

CONCORDANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LOS METODOS BASADOS EN LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA INVESTIGACION DE LAS INFECCIONES POR *ACINETOBACTER BAUMANNII*

LILIANA S. QUELLE, DANIEL E. JIMENEZ VEGA, MARIANA CATALANO

Laboratorio de Genotipificación Bacteriana, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen *Acinetobacter baumannii* causa frecuentemente infecciones intrahospitalarias endémicas y epidémicas, y el inminente control de las mismas requiere un método de tipificación clonal sencillo y rápido. Para evaluar los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como marcadores epidemiológicos, se determinó la concordancia epidemiológica (CE) y el índice discriminatorio (ID) de 2 de ellos: 1) cebadores arbitrarios (AP-PCR), y 2) cebadores con secuencias *rep* (*repetitive extragenic palindrome*), (REP-PCR). Los resultados fueron comparados con la ribotipificación utilizando las enzimas de restricción *EcoRI*, *BglII* y *ClaI*. Se analizaron 69 aislamientos de *A. baumannii* (15 epidemiológicamente no relacionados, 31 recuperados durante 2 brotes epidémicos y 23 aislados de infecciones endémicas). El ID de la ribotipificación, AP-PCR y REP-PCR fue 0.915, 0.904 y 0.847, respectivamente. La CE de los 3 métodos frente a los 2 brotes epidémicos fue de 100% y de 83% respectivamente, identificando igual número de aislamientos del clon epidémico y de los co-transferidos. En el caso de las infecciones endémicas, la ribotipificación identificó 4 clones residentes, y AP-PCR y REP-PCR sólo tres. Sin embargo, los 3 métodos evidenciaron el clon predominante. Las principales ventajas de REP-PCR frente a AP-PCR fueron su mayor reproducibilidad y fácil estandarización. Estas condiciones unidas a la semejante CE de los 3 métodos, convertirían a REP-PCR en un marcador epidemiológico adecuado para proporcionar una rápida información frente a las infecciones nosocomiales por *A. baumannii*.

Abstract *Epidemiologic concordance of polymerase chain reaction (PCR) based methods for the study of Acinetobacter baumannii infections.* *Acinetobacter baumannii* is one of the most frequent causative agents of nosocomial infections outbreaks. Consequently, a rapid and specific typing method that can identify epidemic strains is important in preventing their dissemination. To evaluate PCR (polymerase chain reaction)-based methods as epidemiological markers, epidemiologic concordance (EC) and the discriminatory power (D) of two of those methods: 1) arbitrary primed-PCR (AP-PCR), and 2) repetitive extragenic palindrome sequence-based PCR (REP-PCR), were analyzed. The results were compared with that of ribotyping using *EcoRI*, *BglII* and *ClaI* as restriction enzymes. These methods were applied to 69 *A. baumannii* isolates that included: 15 epidemiological unrelated isolates, 31 recovered from two outbreaks, and 23 obtained from endemic infections. Considering the unrelated isolates, D of ribotyping, AP-PCR and REP-PCR were 0.915, 0.904 and 0.847, respectively. The three methods showed the same EC with respect to the two analyzed outbreaks (100% and 83%, respectively), and the epidemic strains were uniform differentiated from the co-transferred ones. Ribotyping classified the 23 isolates recovered from endemic infections in 4 different strains, while AP-PCR and REP-PCR identified 3 of them. Although, the 3 methods identified the most frequent disseminated strain. The major advantages of REP-PCR versus AP-PCR were reproducibility, and easier optimization. These advantages, in addition to the similar EC of the 3 methods, confirm REP-PCR as an appropriate marker to be used when rapid information about epidemiological *A. baumannii* infection analysis is required.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, nosocomial infections, epidemiological markers

En los últimos años, en el género *Acinetobacter*, se han identificado 22 genespecies mediante técnicas de hibridación ADN-ADN^{1,4}. De todas ellas, *Acinetobacter*

baumannii (*Acinetobacter* genespecie 2) es la más frecuentemente aislada de infecciones intrahospitalarias, especialmente de pacientes con severas enfermedades de base y hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos^{1,2,4}. Esta genespecie ha sido aislada tanto de casos esporádicos como de brotes epidémicos muy difíciles de controlar⁵. Para estudiar las diferentes situaciones epidemiológicas y comprender las vías de transmisión de *A. baumannii*, en los últimos años se han propuesto distintos métodos de tipificación clonal tales como:

Recibido: 15-XII-1998

Aceptado: 5-III-1999

Dirección postal: Dra. Liliana S. Quelle. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4508-3705; E-mail: Lquelle@fmed.uba.ar

perfil plasmídico⁶, ribotipificación⁷, macrorrestricción⁸, y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores arbitrarios (AP-PCR, "arbitrary primers based PCR"), o cebadores con secuencias repetitivas palindrómicas conocidas y de distribución variable a lo largo del cromosoma bacteriano (REP-PCR, "repetitive extragenic palindrome sequences based PCR")⁹. Algunos de estos métodos pueden confirmar la identificación de la genoespecie y además establecer la diversidad intra-especie, mientras que otros cumplen con el objetivo de identificar cepas individuales sin determinar la especie genómica precisa¹⁰. Por otro lado, también se han establecido diferentes criterios para la apropiada evaluación de los diversos métodos de tipificación como marcadores epidemiológicos¹¹. Uno de los criterios es la concordancia epidemiológica (CE) definida como la probabilidad con la cual los aislamientos epidemiológicamente relacionados (provenientes de una fuente común), y derivados presumiblemente de un mismo clon sean clasificados como tales¹¹. Este criterio es un parámetro de la estabilidad del marcador epidemiológico seleccionado *in vivo*, es decir durante la diseminación de los clones en la naturaleza. Como un estudio preliminar para conocer el valor de los métodos basados en la reacción de PCR para el estudio epidemiológico de las infecciones por *A. baumannii*, se evaluó la CE y el índice discriminatorio (ID) de AP-PCR y REP-PCR, comparándolos con la ribotipificación.

En total se estudiaron 69 aislamientos de *A. baumannii*. De ellos, 15 aislamientos epidemiológicamente no relacionados (provenientes de diferentes hospitales y recuperados de infecciones ocurridas en diferentes años), fueron utilizados para el cálculo del ID mediante la fórmula propuesta por Hunter y Gaston¹¹. De los restantes, 31 aislamientos fueron derivados de los hospitales H1 (18 aislamientos) y H2 (13 aislamientos), recuperados de pacientes durante brotes epidémicos de 2 y 4 meses de duración, ocurridos en los años 1992 y 1995 en las respectivas unidades de cuidados intensivos. Veintitrés aislamientos fueron recuperados de 23 pacientes internados en el hospital H3 durante septiembre de 1994 a septiembre de 1995, comprendiendo infecciones endémicas. La identificación fenotípica de los 69 aislamientos se realizó mediante 18 pruebas bioquímicas⁴. El biotipo fue establecido analizando la asimilación de 6 diferentes sustratos en un medio mínimo². Para la obtención del ADN genómico, las bacterias fueron tratadas con lisozima (200 µg/ml) (Sigma Chemical CO., Louis, Mo, USA), lisadas con 1% de dodecil sulfato de sodio (BRL, Life Technologies, Inc, Gaithersburg, Mo, USA), con el agregado de proteinasa K (200 µg/ml) (Sigma). El ADN fue purificado por la técnica clásica del fenol-cloroformo y precipitado con acetato de sodio e isopropanol. Para AP-PCR, se utilizaron 2 oligonucleótidos arbitrarios en forma independiente, el denominado A (5'-TCACGATGCA-

3')¹³, y el denominado B (5'-GTTGGTGGCT-3')¹⁴. La mezcla de reacción contenía 100 ng de ADN, 4 mM de MgCl₂, 100 pmol del cebador arbitrario, 2.5 UI *Taq* ADN polimerasa (Promega Corporation, Madison, Wis USA), 200 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (Promega), 10 mM TRIS-HCl pH 9.0 and 50 mM de ClK y 0.1% Tritón X100. La amplificación fue realizada en condiciones de baja rigurosidad: 3 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 45 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 25°C y 2 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Para REP-PCR los cebadores utilizados fueron REP1R-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') y REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'). La reacción fue realizada en condiciones de alta rigurosidad de acuerdo a Snelling et al⁹. Los productos de las reacciones de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 1.5%. Para la ribotipificación el ADN de los aislamientos fue digerido con *EcoRI*, *Bgl* II y *Clal* (GIBCO/BRL, Life Technologies, Inc, Gaithersburg, Mo, USA). La sonda utilizada fue el rARN 16S-23S de *Escherichia coli* (Boehringer Mannheim, Alemania) marcado "at random" con 11 digoxigenina-UPD mediante la transcriptasa reversa ("Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase", GIBCO/BRL)⁷. Los diferentes clones fueron definidos mediante la ribotipificación. Dos ribotipos fueron considerados como diferentes cuando el porcentaje de similitud de sus patrones de bandas, calculado por el coeficiente de Dice⁹, fue igual o menor del 80%. La CE para cada método en el caso de brotes epidémicos fue calculada de acuerdo a la fórmula CE: $[N_e/N \times 100]$, en donde N_e es el número de aislamientos pertenecientes a la cepa epidémica, y N es el número total de aislamientos recuperados en cada brote (hospitales H1 y H2). En ausencia de brotes epidémicos N_e es el número de aislamientos del genotipo más frecuente¹¹.

Los 69 aislamientos fueron clasificados en 3 biotipos: biotipo 2 (36 aislamientos), biotipo 8 (10 aislamiento), y biotipo 9 (23 aislamientos). La biotipificación no diferenció entre aislamientos epidemiológicamente relacionados y no relacionados, demostrando un bajo ID. En relación a los ID de los métodos genotípicos utilizados, el mayor índice fue logrado mediante la ribotipificación combinando el resultado obtenido con las 3 endo-nucleasas de restricción empleadas, siendo este valor cercano al ideal de 1 (Tabla 1). Considerando la ribotipificación con cada una de las enzimas de restricción empleadas, *Clal* mostró el mayor ID (0.850 vs 0.830 y 0.819 con *Bgl* II y *EcoRI* respectivamente). Esta técnica permitió confirmar la genoespecie, principalmente mediante las bandas de ADN constantes de 0.8 Kb y 1.85 Kb observadas utilizando *EcoRI* como enzima de restricción⁷. Con respecto a AP-PCR, a pesar que los resultados obtenidos con los cebadores A y B en forma independiente mostraron bajo ID (0.680 y 0.810 respectivamente), la combinación de los resultados logrados con ambos cebadores mostró un

TABLA 1.— Índice discriminatorio (ID) y concordancia epidemiológica (CE) frente a brotes epidémicos y situaciones endémicas de los 3 métodos genotípicos empleados para la investigación de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*

Métodos	ID	Hospital H1			Hospital H2			Hospital H3		
		Nº de clones identificados	Nº de aislamientos del clon epidémico/Nº total de aislamientos	CE (%)	Nº de clones identificados	Nº de aislamientos del clon epidémico/Nº total de aislamientos	CE (%)	Nº de clones identificados	Nº de aislamientos del clon epidémico/Nº total de aislamientos	CE (%)
Ribotipificación										
# EcoRI+BglII+Clal	0.915	3	15/18	83	1	13/13	100	4	10/23	43
AP-PCR										
# Cebador A+B	0.904	3	15/18	83	1	13/13	100	3	9/23	39
REP-PCR	0.847	3	15/18	83	1	13/13	100	3	9/23	39

#: Considerando los patrones de bandas obtenidas con las 3 enzimas de restricción para la ribotipificación, y con los cebadores arbitrarios A y B utilizados en reacciones independientes.

ID semejante al de la ribotipificación (Tabla 1). Sin embargo, para delimitar patrones de bandas reproducibles por esta última técnica fue necesario realizar un promedio de 5 reacciones por aislamiento, debido a la presencia de bandas inespecíficas. Algunos aislamientos identificados como pertenecientes al mismo clon por ribotipificación, mostraban mediante AP-PCR patrones de bandas de ADN que podrían ser interpretados como diferentes genotipos. Sin embargo, nuevos ensayos con AP-PCR no lograron confirmar tales bandas. Mediante la estandarización de la concentración del ADN genómico, la utilización de alta concentración de $MgCl_2$, y la comparación de los diferentes patrones de bandas obtenidos en un mismo gel, se logró una adecuada evaluación de los diferentes genotipos. El ID de REP-PCR fue menor con respecto a la ribotipificación y AP-PCR (Tabla 1). Sin embargo, REP-PCR mostró patrones de bandas más reproducibles con respecto a AP-PCR, siendo más fáciles de interpretar.

A pesar de los diferentes ID, los 3 métodos genotípicos mostraron semejante CE (Tabla 1). En los brotes epidémicos de los hospitales H1 y H2, los 3 métodos identificaron el mismo número de clones y el mismo número de aislamientos correspondientes al clon epidémico. En el hospital H3, la ribotipificación identificó 4 ribotipos diferentes, mientras que AP-PCR y REP-PCR clasificaron a los 23 aislamientos en 3 genotipos (Tabla 1). Simultáneamente, la ribotipificación evidenció un genotipo predominante incluyendo 10 de los 23 aislamientos estudiados, mientras que los métodos basados en PCR establecieron que sólo 9 aislamientos pertenecían a este clon. Sin embargo, los 3 métodos evidenciaron la ausencia de un brote epidémico.

La Figura 1 muestra algunos de los clones identificados en los tres hospitales mediante ribotipificación con *Clal* y REP-PCR.

Estos resultados preliminares evidenciaron que los métodos basados en PCR muestran una adecuada concordancia epidemiológica con la ribotipificación para revelar la transmisión de un mismo clon en la naturaleza. Asimismo, estos métodos son adecuados para diferenciar el clon epidémico de otros probablemente co-transferidos. Considerando los dos métodos basados en la reacción de PCR ensayados, REP-PCR parece ser más adecuado para lograr una rápida información sobre una determinada situación epidemiológica y comenzar con las medidas de control. Al ser éste un método no arbitrario, pues reconoce secuencias de ADN conservadas y repetitivas a lo largo del genoma bacteriano y emplea condiciones de alta rigurosidad, existe una menor probabilidad de amplificaciones no específicas. Las condiciones de baja rigurosidad que se emplean en AP-PCR, hacen que pequeñas variaciones en la concentración de ADN o de $MgCl_2$ se traduzcan en importantes variaciones en el patrón de bandas obtenido, haciendo muy difícil la adecuada estandarización, interpretación y el cálculo del ID. Esta baja reproducibilidad en los patrones de bandas motivó el alto número de repeticiones en la genotipificación de cada aislamiento por AP-PCR hasta lograr definir el genotipo más probable. Con respecto al ID, cabe remarcar que el mayor índice observado para AP PCR se logró combinando el resultado de dos reacciones independientes para cada aislamiento. En relación a REP-PCR, Snelling et al.⁹ encontraron un ID más alto considerando todos los miembros del complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*. Este resultado fue lógicamente esperado, ya que Gerner-Smith⁷ también encontró un mayor ID de la ribotipificación con *EcoRI* frente al complejo, en comparación al definido en este estudio para *A. baumannii*. En cierta manera la identificación del complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* como causante de

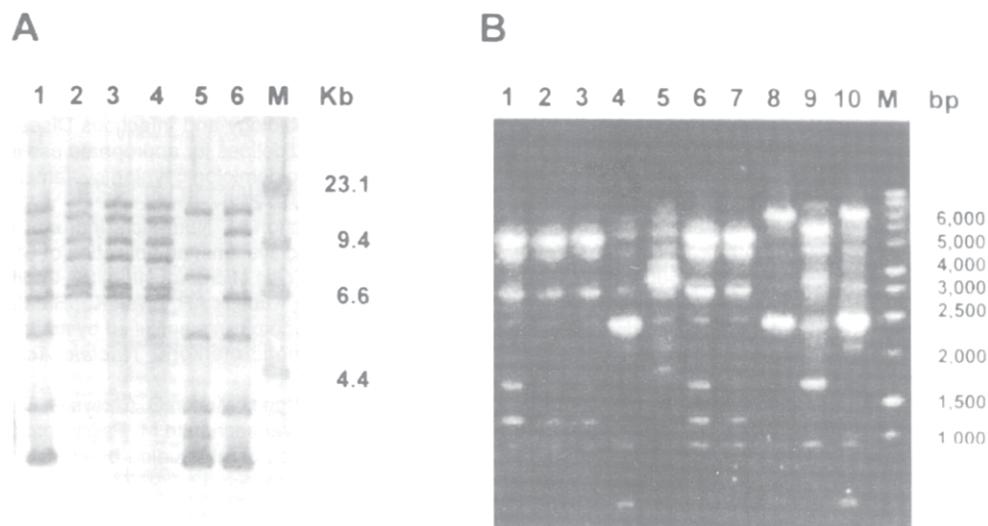


Fig. 1.— Concordancia epidemiológica de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa para la investigación de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*. A: Ribotipos con *Clal*: 1: ribotipo G; 2, 3 y 4: ribotipo C; 5: ribotipo I; 6: ribotipo H. M: bacteriófago lambda digerido con Hind III. B: Genotipos por REP-PCR: 1, 2, 3, 6 y 7: genotipo A; 4, 8 y 10: genotipo E; 5: genotipo C, 9: genotipo D.

infecciones nosocomiales solucionaría el problema del diagnóstico clínico de especies fenotípicamente muy similares^{3,4}. Pero desde el punto de vista epidemiológico, carece de valor al no poder establecerse la real incidencia de las diferentes genoespecies que lo integran. Por tal motivo en este estudio, *A. baumannii* fue identificado mediante pruebas bioquímicas y luego confirmada su identificación mediante ribotipificación. Por ende, los ID definidos mediante los diferentes métodos genotípicos son realmente frente a *Acinetobacter* genoespecie 2 del complejo.

Para la comparación de CE de los diferentes métodos, los clones fueron definidos mediante ribotipificación y luego se analizó si eran identificados del mismo modo por los métodos basados en PCR. De esta manera, partiendo de la base que el genotipo de una bacteria es único, independientemente del método que se emplee para evidenciarlo, se pudo comprobar la concordancia entre las diferentes técnicas de genotipificación.

El hecho que la ribotipificación identificó un mayor número de clones en el hospital H3 podría ser explicado por el mayor ID de este método.

Debido a la alta morbi-mortalidad que presentan las infecciones nosocomiales por *A. baumannii*¹⁰, la investigación de las diferentes situaciones epidemiológicas mediante métodos de tipificación clonal permitiría establecer adecuadas medidas de control en cuanto a la eliminación de probables reservorios y la interrupción de la cadena de transmisión. Al respecto, nuestros resultados sugieren que REP-PCR, a pesar de presentar un menor ID con respecto a la ribotipificación, muestra alta concordancia epidemiológica, y por lo tanto es un método de geno-

tipificación adecuado para la identificación de clones epidémicos de esta especie en forma sencilla y rápida. En este sentido es una técnica adecuada para ser transferida a los laboratorios de bacteriología clínica.

Agradecimientos: Agradecemos a los bioquímicos Ana Di Martino, Sonia Arduino, Nora Botto y Carlos Bantar por ceder gentilmente las cepas analizadas. Este trabajo fue financiado en parte por el proyecto MEO18-UBACYT y por la Fundación Alberto Roemmers.

Bibliografía

1. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and amended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36: 228-40.
2. Bouvet PJM, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol* 1989; 140: 291-9.
3. Gerner-Smith P, Tjemberg I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-Aci-netobacter baumannii* complex. *APMIS* 1993; 101: 826-32.
4. Gerner-Smith P, Tjemberg I, Ursing j. Reliability of pheno-typic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 277-82.
5. Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, et al. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2677-81.
6. Seifert H, Schulze A, Baginski R, and Pulverer G. Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1816-19.

7. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2680-85.
8. Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJM. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1588-91.
9. Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey P, et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1193-202.
10. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148-65.
11. Struelens MJ and Member of the European Study group on Epidemiological Markers (ESGEM), of European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol & Infect* 1996, 2: 2-11.
12. Hunter P, Gaston M. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465-6.
13. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-5.
14. Elaichouni A, Verschraegen G, Claeys G, Devleeschouwer M, Godard C, Vaneechoutte M. *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 666-71.