



## FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

# EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MEDIANTE LA TÉCNICA *DOUBLE-LOCUS SEQUENCE* *TYPING (DLST)*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2018

**Autor:** Mireya Fernández Sánchez

**Modalidad:** Experimental

**Tutor/es:** Juan Carlos Rodríguez Díaz

Pedro Antequera Rodríguez



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	3
RESUMEN .....	4
ANTECEDENTES .....	5
OBJETIVOS .....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
A. Selección de las muestras.....	12
B. Aislamiento y cultivo .....	12
C. Extracción del ADN bacteriano.....	13
D. Cuantificación del ADN extraído.....	13
E. Amplificación de los loci ms172 y ms217 .....	14
F. Electroforesis en gel de agarosa .....	16
G. Purificación del ADN.....	17
H. Secuenciación del ADN.....	17
I. Caracterización epidemiológica (base de datos DLST).....	19
J. Árbol filogenético .....	20
K. Antibiograma .....	20
L. Análisis estadístico .....	21
RESULTADOS .....	22
A. DLST .....	22
B. Árbol filogenético .....	23
C. Antibiograma .....	25
DISCUSIÓN .....	28
CONCLUSIÓN .....	31
BIBLIOGRAFÍA .....	32
RESEÑAS .....	35

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Juan Carlos por darme la oportunidad de haber hecho este trabajo y por haber convertido un verano que auguraba pasar desapercibido en uno cargado de aprendizaje y crecimiento profesional y personal. Sin él nada de esto habría sido posible.

A Pedro, por resolver mis dudas y aconsejarme cuando lo he necesitado. Gracias por contagiarme tu pasión y dedicación por la microbiología.

A Maripaz por estar siempre dispuesta a ayudar y por enseñarme todo lo necesario para llevar a cabo el trabajo de laboratorio.

A Jesús, mi compañero de prácticas, por haberme acompañado en esta etapa de mi vida y amenizar las mañanas en el laboratorio.

Y por último a mi familia, porque sin ellos no estaría donde estoy.



## RESUMEN

**Antecedentes:** *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los principales microorganismos aislados en infecciones nosocomiales. La prevalencia de cepas multirresistentes (MDR) o extremadamente resistentes (XDR) ha aumentado de manera global en las últimas décadas. Una herramienta para prevenir la aparición de estas resistencias es la vigilancia epidemiológica, ya que se ha observado que a nivel local existen perfiles MDR/XDR definidos. El presente estudio surgió a raíz de un brote de infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente ocurrido en el Servicio de Nefrología del Hospital General Universitario de Alicante.

**Objetivo:** Evaluar la utilidad de la técnica *double-locus sequence typing* (DLST) para la caracterización de brotes hospitalarios producidos por *P. aeruginosa*.

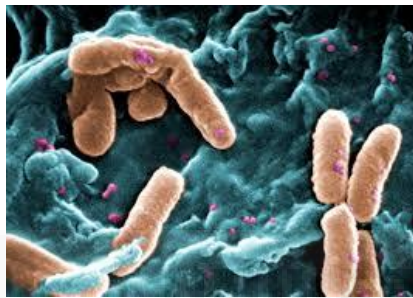
**Materiales y métodos:** Estudio de caracterización genética de cepas *P. aeruginosa*. Los casos fueron 24 cepas asociadas al brote del Servicio de Nefrología producido entre febrero y agosto de 2017. Se utilizaron como controles 22 cepas de *P. aeruginosa* elegidas al azar durante agosto del mismo año que procedían de pacientes ingresados en otros servicios del hospital y sin relación conocida con el brote. El protocolo de trabajo fue: (i) extracción del ADN bacteriano, (ii) amplificación de los *loci ms172* y *ms217*, (iii) visualización de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa (iv) purificación del ADN y (v) secuenciación Sanger. También se construyó un árbol filogenético y se estudió el antibiograma.

**Resultados:** Se alcanzó una tipificación del 100%. Todas las cepas de los casos fueron clasificadas bajo el mismo tipo DLST (52-44). En cuanto a las cepas control, hubo gran variedad alélica y se descubrió una nueva variante alélica para cada *locus*: el alelo 124 para el *ms172* y el alelo 202 para el *ms217*.

**Conclusiones:** Se confirma que la técnica DLST es útil, rápida, sencilla y poco costosa para la detección de brotes hospitalarios por *P. aeruginosa*.

## ANTECEDENTES

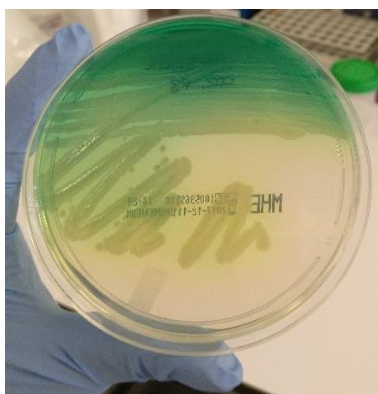
*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gramnegativa que habita y tiene gran capacidad para sobrevivir en cualquier tipo de medio, tanto en acuáticos como en el suelo, animales o plantas. La ubicuidad y adaptabilidad que la caracterizan, junto con su capacidad para formar biopelículas, hace que esté ampliamente distribuida en el entorno hospitalario y sea difícil de eliminar por completo del ambiente.



**Figura 1.** *Pseudomonas aeruginosa* vista al microscopio electrónico.

Es un patógeno oportunista y uno de los principales microorganismos aislados en infecciones nosocomiales, que pueden ser especialmente graves en el caso de pacientes inmunocomprometidos o ingresados en la unidad de cuidados intensivos. Las infecciones que suele producir son neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias.

Las infecciones nosocomiales se consideran un importante problema de salud pública, ya que se asocian con valores altos de mortalidad, en torno a un 30%.<sup>1</sup> Asimismo, a la evidente carga humana que implican hay que añadirle la carga económica que supone para los hospitales este tipo de infecciones, al alargar la estancia hospitalaria y aumentar el consumo de antibióticos.<sup>2,3</sup>



**Figura 2.** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en placa Petri.

Existen muchos factores que determinan la adquisición de la infección y el resultado clínico de esta; pueden clasificarse en tres grupos: los factores del paciente, del tratamiento y del patógeno.<sup>1</sup>

Entre los factores del paciente se encuentran la existencia previa de otras enfermedades, la gravedad de la infección aguda, el estado de su sistema inmune o la colonización del tracto gastrointestinal, aumentando esta última condición quince veces más el riesgo de contraer una infección nosocomial en los pacientes colonizados respecto a los que no lo están. Por otra parte, un retraso en el inicio del tratamiento antibiótico empírico y la ineffectividad terapéutica se asocian también a una mayor mortalidad. En cuanto a los factores del patógeno, cabe destacar que *P. aeruginosa* es una bacteria resistente de forma intrínseca a muchos beta-lactámicos, como las penicilinas o cefalosporinas de primera y segunda, e incluso, algunas de tercera generación. Asimismo, presenta una alta diversidad genética y numerosos mecanismos para adquirir resistencias frente antibióticos de uso más restringido en el hospital, como los carbapenemes o las combinaciones más recientes de beta-lactámicos con inhibidores de la beta-lactamasa (piperacilina/tazobactam).<sup>1,4</sup> Dentro de estos mecanismos, se encuentran las mutaciones de genes cromosómicos y la transferencia horizontal de plásmidos que contienen genes de resistencia, tales como los que codifican para las beta-lactamasas de espectro extendido.<sup>1</sup> Por todo lo anterior, la susceptibilidad antibiótica de *P.*

*aeruginosa* es más baja comparada con la de otros microorganismos gramnegativos y, consecuentemente, la probabilidad de conseguir efectividad terapéutica con un tratamiento empírico es menor.

La prevalencia de cepas multirresistentes (MDR) o extremadamente resistentes (XDR), ha aumentado de manera global en las últimas décadas y se han descrito numerosos brotes en el ámbito hospitalario producidos por este tipo de cepas. Algunas de las más peligrosas que han aparecido en los últimos años, conocidas como *high-risk clones*, poseen una distribución mundial y su prevalencia varía entre el 15-30%, según el área geográfica.<sup>5</sup> En las infecciones causadas por las cepas de alto riesgo el tratamiento empírico tiene una mayor probabilidad de ser inefectivo, y, por tanto, se asocian con una mayor tasa de mortalidad.<sup>1,3</sup> Del mismo modo, las cepas resistentes conllevan un aumento del gasto económico para el sistema sanitario.<sup>2,6</sup>

La exposición prolongada a antibióticos se relaciona con el desarrollo de resistencias, de manera que la elección del tratamiento empírico es muy importante para contribuir a prevenirlas.<sup>6,7</sup> Una forma de prevenir la aparición de resistencias e infecciones es la vigilancia epidemiológica, a través de la caracterización epidemiológica y el estudio de la sensibilidad microbiana de las cepas de *P. aeruginosa* del hospital, ya que se ha observado que a nivel local las cepas de alto riesgo suelen tener perfiles MDR/XDR definidos.<sup>5</sup> Esto permitirá seleccionar el tratamiento empírico de forma más adecuada y con mayor probabilidad de éxito, así como contribuir a la disminución de la prevalencia de resistencias y al estudio de los posibles focos y vías de transmisión del patógeno.

Tradicionalmente se han utilizado métodos inmunológicos o fenotípicos para distinguir entre cepas de una misma especie. Sin embargo, en bacterias muy cercanas filogenéticamente, la resolución de estos métodos es bastante limitada, de manera que es posible que no se llegue a discriminar entre dos cepas diferentes. Por ello, en los últimos años se han buscado nuevos métodos basados en epidemiología molecular que presenten mayor resolución y

reproducibilidad, como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE; *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) o el *multi-locus sequence typing* (MLST).<sup>8,9</sup>

La PFGE se considera la técnica *gold standard* o de referencia para la tipificación genética como parte de estudios epidemiológicos de microorganismos patógenos.<sup>9</sup> Basada en los mismos principios que la electroforesis en gel, permite separar moléculas de ADN de hasta 10 Mb, mientras que la electroforesis convencional sirve sólo para fragmentos de no más de 50 kb. El genoma de las bacterias es cortado por enzimas de restricción, generando fragmentos de ADN grandes que darán un patrón PFGE de bandas característico de la cepa. La separación de las moléculas se consigue cambiando la orientación del campo eléctrico durante el proceso de forma periódica, aplicándolo en tres direcciones diferentes: hacia delante (como en la electroforesis en gel), y otras dos hacia ambos lados de esta, con la que forman cada una 60°. El tiempo de aplicación del campo eléctrico es variable y crucial según el tamaño de los fragmentos de ADN que se quieran separar. De esta manera, se logra ampliar el recorrido que realizan las moléculas y se otorga más tiempo a las grandes para avanzar, aumentando la resolución final de la técnica de electroforesis en gel. No obstante, para realizar la PFGE se necesita tecnología avanzada, y es una técnica laboriosa que requiere mucho tiempo y dinero.

Otro de los métodos más usados para el estudio de la evolución y la epidemiología bacteriana es el del *multi-locus sequence typing* (MLST), siendo una técnica precisa y con alto grado de discriminación, tanto para distinguir entre cepas de orígenes totalmente diferentes como para identificar cepas iguales. Entre sus aplicaciones, se encuentra la detección de brotes de enfermedades de manera temprana.<sup>10</sup>

El MLST se basa en la secuenciación Sanger de entre seis o siete genes constitutivos (se expresan siempre, sin verse afectados por factores inductores), de unas 450-500 pb. Su pequeño tamaño ayuda a escapar de las variaciones causadas por la recombinación, pero es suficiente para poder establecer distancias filogenéticas. La selección de estos genes difiere de unos



patógenos a otros,<sup>10</sup> es decir, no existe ninguna combinación universal de genes que sirva para todos los microorganismos. Con las secuencias obtenidas de cada uno de ellos, se crean bases de datos que almacenan información universal sobre las diferentes variantes alélicas. Al introducir la secuencia estudio en la base de datos, esta le asigna un código y la tipifica.<sup>9</sup>

Aunque la PFGE posee mayor poder discriminatorio respecto al MLST, esta es de un coste superior y más laboriosa. La alta reproducibilidad del MLST al tener un lenguaje universal, junto con su gran variedad de aplicaciones, hacen que a día de hoy se siga utilizando a pesar de la irrupción y rápido desarrollo de otras técnicas, véase las técnicas de secuenciación masiva o *Next-Generation Sequencing* (NGS).<sup>9</sup>

Con el propósito de poder incorporar la vigilancia epidemiológica a largo plazo de *P. aeruginosa* como análisis rutinario en la práctica clínica del hospital, Basset et al. se basaron en el MLST para diseñar un método más simplificado, rápido y menos costoso: el *double-locus sequence typing* (DLST), cuya utilidad ya se había demostrado para otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*.<sup>11,12</sup> El DLST se basa en los mismos principios que el MLST, pero utilizando dos *loci* hipervariables altamente conservados en *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>11</sup> De esta manera, se reducen en gran medida los costes del MLST.<sup>9,11</sup> Además, en un estudio posterior, Cholley et al. demuestra que el poder discriminatorio y la reproducibilidad del DLST es muy similar al del MLST, por lo que es muy buen sustituto del MLST para implantarlo en la monitorización y control de brotes por cepas de *P. aeruginosa*.<sup>13</sup>

Los dos genes seleccionados para la caracterización molecular de *P. aeruginosa* fueron el *ms172* y el *ms217*, los cuales permiten discriminar cepas iguales o diferentes de la bacteria y presentan una estabilidad suficiente para usarlos en el control epidemiológico, de entre seis meses a un par de años.<sup>11</sup>

Por otra parte, los genes dan productos amplificados de cadenas cortas, no superiores a las 700 pb, por lo que se pudo secuenciar usando una sola hebra de ADN de cada *locus* para disminuir aún más los costes de la técnica. De esta

forma, se obtuvo una tipificación satisfactoria en el 98% de las cepas aisladas.<sup>11</sup> Dicha tipificación se obtiene al introducir las secuencias en la base de datos DLST (<http://www.dlst.org/Paeruginosa/>), creada por Basset et al. La base de datos asigna un número en función de la variante alélica del *locus*.

El presente estudio surgió a raíz de la aparición de un brote de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en el Servicio de Nefrología del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA), confirmado por datos clínico-epidemiológicos y mediante electroforesis en gel de campo pulsado (realizada en el Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid). Se utilizó la técnica del DLST en las cepas responsables del brote y en un grupo control. Asimismo, se construyó un árbol filogenético para comprobar que las cepas del brote provenían de un ancestro común y se incluyó el antibiograma para estudiar el perfil MDR/XDR de *P. aeruginosa* a nivel local del HGUA.



## OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio fue evaluar la utilidad de la técnica *double-locus sequence typing* (DLST) para la caracterización de brotes hospitalarios producidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Como objetivos secundarios se plantearon los siguientes:

- I. Analizar las relaciones filogenéticas de las muestras con las secuencias obtenidas mediante el DLST.
- II. Describir el perfil de sensibilidad/resistencia antibiótica de todas cepas del estudio.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Selección de las muestras

Se incluyeron en el estudio un total de 46 muestras previamente identificadas mediante MALDI-TOF como *P. aeruginosa* en el laboratorio de Microbiología del HGUA. Los casos fueron 24 cepas asociadas a un brote producido en el Servicio de Nefrología del HGUA entre febrero y agosto de 2017. Como controles se utilizaron 22 cepas, elegidas al azar durante agosto del mismo año, que procedían de diferentes pacientes ingresados en otros servicios del hospital y sin relación conocida con el brote.

### B. Aislamiento y cultivo

Las cepas responsables del brote se conservaron congeladas en caldo tioglicolato. Para recuperarlas, se descongelaron y sembraron en placa en medio agar Müller-Hinton. En cuanto a las cepas control, se hizo un reaislamiento de la bacteria en Müller-Hinton a partir de aislamientos en agar MacConkey o agar sangre de las muestras clínicas. Todas las placas se cultivaron en estufa durante 24-48 horas.



**Figura 3.** Cultivos en placa de algunas de las muestras del estudio.

### **C. Extracción del ADN bacteriano**

Una vez obtenidos los aislamientos puros de colonias de *P. aeruginosa*, se realiza la extracción de ADN. Para ello se utilizó la resina *Chelex 100 Resin* (nº referencia: #142-1253; *Bio-Rad*) a una concentración de 0,1 g/mL en agua destilada. El *Chelex* es una resina que capta las proteínas y las enzimas mediante intercambio iónico. El protocolo de trabajo que se siguió para la extracción fue el siguiente:

1. Se añadió 300 µL de *Chelex* a un tubo Eppendorf y se suspendió en este las colonias bacterianas. Se cogió aproximadamente entre 2-3 colonias de la bacteria, según el tamaño de estas en la placa. Aquellas que eran puntiformes, se usó un mayor número. Se agitó el recipiente con el *Chelex* antes de coger las colonias para que la resina no se depositara en el fondo de este.
2. Se realizaron ciclos de choque térmico consistentes en: 3 ciclos de 10 minutos a -80°C y a 90°C. Para terminar, se congelaron las cepas una vez más a -80°C durante 10 minutos. En caso de no poder continuar con el proceso, se conservaron a -20°C hasta su uso.
3. Se descongelaron las cepas y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm para precipitar el *Chelex* y eliminar las proteínas de la muestra.
4. El sobrenadante obtenido, donde se encuentra el ADN bacteriano extraído, se trasvasó a un nuevo tubo Eppendorf con mucho cuidado de no coger con la pipeta nada del *Chelex* precipitado.
5. Se conservó el ADN a -20°C hasta su posterior utilización.

### **D. Cuantificación del ADN extraído**

Para comprobar que el proceso de extracción del ADN fue satisfactorio y que se obtuvo un ADN de calidad y cantidad suficientes para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se cuantificó el ADN de las muestras con el *NanoDrop*

1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), seleccionando el módulo correspondiente a los ácidos nucleicos.

La cuantificación se realizó siguiendo los pasos detallados en el manual de usuario del fabricante. Se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de muestra para la medición, ya que los valores obtenidos de concentración son más exactos que con 1  $\mu\text{L}$ . Se depositó la muestra sobre el pedestal inferior del *NanoDrop* cubriendo el orificio a través del que se efectúa la medición, tras lo que se tapaba con el pedestal superior. Para una correcta cuantificación, debía formarse una columna de la muestra líquida entre los pedestales, con ausencia de burbujas.

Se consideró aceptable una cantidad mínima de ADN de 50 ng/ $\mu\text{L}$ . La calidad del ADN se evaluó teniendo en cuenta los parámetros mostrados en la tabla 1.

Ratio	Valor	Pureza
260/280	>2,0	Contaminación con ARN
	1,8-2,0	ADN de pureza óptima
	1,6-1,8	ADN de pureza aceptable
	<1,6	Presencia de proteínas u otros contaminantes
260/230	1,8-2,2	ADN de pureza óptima
	<1,8	Contaminación con sales u otras sustancias

**Tabla 1.** El ADN absorbe a 260 nm, las proteínas a 280 nm y las sales a 230 nm. Un ratio de la absorbancia a 260 nm partido por la absorbancia a 280 nm que estuviera comprendido entre 1,6-2,0 significaba un ADN poco contaminado y de buena calidad para la PCR. El ratio entre la absorbancia del ADN y las sales debía ser superior a 1,8.

### **E. Amplificación de los loci ms172 y ms217**

Los cebadores utilizados en la PCR para cada *loci* fueron los diseñados previamente para la técnica del DLST por la Universidad de Lausana (Suiza), mostrados en la tabla 2.<sup>11</sup> Para cada muestra del estudio se llevó a cabo una PCR del *ms172* y una del *ms217*.

<b>Locus</b>	<b>Dirección</b>	<b>Cebador (5'-3')</b>
<b>ms172</b>	F	GGATTCTCTCGCACGAGGT
<b>ms172</b>	R	TACGTGACCTGACGTTGGTG
<b>ms217</b>	F	TTCTGGCTGTCGCGACTGAT
<b>ms217</b>	R	GAACAGCGTCTTTTCCTCGC

**Tabla 2.** Secuencias de los cebadores *forward* (F) y *reverse* (R) de cada *loci*.

El volumen de reacción ( $V_r$ ) para la amplificación por PCR fue de 20  $\mu\text{L}$ , con las cantidades de reactivos recogidas en la tabla 3.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Agua destilada	6
Muestra de ADN	3
Cebador F 20 $\mu\text{M}$ (0,5 $\mu\text{M}$ en $V_r$ )	0,5
Cebador R 20 $\mu\text{M}$ (0,5 $\mu\text{M}$ en $V_r$ )	0,5
<i>AmpliTaq Gold 360™ Master Mix</i> (Nº de referencia: 4398881; Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems)	10

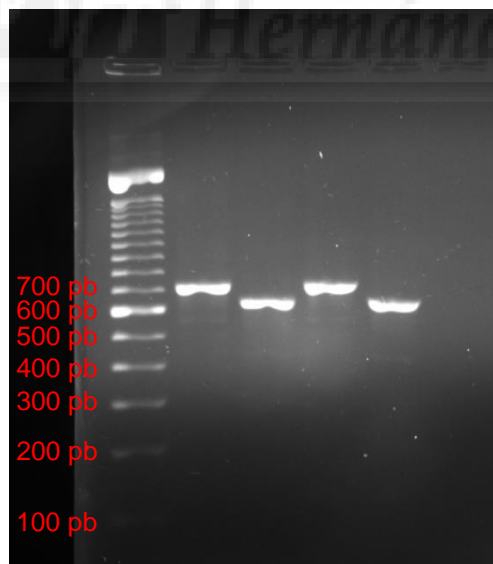
**Tabla 3.** Volumen de cada reactivo utilizado para la PCR.

Las condiciones de reacción fueron una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C (para el *ms172*) o 64°C (para el *ms217*), 45 segundos a 72°C; y una elongación final de 10 minutos a 72°C. La PCR se llevó a cabo con el termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (nº referencia: 4375786; Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems), el cual permite programar en la placa de pocillos dos zonas en las que la temperatura alcanzada durante la fase de unión de los cebadores sea diferente. De esta manera, se pudo realizar amplificaciones simultáneas de

ambos *loci*. La mitad de los pocillos de la placa se programaron para alcanzar los 60°C (*ms172*) y la otra mitad, los 64°C (*ms217*).<sup>11</sup>

### F. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) para visualizar los fragmentos de ADN. Para preparar el gel de agarosa se disolvieron 3 g de *UltraPure Agarose* (nº de referencia: 16500-100; *Thermo Fisher Scientific, Invitrogen*) en 200 mL de *Tris-Borate-EDTA (TBE) 1x* (nº de referencia: T4415-1L; *Sigma-Aldrich*). La disolución se calentó hasta el momento antes de hervir y se dejó enfriar 5 minutos. Se añadió intercalante *SERVA DNA Stain Clear G* (nº de referencia: 39804.01; *SERVA*) hasta un 0,005% (v/v) y se solidificó en la placa de electroforesis. Se cargaron en los pocillos del gel 4,5 µL de la muestra de ADN con 1,5 µL de marcador molecular *100 bp DNA Ladder* y con 0,5 µL del *buffer* de carga *10x BlueJuice Gel Loading Buffer* (nº de referencia: 15628-019; *Thermo Fisher Scientific, Invitrogen*). El gel se puso a 90 V durante 1 hora, tras la cual los fragmentos obtenidos fueron de aproximadamente 700 pb para el *locus ms172* y de 600 pb para el *ms217*, tal y como se aprecia en la figura 4.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa. Pocillo 1: marcador molecular; pocillo 2: alelo *ms172* del caso 1; pocillo 3: alelo *ms217* del caso 1; pocillo 4: alelo *ms172* del caso 2; pocillo 5: alelo *ms217* del caso 2.



### **G. Purificación del ADN**

Se purificó el ADN con el *MinElute PCR Purification Kit* (nº de referencia: 28004; QIAGEN), siguiendo las instrucciones detalladas por el fabricante. Al final del proceso, se obtuvo aproximadamente un volumen de 10 µL de ADN purificado de cada muestra en un tubo Eppendorf. El ADN se conservó congelado a -20°C.

### **H. Secuenciación del ADN**

Se realizó una secuenciación tipo Sanger utilizando el cebador R descrito para la PCR. Las muestras de ADN ya purificadas se enviaron a secuenciar a la empresa Secugen S.L. (C/ Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid). Se solicitó desde su sitio web (<https://www.secugen.es/>) el material necesario para mandarles las muestras. En este caso, se escogieron los tubos Eppendorf de color morado. Los tubos van acompañados de etiquetas adhesivas con códigos de identificación. Cada código dispone de tres etiquetas: una para el tubo morado, otra para la hoja de solicitud de servicio y una tercera para el solicitante.

Una vez recibidos los tubos, se hizo a través del sitio web la solicitud para el servicio de secuenciación. Se imprimió la hoja de solicitud y se rellenó correctamente con una etiqueta para identificar cada muestra y con la temperatura de *melting* del *locus* correspondiente. Esta hoja se envió junto con los tubos morados.

La empresa Secugen S.L. marca que las muestras de ADN deben tener una concentración de 20 ng/µL (Cs) y un volumen final de 15 µL. Para preparar las muestras, por tanto, se cuantificó el ADN purificado (Cp) con el *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, y, en función de la concentración de ADN, se añadieron los siguientes volúmenes de muestra (V<sub>ADN</sub>) y agua destilada (V<sub>a</sub>) a los tubos morados (tabla 4):

<b>Cp (ng/μL)</b>	<b>V<sub>ADN</sub> (μL)</b>	<b>V<sub>a</sub> (μL)</b>	<b>Cs (ng/μL)</b>
30 (25,00-34,99)	10	5	20 (16,67-23,33)
40 (35,00-44,99)	7,5	7,5	20 (17,50-22,50)
50 (45,00-54,99)	6	9	50 (18,00-22,00)
60 (55,00-64,99)	5	10	60 (18,33-21,66)
70 (65,00-74,99)	4,3	10,7	70 (18,63-21,50)
80 (75,00-84,99)	3,8	11,2	80 (19,00-21,53)
90 (85,00-94,99)	3,3	11,7	90 (18,70-20,90)
100 (95,00-104,99)	3	12	100 (19,00-21,00)

**Tabla 4.** Volumen de muestra de ADN y de agua destilada para conseguir la concentración requerida de 20 ng/μL. Con el fin de facilitar los cálculos y agilizar el procedimiento de trabajo, se redondeó la concentración de ADN purificado a la decena más cercana. Entre paréntesis, se muestra el rango de concentración en que variaban la concentración del ADN purificado (Cp) y la concentración del ADN en el volumen final de 15 μL para secuenciar (Cs).

Se añadió primero el ADN y después el agua destilada. Una vez hecho esto, se pipeteó en todos los tubos 1,5 μL del cebador R correspondiente al *locus* a una concentración de 5 μM.

En caso de no obtener ninguna secuencia o que la calidad fuera muy baja, se repitió todo el procedimiento. Si tras este segundo intento no se obtuviera una secuencia de alta calidad, se consideraría una muestra nula.

Esta fase del estudio fue la limitante al tener que mandar las muestras fuera del hospital y depender de una empresa externa para obtener los resultados de las secuencias. El tiempo de espera de los resultados osciló entre 5 a 7 días laborables.

### **I. Caracterización epidemiológica (base de datos DLST)**

Para obtener las secuencias se utilizó el programa Chromas (versión 2.6.4). El análisis de los datos obtenidos por el DLST se hizo de acuerdo a dos tipos de métodos: basado en alelos y basados en nucleótidos. Dentro del segundo grupo, se usó el método de la relación filogenética.<sup>10</sup>

El método basado en alelos consiste en obtener un código que designe un alelo concreto. Este código lo proporcionó la base de datos pública del DLST, donde cada secuencia distinta tiene asignado un número de alelo diferente para los dos *loci* estudiados. De esta forma, se obtuvo para todas las cepas control y casos dos números o “tipo de secuencia”, que indican la variante alélica del *ms172* y del *ms217*.

La secuencia estudio, a introducir en la pestaña “*Plain text sequences*” de la base de datos, debe empezar por una secuencia de pares de bases y tener una longitud determinados específica para cada *loci*,<sup>11</sup> tal y como se muestra en la tabla 5.

<b>Locus</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Secuencia de inicio</b>
<i>ms172</i>	400 pb	ACGATGCTGGADCC
<i>ms217</i>	350 pb	CAGCATGGCG

**Tabla 5.** Secuencia de inicio y longitud del fragmento en pares de bases que debe tener el fragmento a introducir en la base de datos del DLST.

Trace files FASTA file Plain text sequences

Paste sequences into the text boxes below.

ms172 sequence:

ms217 sequence:

Submit Clear

**Figura 5.** Interfaz de la página web donde se copian las secuencias para obtener el número de la variante alélica.

El método DLST sirve para comparar las secuencias y comprobar si son iguales o no, sin embargo, no tiene en cuenta el número de mutaciones individuales en los nucleótidos. No obstante, puede ser muy útil en microorganismos no clonales, como es el caso de *P. aeruginosa*.<sup>10</sup>

### **J. Árbol filogenético**

En cuanto al método de relación filogenética, se construyó el dendrograma con el programa MEGA7. Se utilizó el método del algoritmo *neighbour-joining* y un test *bootstrap* de 1000 repeticiones. Las secuencias obtenidas para el *ms172* y el *ms217* se alinearon concatenadas para su análisis.

### **K. Antibiograma**

Se utilizaron paneles de pocillos *MicroScan Panels* para determinar el perfil de resistencia de las cepas. Los paneles empleados fueron *Negative Combo Type 42* (nº referencia: B1016-137) y *Negative Urine Combo Type 52* (nº referencia

B1016-141), según el tipo de muestra y de acuerdo al protocolo interno del HGUA.

### **L. Análisis estadístico**

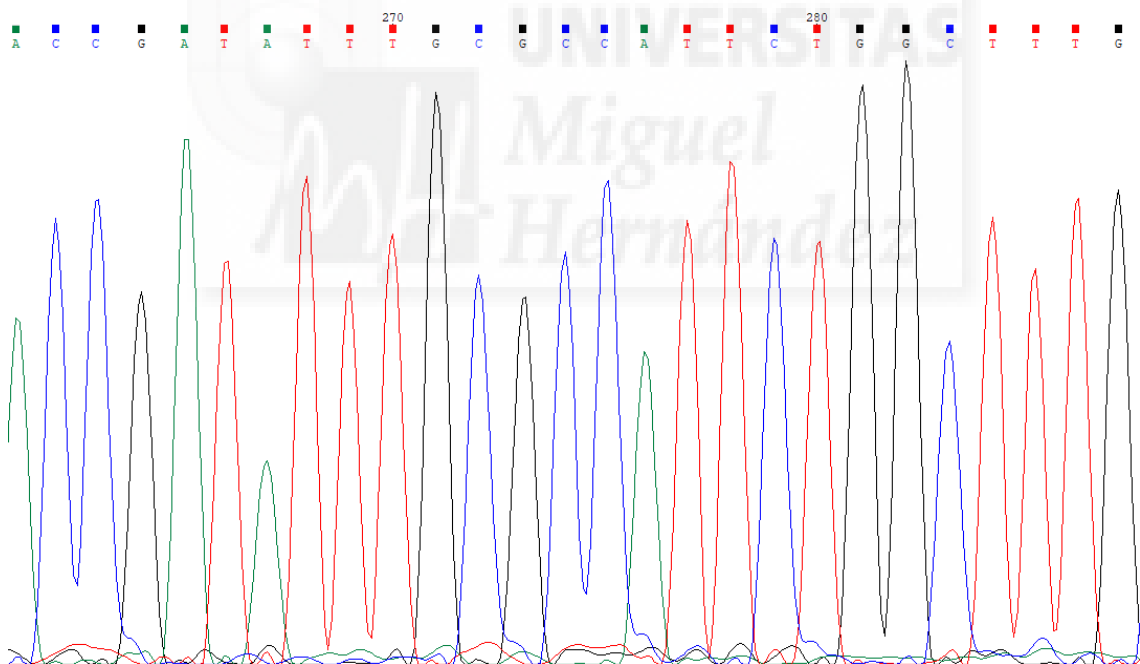
No se realizó ningún análisis estadístico de los resultados obtenidos, puesto que el objetivo era realizar un estudio meramente descriptivo utilizando una técnica nueva -el DLST-, sobre un brote nosocomial de *P. aeruginosa* ya conocido y confirmado anteriormente.



## RESULTADOS

### A. DLST

Las 46 cepas incluidas en el estudio fueron caracterizadas exitosamente mediante la técnica DLST, alcanzándose una tipificación del 100%. De los 92 alelos analizados, la base de datos del DLST fue capaz de asignar número a 86 de ellos a priori (43 alelos del *ms172* y 43 alelos del *ms217*). Los tres alelos restantes de cada *loci* resultaron ser una variante alélica no descubierta anteriormente, cuya secuencia aún no se encontraba registrada en la base de datos del DLST. Tras notificarlo a la base de datos, las secuencias se incorporaron y se les asignó arbitrariamente un número: el alelo 124 para el *ms172* y el alelo 202 para el *ms217*.



**Figura 6.** Fragmento de una secuencia del *locus ms172* perteneciente a una de las cepas del brote.

Se identificaron 14 tipos DLST diferentes en total. Las 24 cepas del brote fueron clasificadas bajo el mismo tipo DLST, el 52-44. A diferencia de estas, las 22 cepas control mostraron una tipificación más variada, logrando detectarse

13 tipos DLST distintos adicionales. Dentro del grupo control, algunas cepas fueron caracterizadas bajo el mismo tipo DLST: los tipos 124-202, 1-21 y 16-11 se obtuvieron cada uno en tres cepas control, y el tipo 21-96 en dos de ellas. Por otra parte, una cepa control coincidió con el tipo DLST de los casos (52-44). En la tabla 6 se recogen todos los tipos DLST asignados por la base de datos.

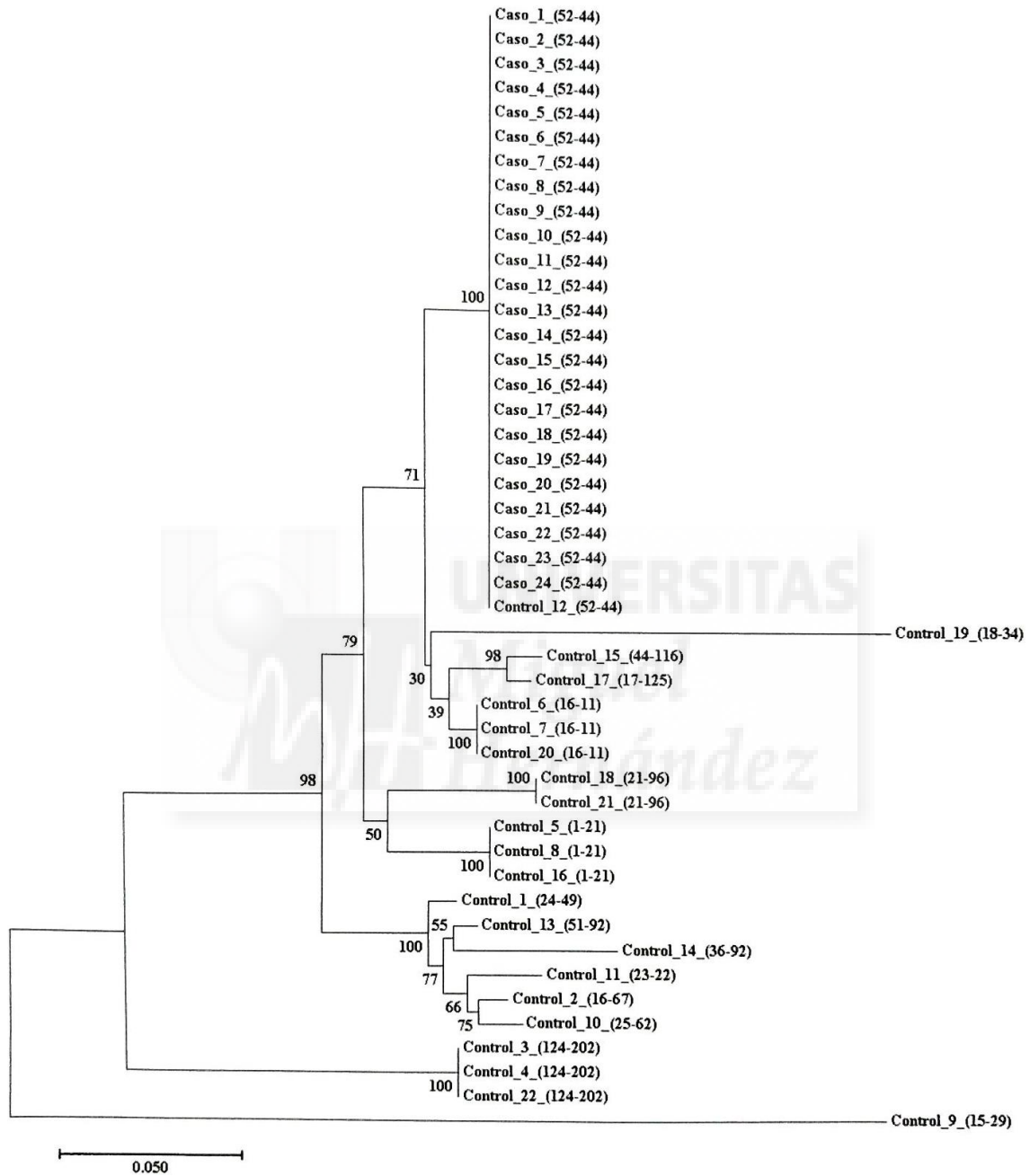
<b>Cepa</b>	<b><i>ms172</i></b>	<b><i>ms217</i></b>	<b>Cepa</b>	<b><i>ms172</i></b>	<b><i>ms217</i></b>
<b>C1</b>	52	44	<b>CTR1</b>	24	49
<b>C2</b>	52	44	<b>CTR2</b>	16	67
<b>C3</b>	52	44	<b>CTR3</b>	124	202
<b>C4</b>	52	44	<b>CTR4</b>	124	202
<b>C5</b>	52	44	<b>CTR5</b>	1	21
<b>C6</b>	52	44	<b>CTR6</b>	16	11
<b>C7</b>	52	44	<b>CTR7</b>	16	11
<b>C8</b>	52	44	<b>CTR8</b>	1	21
<b>C9</b>	52	44	<b>CTR9</b>	15	29
<b>C10</b>	52	44	<b>CTR10</b>	25	62
<b>C11</b>	52	44	<b>CTR11</b>	23	22
<b>C12</b>	52	44	<b>CTR12</b>	52	44
<b>C13</b>	52	44	<b>CTR13</b>	51	92
<b>C14</b>	52	44	<b>CTR14</b>	36	92
<b>C15</b>	52	44	<b>CTR15</b>	44	116
<b>C16</b>	52	44	<b>CTR16</b>	1	21
<b>C17</b>	52	44	<b>CTR17</b>	17	125
<b>C18</b>	52	44	<b>CTR18</b>	21	96
<b>C19</b>	52	44	<b>CTR19</b>	18	34
<b>C20</b>	52	44	<b>CTR20</b>	16	11
<b>C21</b>	52	44	<b>CTR21</b>	21	96
<b>C22</b>	52	44	<b>CTR22</b>	124	202
<b>C23</b>	52	44			
<b>C24</b>	52	44			

**Tabla 6.** Tipos DLST para las cepas caso (C) y las cepas control (CTR).

### **B. Árbol filogenético**

Todas las cepas pertenecientes al brote fueron clasificadas dentro de un mismo grupo. Respecto a las cepas control, las que habían sido tipificadas de igual

forma mediante la técnica del DLST también fueron agrupadas bajo una misma rama en el dendrograma (figura 7).



**Figura 7.** Árbol filogenético de las muestras de casos y controles. Entre paréntesis se detalla el tipo DLST que se obtuvo para cada cepa.



### C. Antibiograma

Para 18 de las 24 cepas del brote, el antibiograma es exactamente el mismo. Una cepa mostró sensibilidad a piperacilina a diferencia del resto, que se mostraron resistentes. Las cinco cepas restantes tenían resistencia añadida a cefepima y dos de estas, además, a piperacilina/tazobactam, ceftazidima y aztreonam (tabla 7).

Con el propósito de alcanzar una terminología internacional y estandarizada, Magiorakos et al. propusieron una definición de MDR y XDR para diferentes bacterias, entre ellas *P. aeruginosa*, y una plantilla con los antibióticos que utilizar para clasificar las cepas según el perfil de resistencia que mostraran en el antibiograma.<sup>14</sup> Las definiciones proporcionadas fueron:

- Cepas multiresistente: no susceptible a uno o más agentes de tres o más categorías antimicrobianas diferentes.
- Cepas extremadamente resistente: no susceptible a uno o más agentes de todas las categorías antimicrobianas excepto de una o dos.

De acuerdo a estas definiciones y empleando la plantilla propuesta, 22 cepas del brote se clasificaron como MDR al mostrar resistencia al menos a un agente perteneciente a aminoglucósidos, carbapenemes, fluoroquinolonas y cefalosporinas de cuarta generación (a esta última clase, solo 3 cepas). Las dos restantes resultaron ser XDR (casos 8 y 17) al tener también resistencia a un agente o más de penicilinas+inhibidores de la beta-lactamasa y a monobactámicos, siendo solo sensibles a polimixinas y con sensibilidad no ensayada a fosfomicina.<sup>14</sup>

Cepa	Piperacilina/ tazobactam	Ceftazidima	Cefepima	Amikacina	Colistina	Aztreonam	Piperacilina	Imipenem	Meropenem	Gentamicina	Tobramicina	Ciprofloxacino	Levofloxacino
C1	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C2	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C3	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C4	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C5	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C6	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C7	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C8	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C9	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C10	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C11	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C12	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C13	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C14	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C15	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C16	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C17	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C18	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C19	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C20	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C21	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C22	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C23	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
C24	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo

**Tabla 7.** Antibiograma de las cepas del brote. Verde: sensible; naranja: sensibilidad intermedia; rojo: resistente.

En cuanto al perfil de sensibilidad de las cepas control, este fue más variopinto y no coincidió en ninguna de las cepas que fueron clasificadas bajo el mismo grupo mediante la técnica del DLST y del árbol filogenético (tabla 8).

Siguiendo los mismos criterios anteriormente mencionados,<sup>14</sup> 18 de las cepas control se clasificaron como bacterias no resistentes, y 4 de ellas como MDR al

mostrar resistencia a carbapenemes, fluoroquinolonas, cefalosporinas de cuarta generación o aminoglucósidos, entre otras categorías antimicrobianas.

Cepa	Piperacilina/ tazobactam	Ceftazidima	Cefepima	Amikacina	Colistina	Aztreonam	Piperacilina	Imipenem	Meropenem	Gentamicina	Tobramicina	Ciprofloxacino	Levofloxacino
CTR1													
CTR2			NE		NE	NE	NE						
CTR3													
CTR4													
CTR5													
CTR6													
CTR7													
CTR8													
CTR9													
CTR10													
CTR11													
CTR12													
CTR13													
CTR14													
CTR15													
CTR16													
CTR17													
CTR18													
CTR19													
CTR20													
CTR21													
CTR22													

**Tabla 8.** Antibiograma de las cepas control. Verde: sensible; naranja: sensibilidad intermedia; rojo: resistente; NE: no ensayado.

## DISCUSIÓN

La técnica DLST secuencía dos fragmentos génicos presentes en todos los aislados de *P. aeruginosa*, pero con gran variabilidad entre aislados no clonales. Esto permite diferenciar clones del microorganismo sin tener que recurrir a la PFGE ni a la secuenciación completa del genoma del microorganismo, técnicas complejas y no disponibles en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Este estudio confirma que la técnica DLST es útil, rápida, sencilla y poco costosa para la detección de brotes hospitalarios. Puede ser utilizada para la rápida identificación de los mismos ante sospecha clínico-epidemiológica, e, incluso, puede aplicarse a todos los aislamientos de infecciones nosocomiales asociadas a este patógeno para conocer la epidemiología molecular de *P. aeruginosa* en cada ambiente hospitalario. Esto es especialmente interesante en el caso de aislados clínicos multirresistentes por la repercusión clínica que el rápido control de este tipo de infecciones tiene a nivel humanístico y económico.<sup>2</sup>

Según los resultados obtenidos, el DLST se trata de una buena herramienta para la vigilancia epidemiológica a nivel local en el entorno hospitalario. Ya ha sido empleada previamente en otras ocasiones para detectar o confirmar brotes por este microorganismo. Fue utilizada por Blanc et al. para descartar exitosamente un posible brote por *P. aeruginosa*, cuyo foco de infección se relacionó con varias unidades de jabón de mano del hospital contaminadas con este patógeno.<sup>15</sup> En otro estudio, realizado en el mismo hospital, fue utilizada por Tissot et al. para detectar y tipificar un brote de varios años en la unidad de cuidados intensivos.<sup>16</sup> También se ha visto su utilidad para estudiar las relaciones filogenéticas entre *P. aeruginosa* de vida libre acuática.<sup>17</sup>

La implantación de la técnica DLST en el hospital supone una estrecha vigilancia y caracterización de la población de *P. aeruginosa*. El uso de esta como intervención sanitaria para monitorizar las cepas de este patógeno y detectar de forma temprana un posible brote puede ayudar en la prevención de

su transmisión y la aparición de resistencias adoptando las medidas oportunas.<sup>18</sup>

El coste por muestra de la técnica fue de 20 euros de media. Además, la infraestructura necesaria para llevar el trabajo de laboratorio a cabo no es tan cara comparada con la utilizada para la PFGE. Los resultados del análisis de las secuencias están disponibles en una semana y el protocolo descrito puede realizarse en cuestión de un par de días, mientras que los resultados de la PFGE tardaron más de una semana en obtenerse para confirmar el brote y supone un gasto económico superior para el hospital comparado con el DLST.

Existen numerosos estudios en los que se defiende que las intervenciones para prevenir las infecciones nosocomiales disminuyen los costes hospitalarios, sin embargo, muchos no tienen en cuenta el coste de las propias intervenciones aplicadas y carecen de una buena calidad metodológica.<sup>19</sup> Por esta razón, sería recomendable realizar un estudio económico en un futuro para confirmar que la técnica DLST es coste-efectiva como intervención de vigilancia epidemiológica.

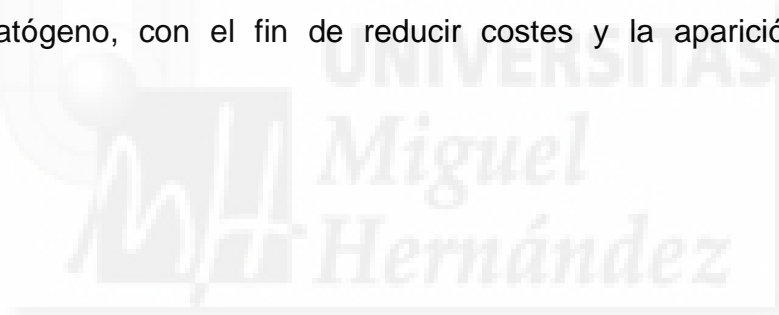
Por otra parte, se ha de destacar que se contribuyó a enriquecer la base de datos del DLST con dos nuevas variantes alélicas no registradas hasta el momento: el alelo número 124 para el *locus ms172* y el alelo número 202 para el *locus ms217*.

En cuanto a las limitaciones del estudio, debe tenerse en cuenta que, según la evidencia reciente, la filogenia inferida a partir de los datos obtenidos con la técnica del MLST no llega a representar totalmente la realidad evolutiva, aunque se haya usado anteriormente en alguna ocasión.<sup>20,21</sup> Esto es debido a que los siete genes estudiados no contienen tanta información como todo el genoma de un microorganismo.<sup>22</sup> Por tanto, en el caso del DLST que únicamente utiliza dos, el árbol filogenético se debe interpretar con precaución.

Asimismo, para la cepa control número 12 se obtuvo el mismo tipo DLST que en todas las cepas caso, el 52-44. No se encontró relación directa entre dicha

muestra y el brote producido, ya que la cepa provenía de un paciente ingresado en un servicio diferente al del brote y durante un período de tiempo también distinto. Aunque el mecanismo por el que pudo haberse transmitido se desconoce, no se pudo descartar con total seguridad que esta cepa no perteneciera al brote hospitalario.

Otra de las limitaciones es el bajo número de muestras incluidas en el estudio. No obstante, la técnica tiene éxito al clasificar bajo un mismo tipo DLST las cepas que causaron el brote confirmado, ocurrido entre febrero y agosto de 2017 en el HGUA, y bajo un tipo DLST diferente al resto de cepas. Esto demuestra que la técnica es útil para la detección de brotes por *P. aeruginosa*. Se requiere la realización de futuros estudios de vigilancia epidemiológica a largo plazo en el hospital para comprobar que puede implantarse como práctica clínica rutinaria en la monitorización y detección prospectiva y precoz de brotes por este patógeno, con el fin de reducir costes y la aparición de cepas MDR/XDR.



## CONCLUSIÓN

La técnica DLST se puede aplicar en un futuro a:

- Identificar y tipificar la población de *P. aeruginosa* de un entorno hospitalario.
- Detectar y monitorizar futuros brotes hospitalarios por *P. aeruginosa*.
- Aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de transmisión nosocomial del patógeno.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Juan C, Peña C, Oliver A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl\_1):S44-S51.
2. Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(3):321-31.
3. Cardwell SM, Crandon JL, Nicolau DP, McClure MH, Nailor MD. Epidemiology and economics of adult patients hospitalized with urinary tract infections. *Hosp Pract (1995).* 2016;44(1):33-40.
4. Pfaller MA, Bassetti M, Duncan LR, Castanheira M. Ceftolozane/tazobactam activity against drug-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* causing urinary tract and intraabdominal infections in Europe: report from an antimicrobial surveillance programme (2012-15). *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(5):1386-1395.
5. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015;21-22:41-59.
6. Mahfoud M, Al Najjar M, Hamzeh AR. Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from nosocomial respiratory and urinary infections in Aleppo, Syria. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9(2):210-3.
7. Geisinger E, Isberg RR. Interplay between antibiotic resistance and virulence during disease promoted by multidrug-resistant bacteria. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl\_1):S9-S17.
8. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(10):728-36.
9. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F, et al; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18(4):20380.



10. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2013;16:38-53.
11. Basset P, Blanc DS. Fast and simple epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa* using the double-locus sequence typing (DLST) method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(6):927-32.
12. Kuhn G, Francioli P, Blanc DS. Double-locus sequence typing using *clfB* and *spa*, a fast and simple method for epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):54-62.
13. Cholley P, Stojanov M, Hocquet D, Thouverez M, Bertrand X, Blanc DS. Comparison of double-locus sequence typing (DLST) and multilocus sequence typing (MLST) for the investigation of *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82(4):274-7.
14. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
15. Blanc DS, Gomes Magalhaes B, Abdelbary M, Prod'hom G, Greub G, Wasserfallen JB, et al. Hand soap contamination by *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital: no evidence of impact on patients. *J Hosp Infect.* 2016;93(1):63-7.
16. Tissot F, Blanc DS, Basset P, Zanetti G, Berger MM, Que YA, et al. New genotyping method discovers sustained nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care burn unit. *J Hosp Infect.* 2016;94(1):2-7.
17. Pappa O, Beloukas A, Vantarakis A, Mavridou A, Kefala AM, Galanis A. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from Greek aquatic habitats implementing the double-locus sequence typing scheme. *Microb Ecol.* 2017;74(1):78-88.
18. Storr J, Twyman A, Zingg W, Damani N, Kilpatrick C, Reilly J, et al. Core components for effective infection prevention and control programmes: new

- WHO evidence-based recommendations. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6(1):6
19. Arefian H, Vogel M, Kwetkat A, Hartmann M. Economic evaluation of interventions for prevention of hospital acquired infections: a systematic review. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146381
  20. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3140-5.
  21. Tsang AKL, Lee HH, Yiu SM, Lau SKP, Woo PCY. Failure of phylogeny inferred from multilocus sequence typing to represent bacterial phylogeny. *Sci Rep*. 2017;7(1):4536.
  22. Tang P, Croxen MA, Hasan MR, Hsiao WW, Hoang LM. Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am J Infect Control*. 2017;45(2):170-179.



## RESEÑAS

Premiado con el 2º puesto en el concurso de pósters del XIII Congreso de Estudiantes de Farmacia de Alicante celebrado del 25 al 27 de octubre de 2017.

Aceptado en el concurso de comunicación póster del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica celebrado del 24 al 26 de mayo de 2018.

