), asociación (60°C durante 1 minuto) y extensión (70°C durante 3 minutos) seguidos por un paso de extensión final (70°C durante 8 minutos).

Para la amplificación de la ERIC-PCR se realizó un paso inicial de desnaturalización (94°C durante 7 minutos), luego 35 ciclos de: desnaturalización (92°C durante 30 segundos), asociación (55°C durante 1 minuto) y extensión (70°C durante 3 minutos) seguidos por extensión final (70°C durante 8 minutos)^[11,14,16,22]. Los productos amplificados se separaron electroforéticamente a 100 volts durante 75 minutos en geles de agarosa al 2% con buffer TAE 1X. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (1 µg/mL) durante 15 minutos y se lavaron con agua.

Análisis de los perfiles electroforéticos

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

Criterio de evaluación

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

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

Donde S número de tipos, X_j es la frecuencia del j -ésimo tipo y N es el tamaño de la población^[23].

RESULTADOS

Susceptibilidad antimicrobiana

Del total de los aislamientos clínicos estudiados el 81.2% (26/32) fueron productores de BLEE, los cuales fueron analizados para determinar su relación clonal. La frecuencia de susceptibilidad a antimicrobianos se presentan a continuación: el 96.1% de los aislamientos fueron resistentes a cefalotina, cefuroxima, cefpodoxima y aztreonam, el 57.6% a cefotaxima, el 92.3% a ceftazidima, el 26.9% a cefepima e imipenem, 84.6% a cefoxitina, 61.5% a amikacina, el 80.7% a gentamicina, el 23% ciprofloxacina, el 73% a trimetoprim-sulfametazol, el 9.2 a cloramfenicol y el 46.1% a tetraciclina; todos los aislamientos analizados fueron sensibles a meropenem. Los 26 aislamientos clínicos de *E. cloacae* presentaron multi-resistencia a los diversos antibióticos, mostrando resistencia a por lo menos a una cefalosporina de tercera generación (cuadro 1).

Detección de puntos Isoeléctricos de las β -lactamasas

Los perfiles de los puntos isoeléctricos (pI) obtenidos para cada uno de los aislamientos se muestran en el cuadro 1. Los 26 aislamientos presentaron entre 1 y 4 β -lactamasas con pI de 5.4, 6.5, 7, 7.6, 7.8, 8.2 y 9 de manera combinada. Los pI más frecuentes fueron de 5.4 en el 88.4% de los aislamientos y de 8.2 en el 76.9% de los aislamientos, valores que sugerían la presencia de β -lactamasas de tipo TEM y SHV.

Conjugación bacteriana

En ningún caso fue posible la transferencia de genes de resistencia a cefotaxima o ampicilina de los aislamientos clínicos a la cepa receptora (*E. coli* J52-A).

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

Los 26 aislamientos clínicos de *E. cloacae* productores de BLEEs fueron tipificables por la PFGE, el promedio de bandas obtenidas al utilizar la enzima de restricción *Xba*I fue de 22, observando bandas con tamaños entre 48 y 583 kb (Figura 1).

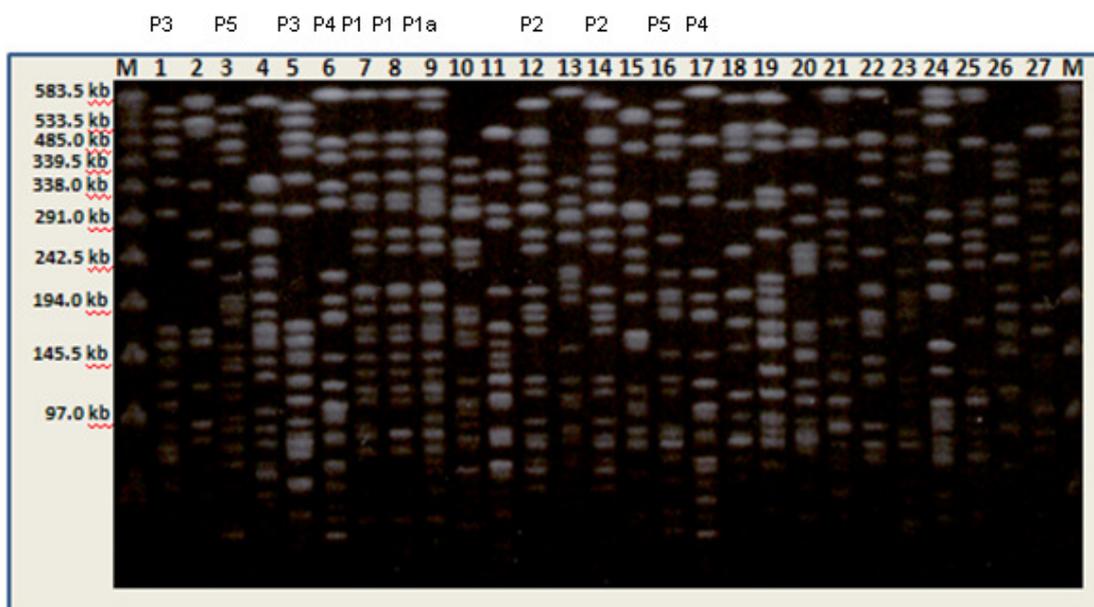


Figura 1. Patrón de restricción obtenido mediante la PFGE de los 26 aislamientos de *E. cloacae*. M: marcador de peso molecular, carril 1-26: *E. cloacae*, carril 27: *E. sakasakii* como especie no relacionada. En la parte superior aparecen los grupos clonales (P1 a P20) establecidos por el análisis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

El perfil de restricción fue analizado de manera visual y se generó una matriz en base a la presencia o ausencia de fragmentos presente en el perfil de restricción de cada aislamiento. Tenover *et al.*, 1995^[24] menciona que aislamientos que tienen el mismo número de fragmentos con el mismo peso molecular son denominados como genéticamente idénticos, aislamientos que difieren en dos a tres fragmentos son denominados como estrechamente relacionados y aislamientos que difieren en más de siete fragmentos son denominados como sin relación alguna. Entonces, tomando en cuenta estos criterios y un coeficiente de similitud de 0.85 derivado del

dendrograma, los 26 aislamientos clínicos de *E. cloacae* fueron discriminados en 20 diferentes grupos clonales (P1-P20), cada uno de los patrones P2, P3, P4 y P5 agrupó dos aislamientos, el patrón P1 agrupó tres aislamientos, el resto de los patrones agrupó cada uno, un aislamiento (figura 2).

Los aislamientos 636 y 642 correspondientes al patrón P2 fueron discriminados como genéticamente idénticos, esto debido a que presentaron el mismo número de bandas con el mismo peso molecular y por lo tanto un coeficiente de similitud del 100%; en cuanto al patrón P1 dos de los tres aislamientos fueron discriminados como genéticamente idénticos (579 y 597), pero el aislamiento 603 difirió en tres bandas por lo que fue discriminado mediante esta técnica, como estrechamente relacionado y fue denominado como una subclona P1a (presentó un coeficiente de similitud del 87%). Los aislamientos correspondientes a los patrones P3, P4 y P5 fueron discriminados como estrechamente relacionados difiriendo en un número de dos a tres bandas y un coeficiente de similitud mayor al 85%.

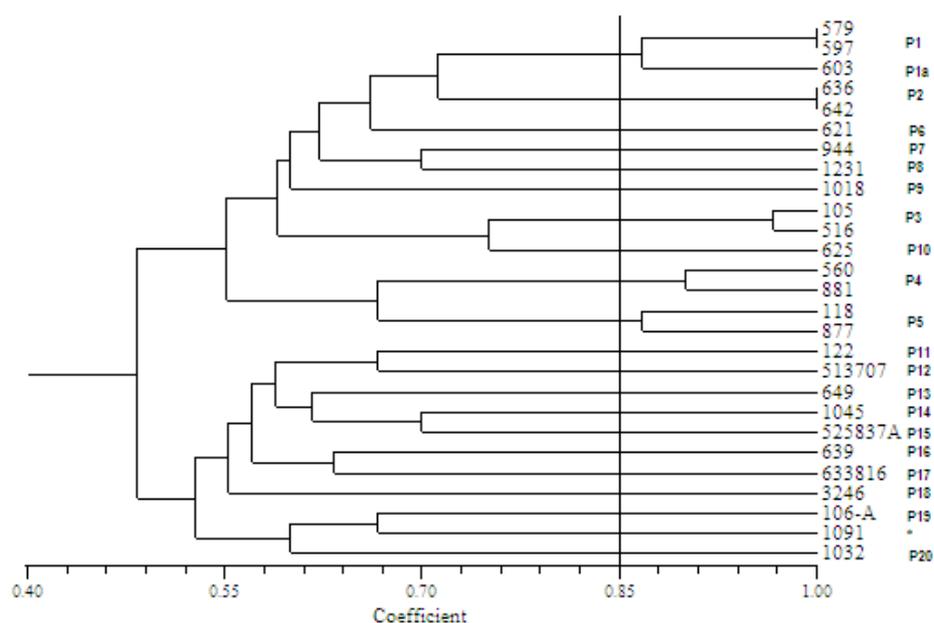


Figura 2. Dendrograma derivado del agrupamiento por UPGMA obtenido del perfil electroforético de PFGE. Los aislamientos estrechamente relacionados se agruparon con un coeficientes de similitud mayores de 0.85, como lo indica la línea vertical. P1, P2: genéticamente idénticos; P3, P4, P5: estrechamente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

Tipificación molecular por rep-PCR

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

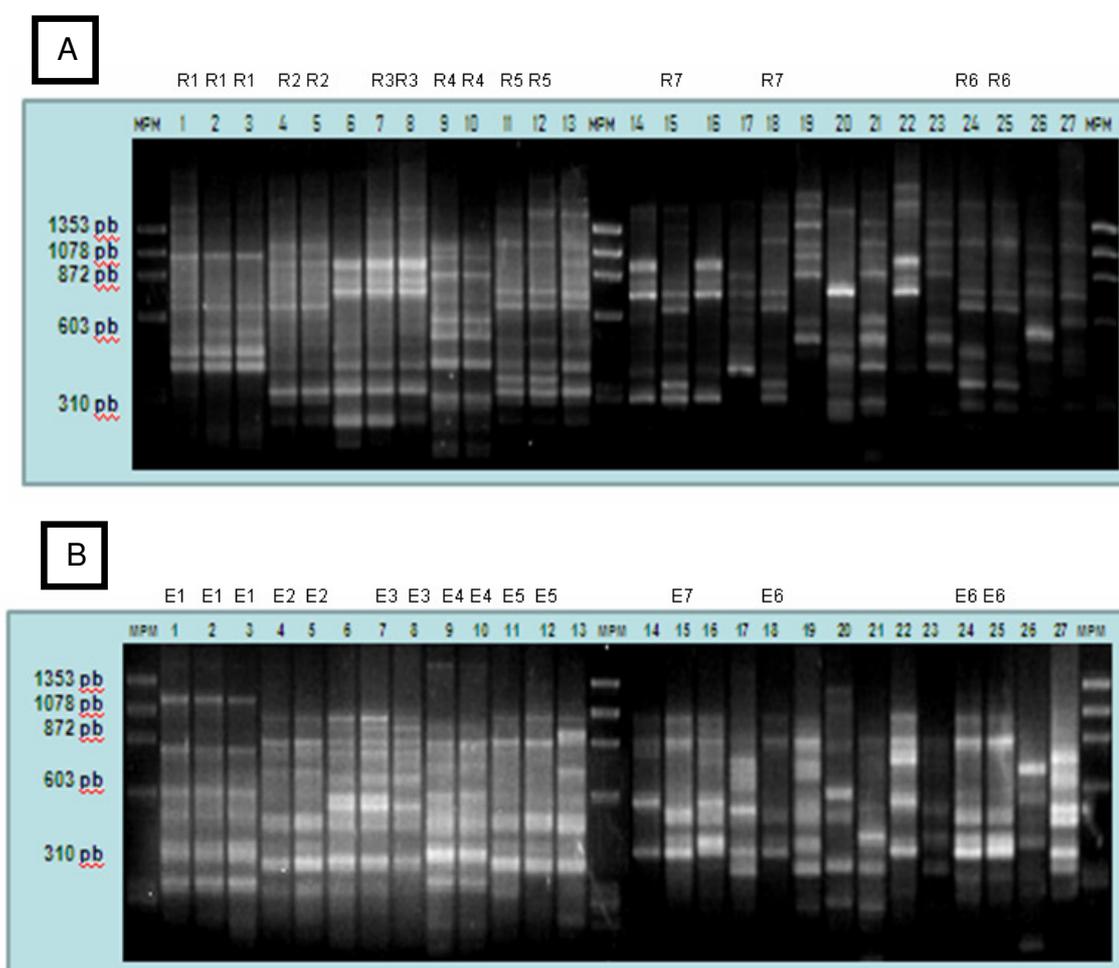


FIGURA 3. Perfil electroforético de los fragmentos obtenidos de rep-PCR de los 26 aislamientos de *E. cloacae*. Panel A: separación de los fragmentos obtenidos mediante la REP-PCR. Panel B: separación de los fragmentos derivados de la ERIC-PCR. M: marcador de peso molecular, carril 17: corresponde a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

Los perfiles de amplificación de ambas variantes fueron igualmente analizados de manera visual y se generó una matriz, para posteriormente obtener el dendrograma. Los 26 aislamientos se agruparon de acuerdo a los criterios de Tenover y tomando un coeficiente de similitud superior de 0.92, este valor se definió mediante la comparación de las agrupaciones obtenidas con la PFGE, que fue la técnica de referencia.

La REP-PCR al igual que la ERIC-PCR, agrupó a los 26 aislamientos en 18 diferentes grupos clonales (R1-R18 para la REP-PCR y E1-E18 para la ERIC-PCR); cada uno de los patrones R2/E2, R3/E3, R4/E4, R5/E5, R6/E6 y R7/E7 agrupó dos aislamientos, el patrón R1/E1 agrupó tres aislamientos y el resto de los patrones quedó conformado por un solo aislamiento (figura 4).

Los aislamientos agrupados por las dos variantes rep-PCR en los patrones R1/E1, R2/E2, R3/E3 y R4/E4 presentaron el mismo número de bandas con el mismo peso molecular y por lo tanto un coeficiente de similitud del 100% por lo que fueron discriminados como genéticamente idénticos.

Las dos variantes de la rep-PCR agruparon a dos patrones genéticos mas, patrones que la PFGE discriminó como sin relación; estos patrones estuvieron conformados por los aislamientos 525837 y 1045 correspondientes al patrón R6/E6, y los aislamientos 1231 y 3246 correspondientes al patrón R7/E7, mostrando un coeficiente de similitud del 100%.

Poder de discriminación

El poder de discriminación derivado de la tipificación de los aislamientos clínicos de *E. cloacae* fue de 0.97 tanto para la variante REP-PCR, así como para la variante ERIC-PCR, mientras que el poder de discriminación de la PFGE fue de 0.98.

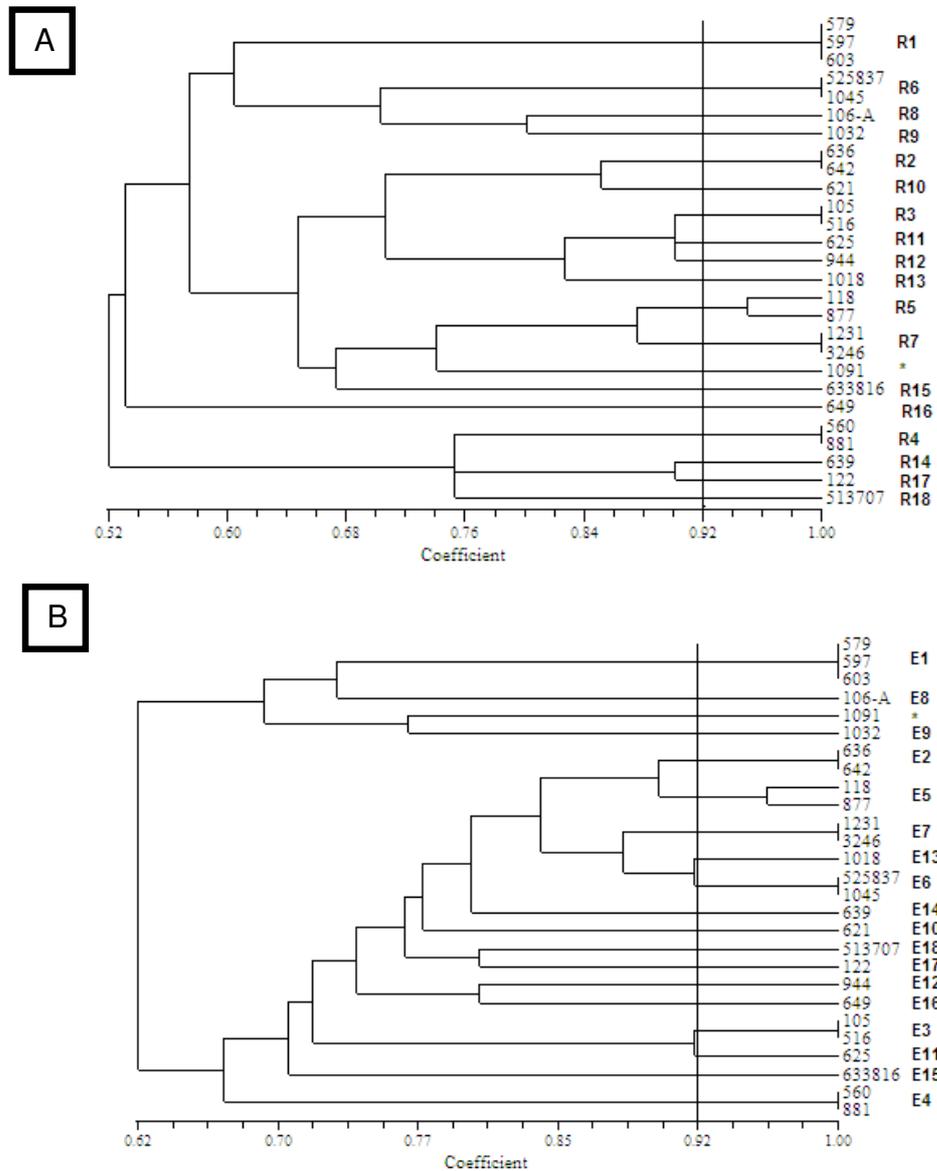


Figura 4. Dendrograma derivado del agrupamiento por UPGMA obtenido del perfil electroforético de rep-PCR. Panel A: Dendrograma obtenido del perfil REP-PCR. Panel B: Dendrograma obtenido del perfil ERIC-PCR. Los aislamientos estrechamente relacionados se agruparon con coeficientes de similitud mayores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

CUADRO 1. Características moleculares de los aislamientos clínicos de *E. Cloacae* productores de BLEE.

Cepa	Perfil de resistencia*	Perfil de β-lactamasas (pl)	Patrón PFGE	Patrón REP-PCR	Patrón ERIC-PCR
579	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P1	R1	E1
597	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P1	R1	E1
603	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P1a	R1	E1
636	CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2	P2	R2	E2
642	CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2	P2	R2	E2
105	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P3	R3	E3
516	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P3	R3	E3
560	CAZ, CDP	5.4, 8.2, 9	P4	R4	E4
881	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2	P4	R4	E4
118	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2	P5	R5	E5
877	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.8	P5	R5	E5
621	CDP	6.5	P6	R10	E10
944	CTX, CAZ, CPD	8.2, 9	P7	R12	E12
1231	CPD	5.4, 7.8, 8.2	P8	R7	E7
1018	CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P9	R13	E13
625	CAZ, CPD	5.4, 7.8	P10	R11	E11
122	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.6, 9	P11	R17	E17
513707	CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P12	R18	E18
649	CAZ	5.4, 8.2, 9	P13	R16	E16
1045	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2	P14	R6	E6
525837A	CTX, CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P15	R6	E6
639	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7, 7.6, 7.8	P16	R14	E14
633816	CAZ, CPD	5.4, 8.2	P17	R15	E15
3246	CTX, CAZ, CPD	5.4, 7.8, 8.2, 9	P18	R7	E7
106 ^a	CTX, CAZ, CPD	7.6, 9	P19	R8	E8
1032	CAZ, CPD	5.4, 8.2, 9	P20	R9	E9

Abrev. *: Resistencia a cefalosponinas de tercera generación, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, CPD: Cefpodoxima.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En hospitales y centros de salud de diferentes partes del mundo se ha reportado un incremento en la aparición de brotes de aislamientos de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), la diseminación de la resistencia a estos antibióticos se debe a la transferencia de plásmidos que portan los genes codificantes de las BLEE entre diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae*, lo que ha conducido a un cambio significativo de multi-resistencia en el ámbito hospitalario^[25,26]. Existen pocos reportes sobre aislamiento clínicos productores de BLEE, en México *Klebsiella pneumoniae* es uno de los principales microorganismos productores de BLEE, mostrando una alta frecuencia^[27, 28, 29]. Los reportes de aislamientos de *E. cloacae* productores de BLEE son escasos, esto debido a que normalmente el mecanismo de resistencia a los β -lactámicos por este microorganismo, es debido a la sobre-expresión de la β -lactamasa cromosómica AmpC^[5]. Siguiendo las recomendaciones del CLSI para la detección de BLEE mediante la prueba de doble disco combinado, los resultados obtenidos en este estudio muestran una alta frecuencia de BLEE (81.2%), esta frecuencia es muy elevada comparada con la reportada por Jiang *et al.*, 2005^[3] que fue del 39.6% y a la reportada por Silva *et al.*, 2002^[30] que fue del 59%. La detección de BLEE en estos 26 aislamientos fue ratificada por isoelectroenfoque (IEF), el cual permitió detectar una gran variedad de β -lactamasas en la mayoría de los casos producidas por la misma bacteria, los pl mas frecuentes fueron de 5.4, 8.2 y 9 posiblemente asociados con TEM-1, SHV-5 y CTX-M respectivamente. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación en los aislamientos clínicos estudiados estuvo acompañada con la resistencia a carbapenémicos y monobactámicos, además de presentar una resistencia simultanea a aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Esta multi-resistencia es un problema importante intrahospitalario, por lo tiene que promover el uso racional de antibióticos para evitar el surgimiento y diseminación de bacterias multi-resistentes, además de tomar medidas de control y vigilancia para disminuir el número de infecciones por microorganismo.

Los métodos convencionales de caracterización bacteriana, tales como la biotipificación, análisis de susceptibilidad a los antimicrobianos y algunas otras basadas en el fenotipo, no ofrecen suficiente información sobre el origen y/o las distintas vías de transmisión de microorganismos patogénicos entre los pacientes hospitalizados. No obstante, con el aporte adicional de las técnicas moleculares, y la información clínico-epidemiológica, se logra exponer en muchos casos el origen y las posibles rutas que han tomado para diseminarse en el ambiente hospitalario. Estos sistemas moleculares alternativos aportan mayor información sobre las características de los brotes, lo cual puede ser útil para un control eficiente de las infecciones intrahospitalarias^[31, 32].

En la actualidad existen diferentes técnicas moleculares que pueden ser empleadas para la tipificación molecular de diversos microorganismos; los cuales además de la capacidad de discriminación, estos métodos pueden evaluarse con base en la capacidad de tipificación, reproducibilidad, facilidad de interpretación y de ejecución en el laboratorio. En este trabajo primeramente se estandarizaron las condiciones óptimas de amplificación para las dos variantes rep-PCR, fue necesario hacer modificaciones a protocolos propuestos para la tipificación de otros géneros bacterianos^[11, 14, 16, 22].

Uno de los principales factores que influyen en la amplificación de secuencias rep, es la concentración de $MgCl_2$ ya que tiene un efecto sobre la complejidad del patrón de bandas, concentraciones relativamente altas conducen a la amplificación de mas fragmentos y la resolución de las bandas es indistinguible^[22]. Al realizar una curva de concentración de $MgCl_2$ encontramos el mismo efecto. Una concentración final de 1.5 mM de $MgCl_2$ para la variante REP-PCR y ERIC-PCR permitió la amplificación de un número aceptable de bandas con una buena resolución.

Se ha demostrado que una temperatura de asociación mayor a 65-68 o 72°C inhiben la amplificación de fragmentos de gran tamaño (1.5 kb aproximadamente), no obstante al adicionar dimetil-sulfoxido (DMSO) a la mezcla de reacción permite la

amplificación de bandas de gran tamaño, esto debido a que evita la formación de estructuras secundarias del DNA que pueden originar una mala separación de las cadenas^[33], nosotros al adicionar el DMSO a la mezcla de reacción observamos la amplificación de fragmentos de mayor tamaño (2 kb para la REP-PCR y 1.4 kb para la ERIC-PCR), además de que mejoro la resolución de los productos amplificados.

En algunos trabajos se ha reportado que algunos aislamientos no son factibles de tipificar por este sistema, ya que no se observó la amplificación de ningún fragmento o el número de estos fue bajo (1 a 2 fragmentos), la diferencia en cuanto a la presencia o ausencia de las bandas puede deberse a la presencia de lipopolisacaridos presentes en la muestra o a la presencia de nucleasas que degradan el DNA, otro factor que puede influir en la presencia o no de los fragmentos, es el método de extracción de DNA o la utilización de medios de cultivo que contenga sangre; esto debido a que posiblemente en el medio se encuentren mas cationes o sustancias que pueden ser inhibidores de la PCR^[22, 34]; no obstante los iniciadores utilizados en las variantes REP-PCR y ERIC-PCR amplificaron fragmentos que hicieron posible la tipificación molecular de todos los aislamientos, observando un mínimo de cinco bandas en ambas variantes. La diferencia en la intensidad de las bandas observada en las dos variantes, pudo deberse principalmente a una diferencia entre la concentración de DNA que se agregó a la mezcla de reacción. El perfil de amplificación derivado de la variante REP-PCR fue fácil de interpretar, en cambio el patrón electroforético obtenido con la ERIC-PCR fue más difícil de interpretar debido a la intensidad variable de las bandas. Los resultados obtenidos con las dos variantes fueron siempre reproducibles.

La tipificación molecular realizada mediante las dos variantes rep-PCR mostró resultados concordantes en la mayoría de los patrones, con respecto a los identificados con la PFGE, considerando que es el estándar de oro por excelencia para la tipificación bacteriana. El poder de discriminación fue de 0.97 para las dos variantes de rep-PCR, mientras que el poder de discriminación de la PFGE fue de 0.98; estos valores son altos considerando que el número máximo de discriminación

es 1. La discordancia en los resultados fue que las dos variantes rep-PCR discriminaron a dos patrones clonales más (R6/E6 y R7/E7) como genéticamente idénticos, cada patrón estuvo conformado por dos aislamientos, mientras que la PFGE los discrimina como sin relación alguna, otra diferencia encontrada fue que las dos variantes rep-PCR no discriminaron subtipos o subclonas, como fue el caso de la PFGE donde el aislamiento 603 fue agrupado en el patrón P1 como una subclona (P1a). Las diferencias identificadas en este estudio entre la rep-PCR y PFGE, son similares a las reportadas en otros estudios [11, 22, 34, 35], donde la rep-PCR no discriminó a subclonas y aislamientos agrupados por la PFGE en el mismo patrón clonal la rep-PCR los discriminó como sin relación alguna; no obstante en estos estudios recomiendan la utilización de la rep-PCR para la tipificación molecular ya que mostró un buen poder de discriminación y fue reproducible.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir el empleo de las dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de *E. cloacae*, ya que cumplió con los criterios de evaluación de métodos de tipificación que son: capacidad de tipificación (el 100% de los aislamientos fueron tipificables), reproducibilidad (se realizó tres veces obteniendo los mismos perfiles de clonalidad), facilidad de interpretación (el número de fragmentos amplificados fue de 5 a 10) y ejecución en el laboratorio.

En cuanto a la relación existente entre las características genotípicas y fenotípicas de los aislamientos pertenecientes a un grupo clonal, se encontró que algunos de un mismo grupo clonal (P1/R1/E1, P2/R2/E2, P3/R3/R3) tenían el mismo perfil de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, así como los mismos pl de β -lactamasas; no obstante en otros patrones esta similitud no existía, esto debido a que posiblemente se traten de aislamientos con cromosomas muy parecidos que han adquirido elementos extracromosómicos que determinan la diferencia fenotípica. Ninguno de los aislamientos analizados para la conjugación tuvo la capacidad de transferir los genes de resistencia a ampicilina o cefotaxima, por lo que se demuestra

que la resistencia no es transferida de manera horizontal, deduciendo que dichos genes pueden estar a nivel cromosomal.

Una limitante de nuestro estudio fue que no contamos con la información clínica de los aislamientos, además de que no contamos con aislamientos del ambiente hospitalario que en conjunto nos pudieran dar información acerca del comportamiento de las clonas en el hospital, como es el detectar las probables rutas de diseminación o identificar la posible fuente, pero si podemos decir que la diseminación es este hospital es multiclonal, ya que no encontramos una clona predominante.

Las perspectivas para el empleo de las dos variantes rep-PCR, es que pueden ser utilizadas para tamizar genóticamente aislamientos clínicos de *E. cloacae* o ser empleadas en surgimiento de brotes, y con la información obtenida determinar la posible fuente y rutas de diseminación de las clonas en el ambiente hospitalario; no obstante la discrepancia encontrada con la PFGE sugiere la necesidad de utilizar, por lo menos dos marcadores diferentes para lograr establecer con mayor eficacia las posibles relaciones genética y epidemiológicas entre los aislamientos.

REFERENCIAS

1. Sanders WE, JR and Sanders CH. *Enterobacter* spp: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin Microbiol Rev 1997;10(2):220-241.
2. Haertl R and Bandlow G. Epidemiological fingerprinting of *Enterobacter cloacae* by small-fragment restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. J Clin Microbiol 1993;31(1):128-133.
3. Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, *et al.* Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. J Clin Microbiol 2005;43(2):826-831.
4. Keller R, Pedroso M, Ritchmann R and Silva RM. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. Infect Immun 1998;66(2):645-649.
5. Manzur A, Tubau F, Pujol M, Calatayud L, Dominguez MA, Peña C, *et al.* Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. J Clin Microbiol 2007;45(8):2365-2369.
6. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14(4):933-951.
7. Paterson DL and Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005;18(4):657-686.
8. Olive DM and Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999;37(6):1661-1669.
9. Healy M, Huang J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, *et al.* Microbiol DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. J Clin Microbiol 2005; 43(1):199-207.
10. Miranda G, Kelly C, Solorzano F, Leanos B, Coria and Patterson JE. Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of infection due to *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 1996;34(12):3138-3141.
11. Mantilla JR, García I, Espinal PA and Valenzuela EM. Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. Rev Col Cienc Quím Farm 2004;33(1):48-58.
12. Ross TL, Merz WG, Farkosh M and Carroll. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005;43(11):5642-5647.
13. Versalovic J, Koeth T and Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finger printing of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991;25(24):6823.
14. Spigaglia P and Mastrantonio P. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a Molecular Typing Method for *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2003;41(6):2454-2457.
15. Johnson JR and O'Bryan T. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. Clin Diagn Lab Immunol 2000;7(2):265-273.
16. Matín-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortíz-Leyba C, *et al.* Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for *Acinetobacter baumannii* bacteremia. J Clin Microbiol 2002;40(12):4571-4575.
17. Paauw A, Verhoef J, Fluit AC, Titia EM, Hopmans EM, Troelstra A *et al.* Failure to control an outbreak of qnrA1-positive multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* infection despite adequate implementation of recommended infection control measure. J Clin Microbiol 2007;45:1420-1425.

18. CLSI/NCCLS. Performance Standard for antimicrobial disk susceptibility test. 8th edition. Phyladelphia, USA: Approved standard;2005.
19. Mattew H, Harris Am, Marshall MJ and Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of betalactamases. J Gen Microbiol 1975;88:169-178.
20. Miller JH. Experiments in Molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour NY 1992:82-85.
21. Chung M, Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, *et al.* Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. Microb Drug 2000;6:189-98.
22. Snelling AM, Gernet-smidt P, Hawkey PM, Heritage J, Parnell P, Porter C, *et al.* Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (RER-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. J Clin Microbiol 1996;34(5):1193-1202.
23. Hunter PR and Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of tipping systems: an application of simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988;26(11):2465-2466.
24. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33(9):2233-2239.
25. Van Nierop WH, Duse AG, Stewart RG, Bilgeri YR and Koornhof HJ. Molecular epidemiology of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in the neonatal intensive care unit of a provincial hospital in Gauteng, South Africa. J Clin Microbiol 1998;36(10):3085-3087.
26. Coudron PE, Moland ES and Sanders CC. Occurrence and detection of extended-spectrum beta-lactamase in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veteran's medical center: seek and you may find. J Clin Microbiol 1997;35:2593-2597.
27. Andrade V and Silva J. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa SHV-5, en unidad de cuidados intensivos. Salud Publica Mex 2004;46:524-528.
28. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza U, Velázquez M, *et al.* Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. J Clin Microbiol 2001;39(9):3193-3196.
29. Miranda G, Castro N, Leños B, Valenzuela A, Garza U, Rojas T, *et al.* Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-apectrum β -lactamase in a Mexican Pediatric Hospital. J Clin Microbiol 2004;42(1):30-35.
30. Silva J, Cano M, Contreras J, Donis J, Martinez G, Morfin R, *et al.* Prevalence and molecular typing of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* causing nosocomial infections in Mexico. Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 2002;42:abstract no. C2-1873.
31. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL and Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006;19(3):512-530.
32. Woods CR, Versalovic J, Koeuth T and Lupski JR. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates, J Clin Microbiol 1993;31(7):1927-1931.
33. Shen W and Hohn B. DMSO improves PCR amplification of DNA with complex secondary structure. Trends Genet 1992;8:227.
34. Ross TL, Merz WE, Farkosh M and Carroll KC. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gen electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005;43(11):5642-5647.

35. Northey G, Gal M, Rahmati A and Brazier JS. Subtyping of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 by REP-PCR and PFGE. J Med Microbiol 2005;54:543-547.