

Métodos moleculares para diagnóstico de RAM

PCR: fundamentos, requerimientos de laboratorio e limitações

Dr. Diego Faccone

Serviço Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Lab. Nacional/Regional de Referência em Resistência aos Antimicrobianos.

Centro Colaborador de OMS em Vigilância de Resistência aos Antimicrobianos.

www.antimicrobianos.com.ar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



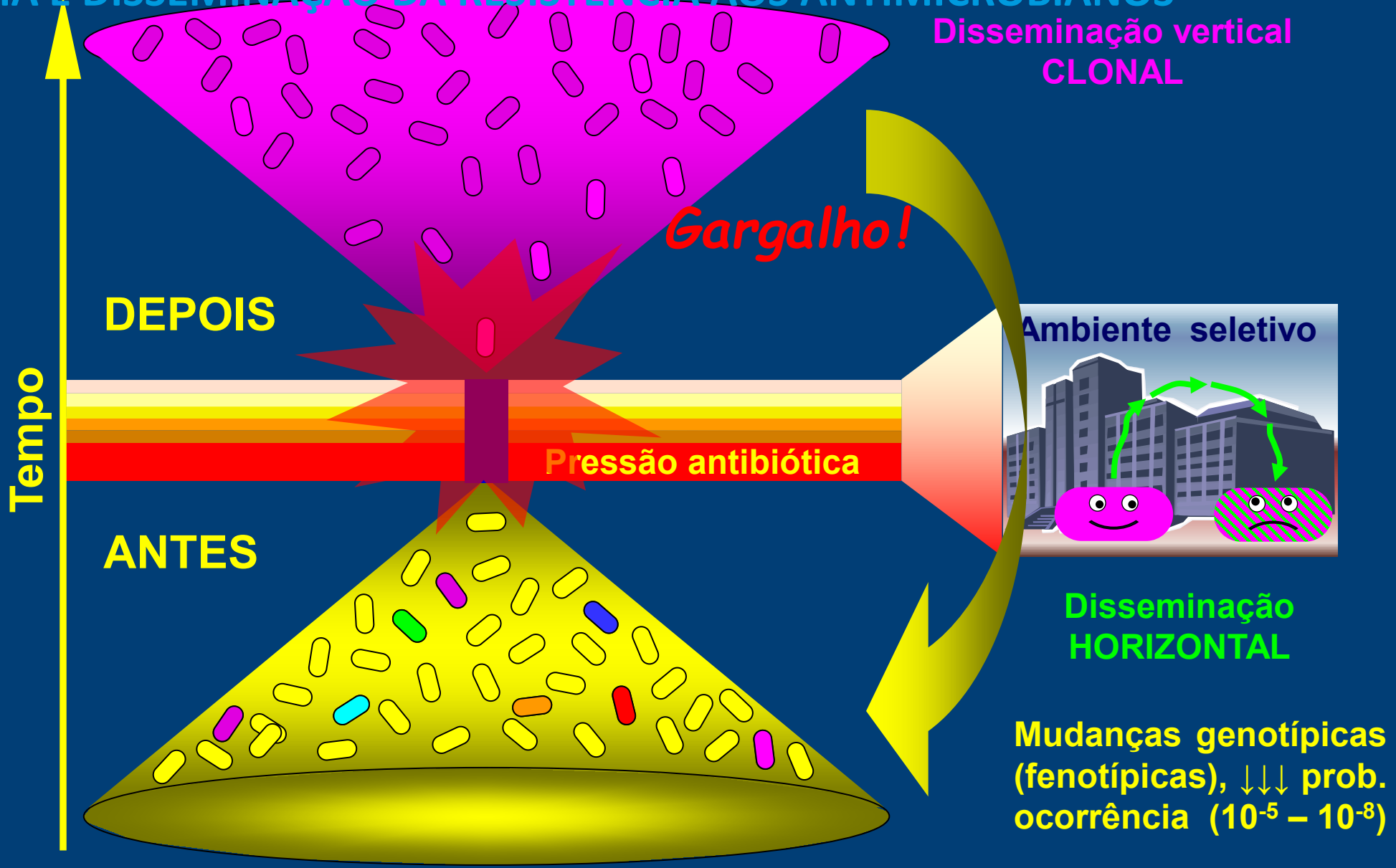
Unión Europea

EMERGÊNCIA



DISSEMINAÇÃO

EMERGÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS



Disseminação vertical
CLONAL

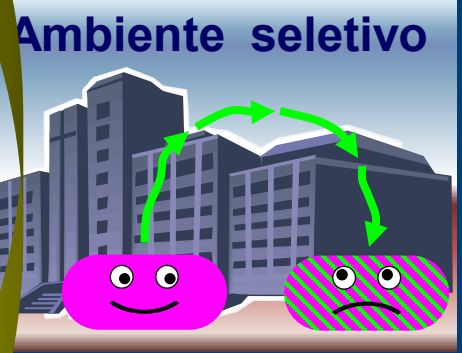
Gargalho!

DEPOIS

Tempo

Pressão antibiótica

ANTES




Ambiente seletivo

Disseminação
HORIZONTAL

Mudanças genóticas
(fenotípicas), ↓↓↓ prob.
ocorrência ($10^{-5} - 10^{-8}$)

**MECANISMOS GENÉTICOS
DE EMERGÊNCIA E
DISSEMINAÇÃO DA
RESISTÊNCIA**



Aquisição de novos genes

Transferência Horizontal de Genes

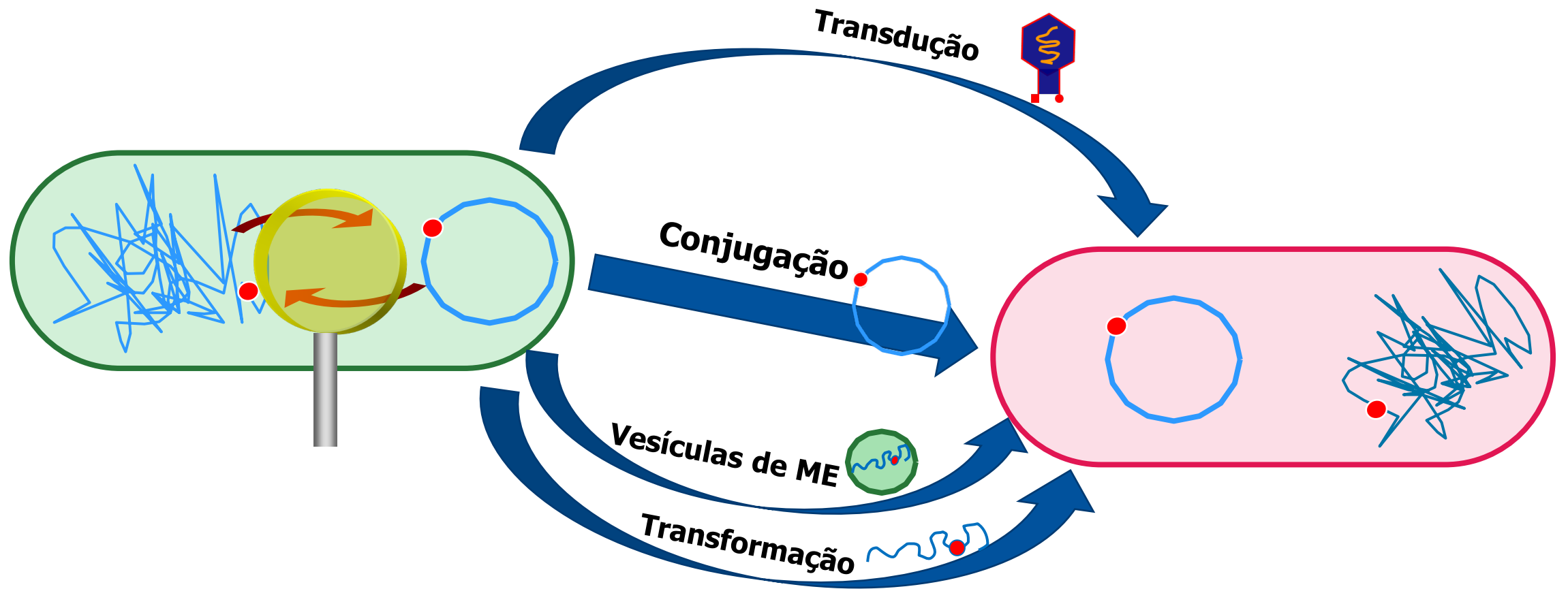
- Enzimas modificadoras de antibiótico
- Enzimas modificadoras do local alvo
- Efluxo do antibiótico

Mudanças aleatórias em genes intrínsecos

Geração de mutações pontuais

- Modificação do local alvo
- Mudança nos níveis de expressão génica

Genes de resistência e sua mobilidade



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



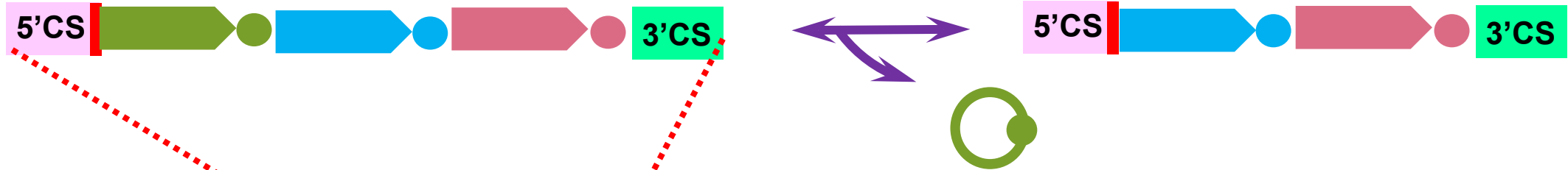
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



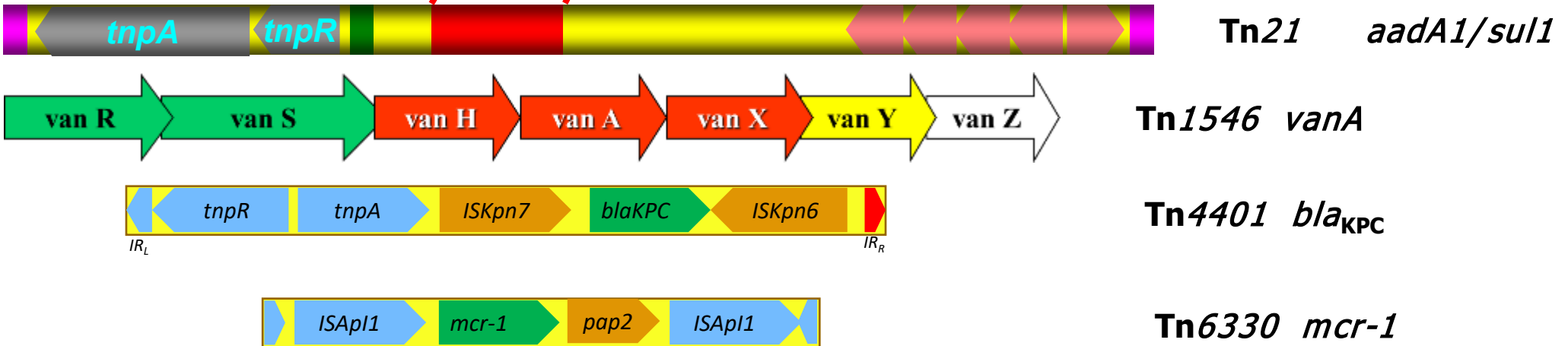
Unión Europea

Genes de resistência e sua mobilidade

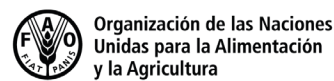
Integrans



Transposons

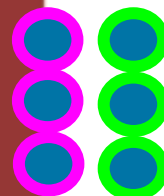


TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



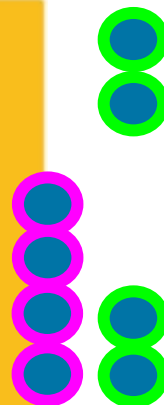
Priority 1: CRITICAL

- *Acinetobacter baumannii*, carbapenem-resistant
- *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant
- *Enterobacteriaceae*, carbapenem-resistant, 3rd generation cephalosporin-resistant



Priority 2: HIGH

- *Enterococcus faecium*, vancomycin-resistant
- *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant
- *Helicobacter pylori*, clarithromycin-resistant
- *Campylobacter*, fluoroquinolone-resistant
- *Salmonella spp.*, fluoroquinolone-resistant
- *Neisseria gonorrhoeae*, 3rd generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant



Priority 3: MEDIUM


- *Streptococcus pneumoniae*, penicillin-non-susceptible
- *Haemophilus influenzae*, ampicillin-resistant
- *Shigella spp.*, fluoroquinolone-resistant



Lista de Patógenos Prioritários OMS

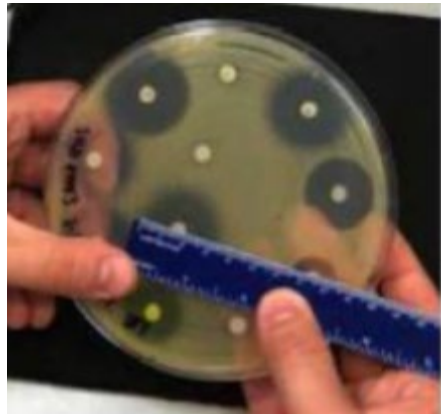
 **Mudanças aleatórias em genes intrínsecos**

- Mutações espontâneas

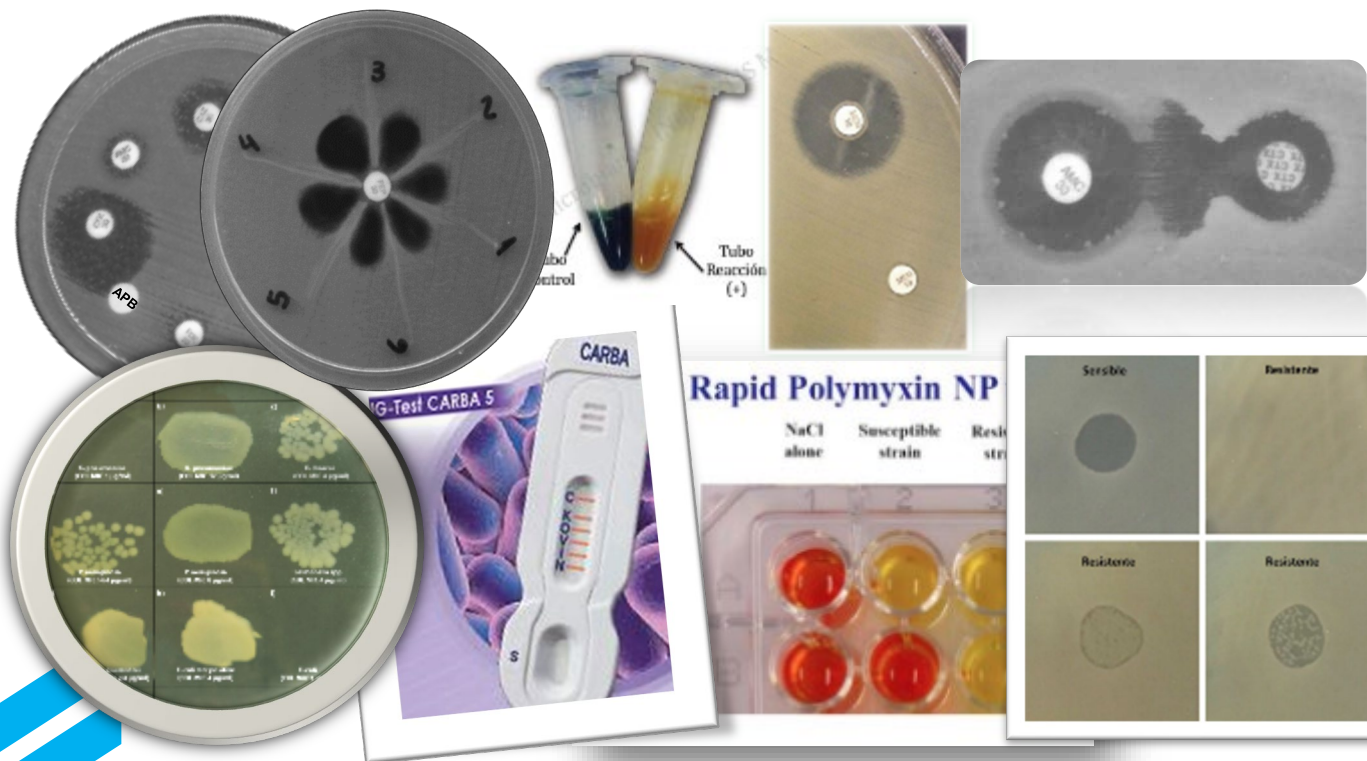
 **Aquisição de novos genes (THG)**

- Conjugação
- Transformação
- Transdução
- Vesículas de ME

Avaliação fenotípica da sensibilidade aos ATMs

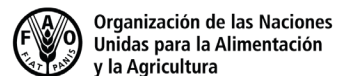


Confirmação fenotípica de mecanismos de resistência



Confirmação molecular de mecanismos de resistência

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Confirmação molecular de mecanismos de resistência

Detecção de genes

- Amplificação DNA
 - i) Mudanças de temperaturas → Reação em cadeia da polimerase (PCR)
 - ii) Isotérmica → Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)
- Hibridação de DNA
- Sequenciação completa de genoma

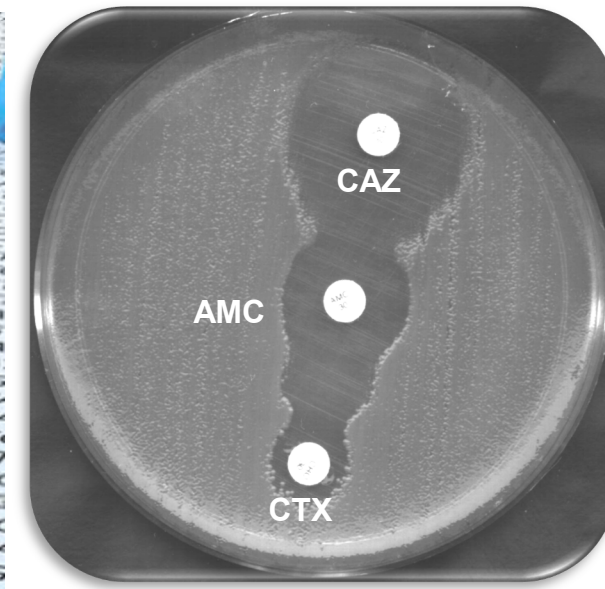


*bla*_{CTX-M}



CTX-M

BLEE



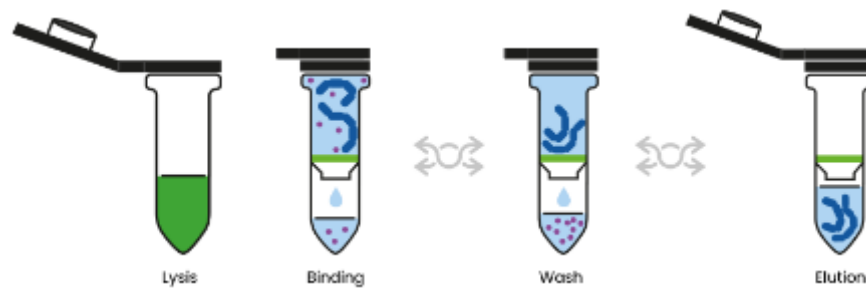
Área extração DNA

Fervido ou boiling



Extração de ácidos nucleicos

Sistema comercial



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Área libre de DNA

Instrumental exclusivo para este procedimiento

Preparação
mistura reação



Cabine para PCR

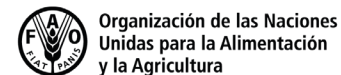


Espaço exclusivo

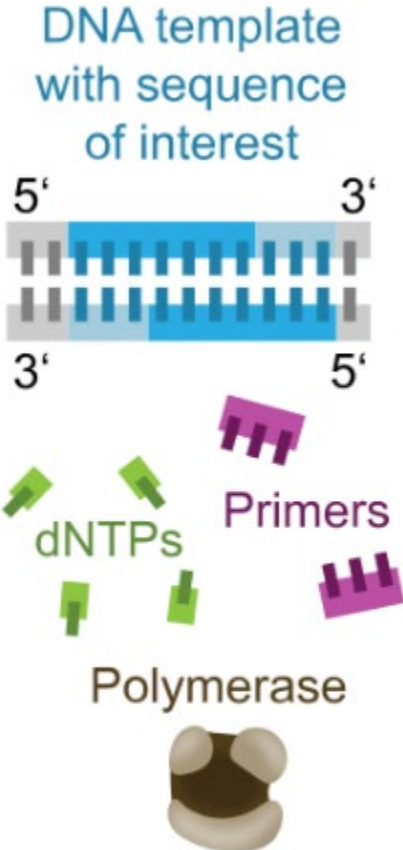


Suporte refrigerado ou recipiente com gelo

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Reativos para PCR



Mistura de reação (Master Mix)

- DNA polimerase **termoestável**
- Buffer de reação comercial
- Cloreto de Magnésio (Mg^{2+})
- dNTP 's = ATP + CTP + GTP + TTP
- Primeiro Forward/Plus/Mais
- Primeiro Reverse/Minus/Menos
- Água qualidade biologia molecular

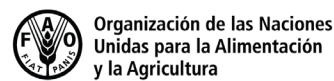
- **DNA molde** (suspeito de conter o gene em questão) (adiciona-se em uma área diferente na qual é preparada a mistura de reação)

- **ALTAMENTE SENSÍVEL**
- **ESPECÍFICA**
- **ECONÓMICA**
- **RÁPIDA**

Master Mix Comercial (opcional)

- Master Mix
- Primeiro Forward/Plus/Mais
- Primeiro Reverse/Minus/Menos
- Água qualidade biologia molecular

TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



Área adição DNA

Adição de DNA molde aos tubos de reação



Amplificação e detecção



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura

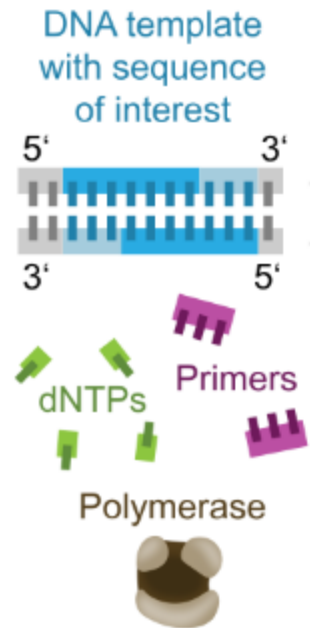


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

Fundamento da PCR



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Amplificação e detecção

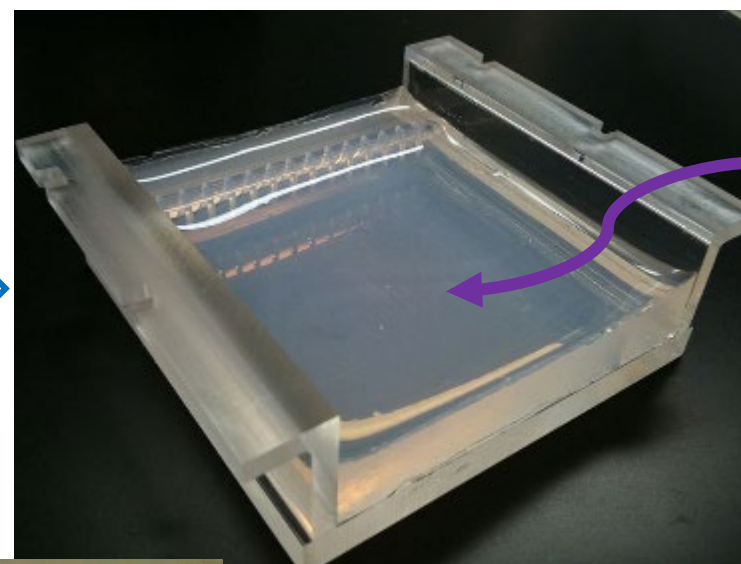


Adição de DNA molde aos tubos de reação



PCR

Termociclador



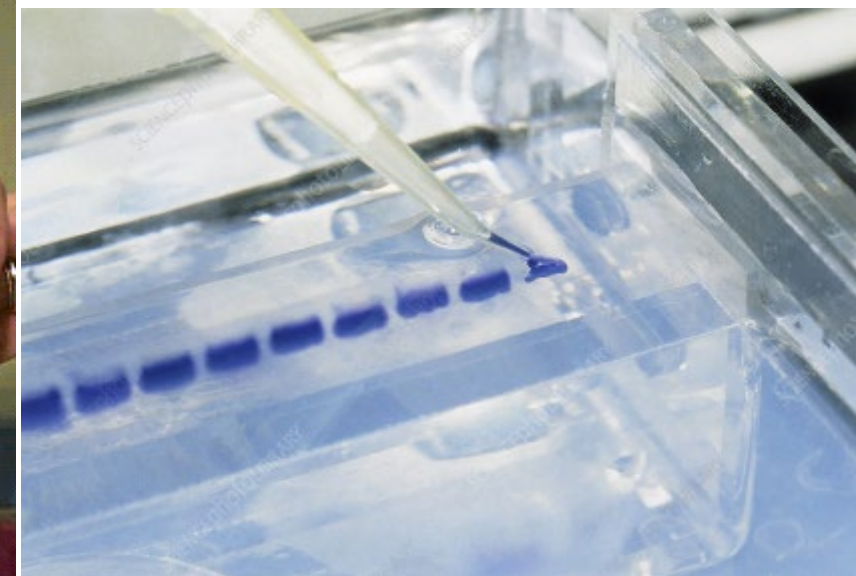
Área de eletroforese

Agarose 1%
TBE / TAE

BrEt
SyBr-Safe
GelRed



Loading Buffer



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

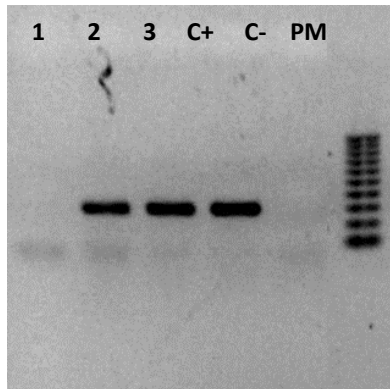
Amplificação e detecção



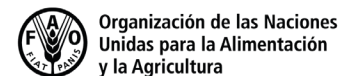
Adição de DNA molde aos tubos de reação



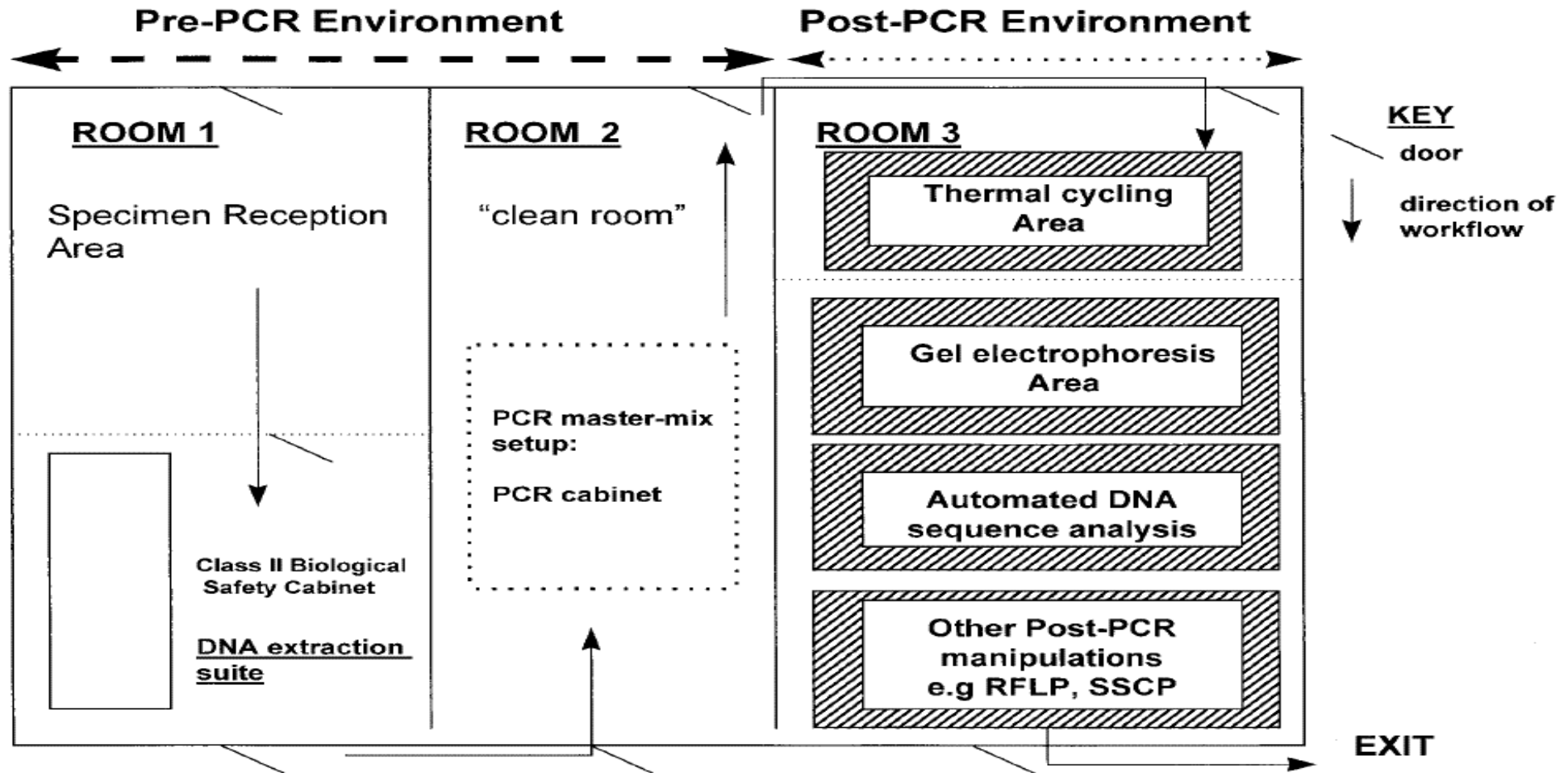
Análise de resultados



TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



COMPARTIMENTALIZACIÓN DE ÁREAS PARA PCR



Extracción de ácidos nucleicos

Preparación mezcla reacción

Amplificación y detección

TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

Millar, BC. JCM 40:1575-80 (2002)

Controles positivos e negativos

Amostra
- Detecção **gene X**

Tubos

- 1 Amostra
- 2 Controle (+) gene X
- 3 Controle (-) gene X

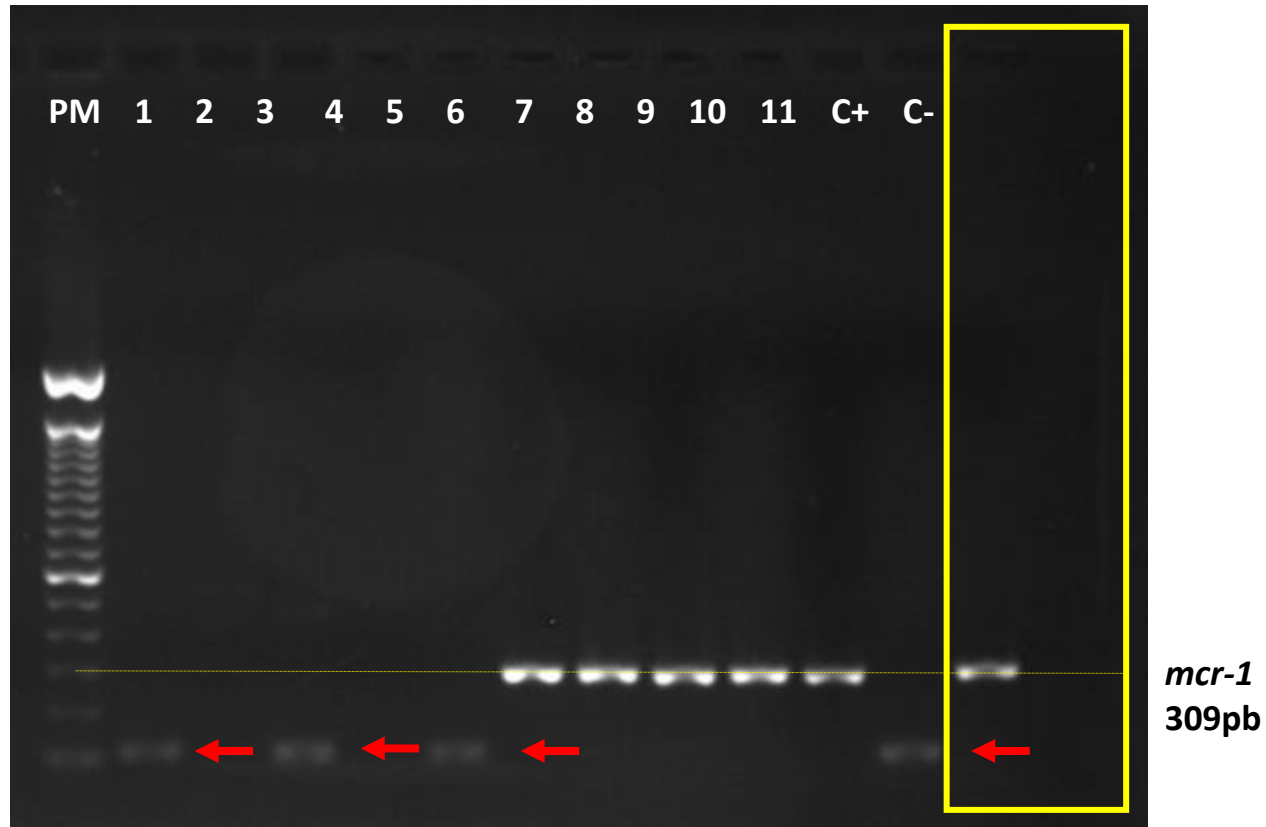
- Detecção **gene 16S**
controle extração

- 4 Amostra
- 5 Controle (+) gene extração
- 6 Controle (-) gene extração

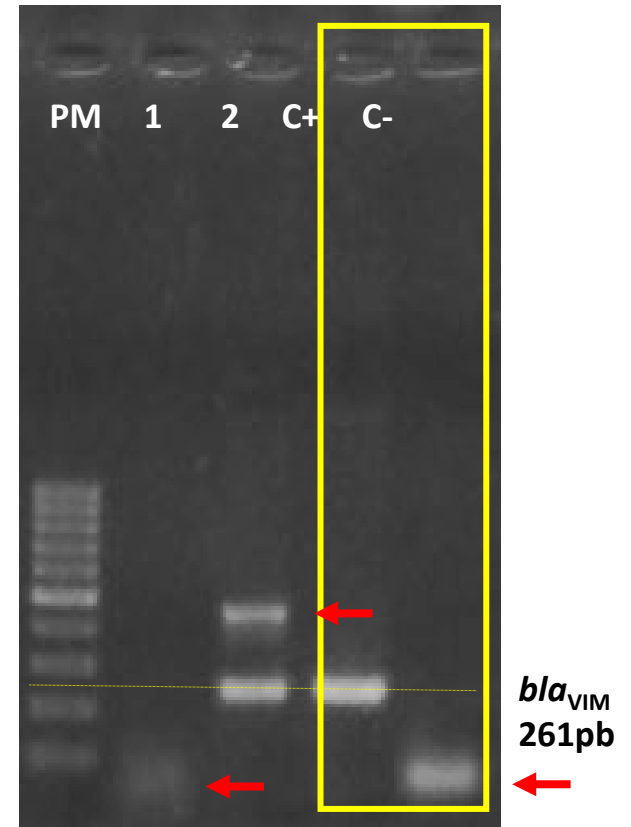
		Possíveis resultados					
		+	-	-	+/-	+/-	+/-
		+	+	-	+	+	+
		-	-	-	-	-	+
		+	+	+	-	+	+
		+	+	+	+	+	+
		-	-	-	-	+	-
Validade do ensaio →		SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Resultado →		+	-	Erro gene X	Erro extr. DNA	Cont. PCR extr.	Cont. PCR gene X

Análise de resultados

PCR detecção gene *mcr-1*



PCR detecção gene *bla_{VIM}*



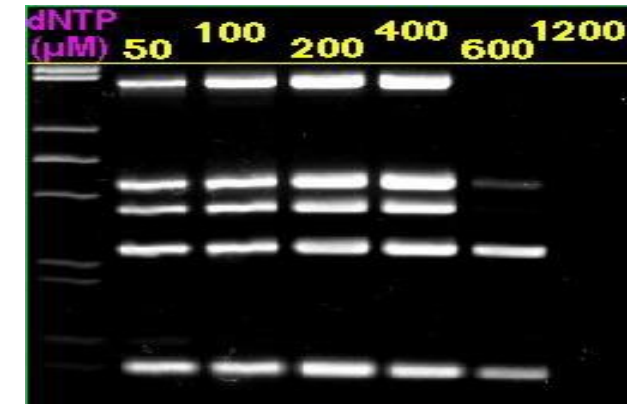
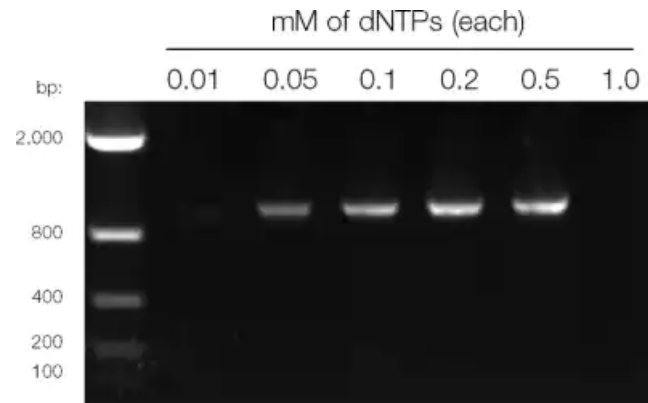
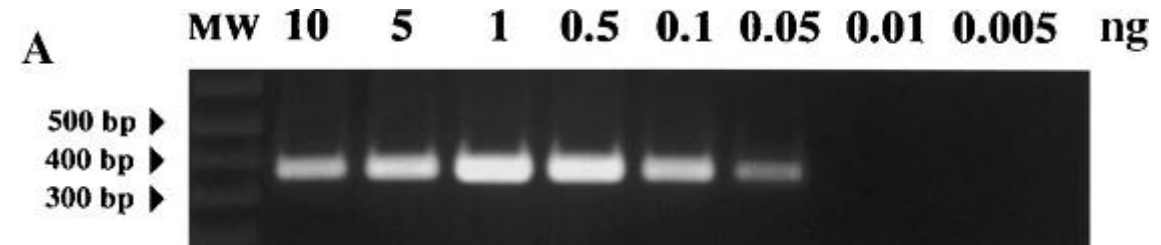
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Fatores que influenciam sobre a amplificação por PCR - 1

- **Água** → qualidade óptima MilliQ ou bidestilada ou similar

- **DNA molde** → qualidade de extração (ótimo kit)
→ quantidade de DNA
→ presença de inibidores da PCR

- **dNTP's** → concentração
→ qualidade

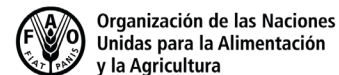


Faixa concentração → 50-200 μM

Sc. Stock : 10 mM/cada dNTP
Conc. Final: 200 μM /cada dNTP

PCR Setup—Six Critical Components to Consider. <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html>

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Fatores que influenciam sobre a amplificação por PCR - 2

- **Magnésio** (Mg²⁺) → >> concentração << adstringência

Faixa concentração → 1-5 mM

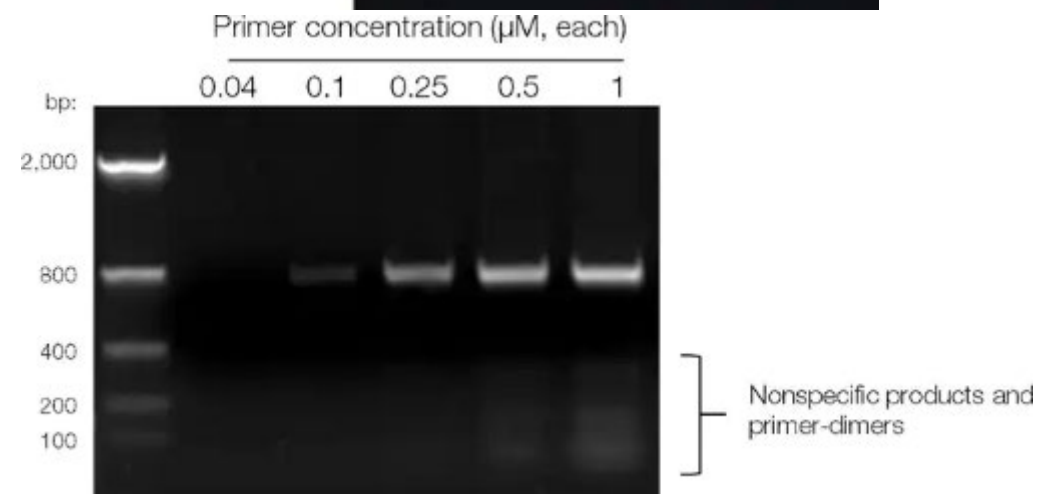
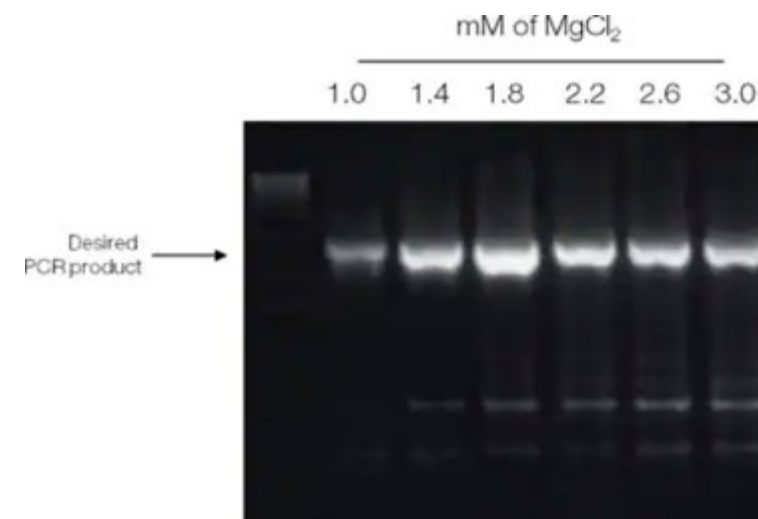
Conc. Final: 1,5 mM

- **Primers** → concentração
- **temperatura de anelamento ou *annealing***
- **seqüência nucleotídica** (anelamento próprio/formação de dímeros)

Faixa concentração → 0,1-0,5 μM

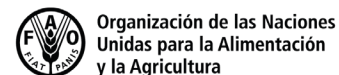
Sc. Stock : 10 μM

Conc. Final: 0,2 μM /cada primer



PCR Setup—Six Critical Components to Consider. <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html>

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Fatores que influenciam sobre a amplificação por PCR – 3 *Primers*

- *Primers* → **sequência nucleotídica** (anelamento próprio/formação de dímeros)



DESENHO DE *PRIMERS*

Longitude: 18-24 nucleotídeos (cumprimentos 30-35 ntds)

Conteúdo GC: 40-60%

T^oannealing: $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C}+\text{G}) - 5^{\circ}\text{C}$ (óptima 50-64°C)

Sequência: Evitar ≥ 3 C ou G no extremo 3'

Evitar complementariedade interna no extremo 3'

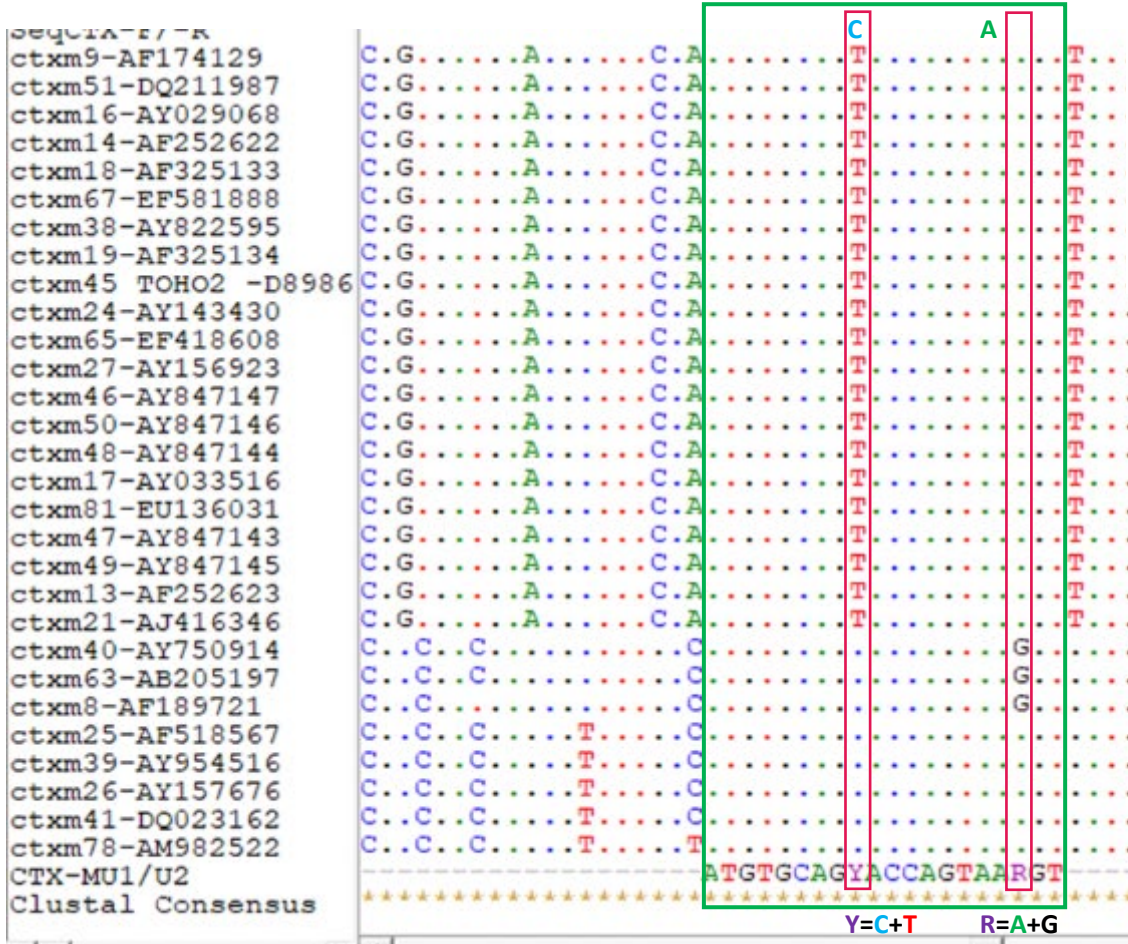
Evitar complementariedade entre *primers* (dimerização)

Concentração: 0,1-0,5 μM → 0,2 μM útil para a maioria de casos

Armazenamento: Solução *stock* 1-0,1mM em H₂O ou buffer TE a -20°C

Genes e variantes, o que estou detectando?

O caso de CTX-M → PRIMERS UNIVERSAIS



Nombre primer	Gen	Secuencia 5'--3'
CTX-MU1	ctx-m	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT
CTX-MU2		TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA

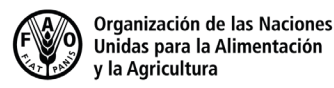
Pagani, et al, JCM 41(9):4264-4269, 2003

Tamaño amplicon	Ciclado
593 pb	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min; Ciclado =30-35 ciclos de:94°C 30seg -- 52° 30seg -- 72°C 60seg; Extensión final = 72°C por 5min

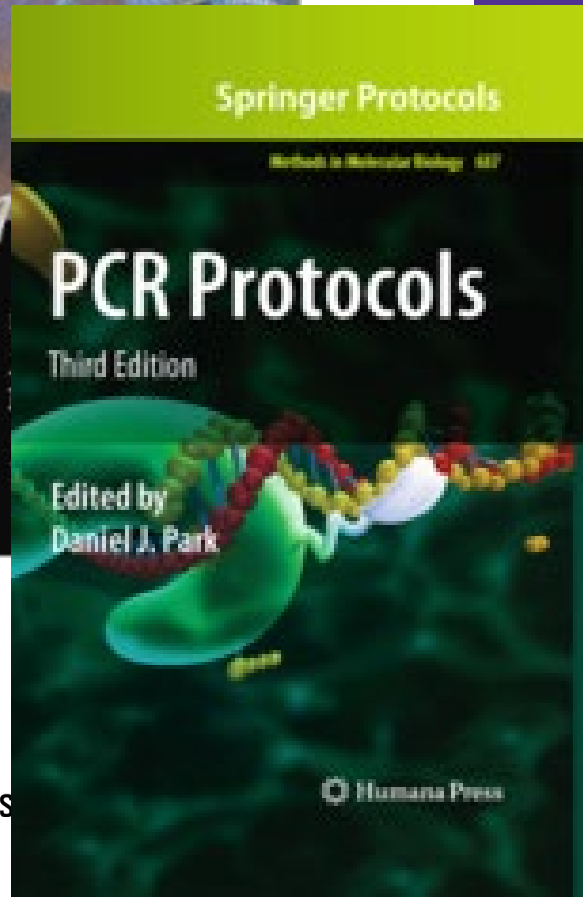
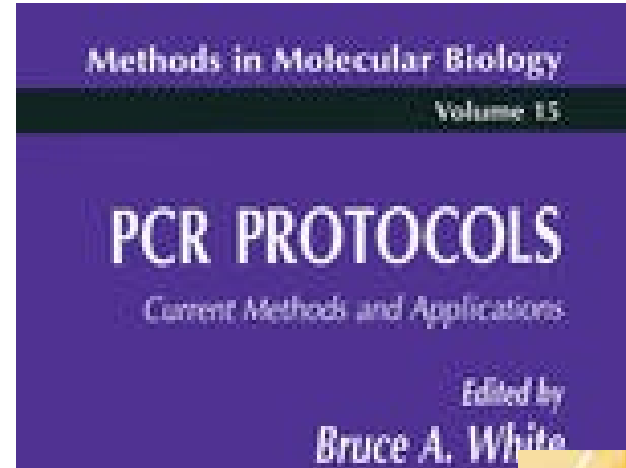
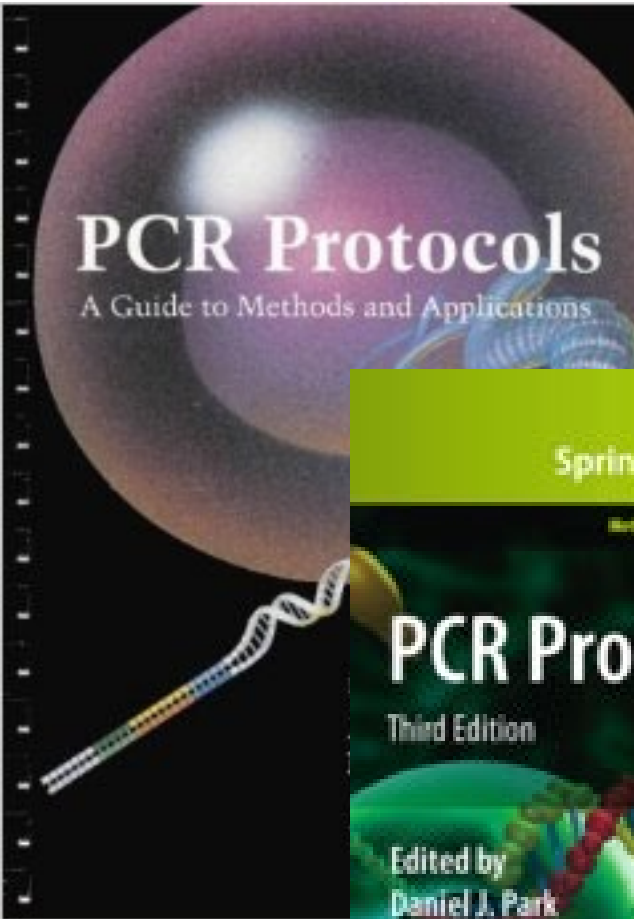
Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
ADN	2,5 ul
Buffer 10X	2,5 ul
MgCl2 (50 mM)	0,75 ul
dNTP's (10 mM)	0,5 ul
Tag pol (5U/ul)	0,15 ul
Primer Forward (10 µM)	1,5 ul
Primer Reverse (10 µM)	1,5 ul
H2O	15,6 ul
Vol. Final	25 ul

>> concentração de primers

TRABAJAN
 JUNTOS
 PARA COMBATIR
 LA RESISTENCIA
 A LOS ANTIMICROBIANOS



Protocolos de PCR



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2004 Nov;25(11):970-2.

[Study on the molecular epidemiology of beta-lactamase TEM gene in isolated Streptococcus pneumoniae].

[Article in Chinese]
 Ding YF, Zhang JH, Mi ZH, Qin L, Tao YZ, Qi X.

Affiliated Children's Hospital of Suzhou University, Suzhou 215003, China.

Abstract

OBJECTIVE: To investigate the beta-lactamase TEM gene of isolated Streptococcus pneumoniae

METHODS: Twenty-three strains of Sp were collected from respiratory tract secretions of children w at Children's Hospital of Suzhou University (reference strain ATCC49619) to build TEM polymerase c coli. 9-j53R1 with TEM gene) TEM gene of 23 strains was detected to comparo the sequences with p analyzing TEM gene model.

RESULTS: Twenty-one strains had TEM gene with a positive rate of 91.3% (21/23). TEM-129 gene we resistance) TEM sequence. New discovered TEM-129 sequence had a modification (ATG[M-->ATA[I]) www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide, AY452662). TEM-1 genes were confirmed from other TEM sequences had been published (GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide, AY392531) too.

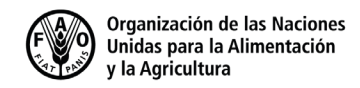
CONCLUSION: Isolated Sp had TEM gene (TEM-129, EM-1 genotype) with a positive rate of 91.3%. The Sp with penicillin resistance.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007) **60**, 702–707
 doi:10.1093/jac/dkm239
 Advance Access publication 26 June 2007

Learning from mistakes: Taq polymerase contaminated with β -lactamase sequences results in false emergence of Streptococcus pneumoniae containing TEM

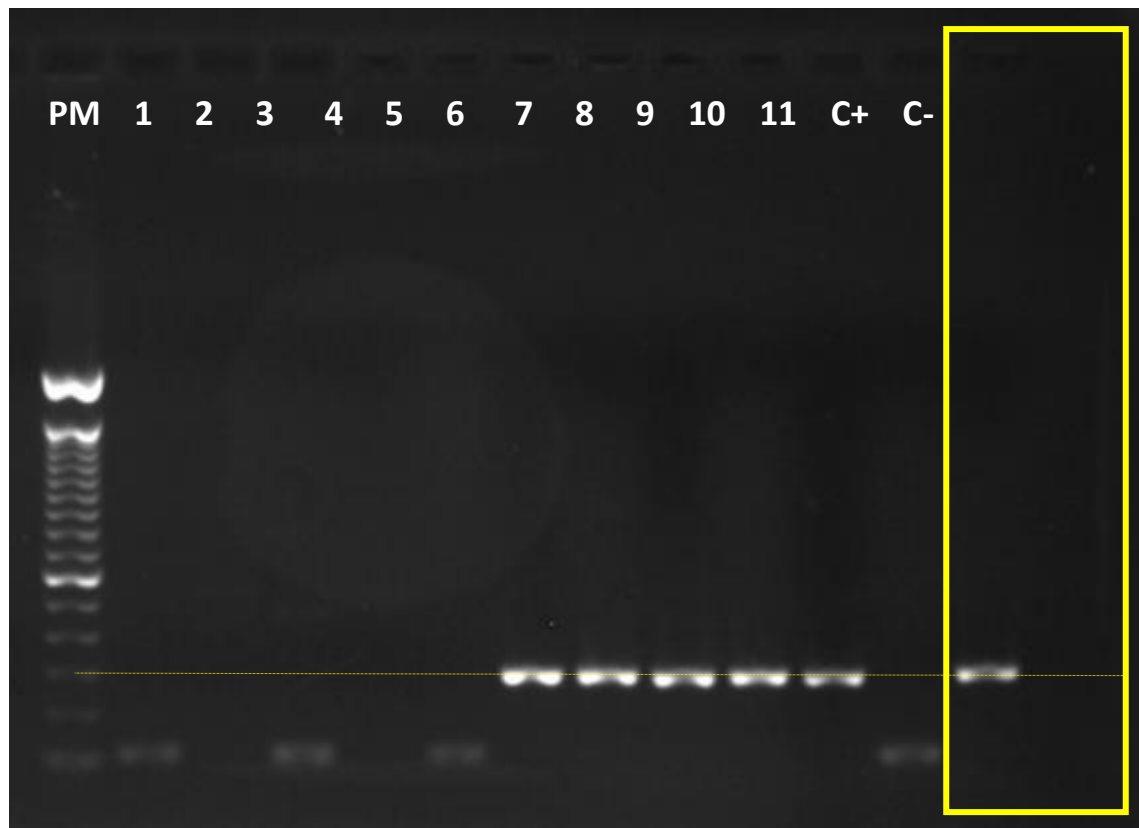
Raffaella Koncan¹, Aránzazu Valverde², María-Isabel Morosini²,
 María García-Castillo², Rafael Cantón², Giuseppe Cornaglia¹,
 Fernando Baquero² and Rosa del Campo^{2*}

TRABAJANDO
 JUNTOS
 PARA COMBATIR
 LA RESISTENCIA
 A LOS ANTIMICROBIANOS

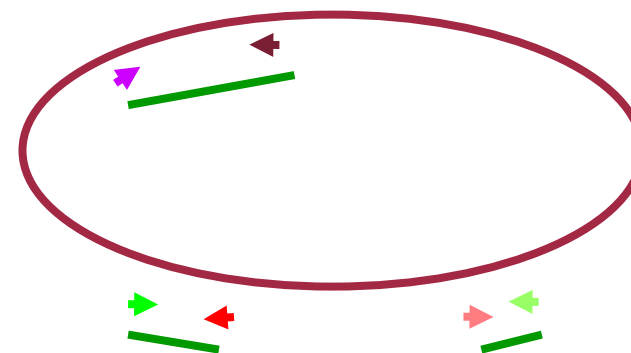


PCR de ponto final

PCR detecção gene *mcr-1*



PCR monoplex

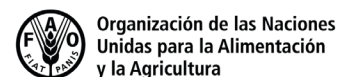


Reações

1 2 3

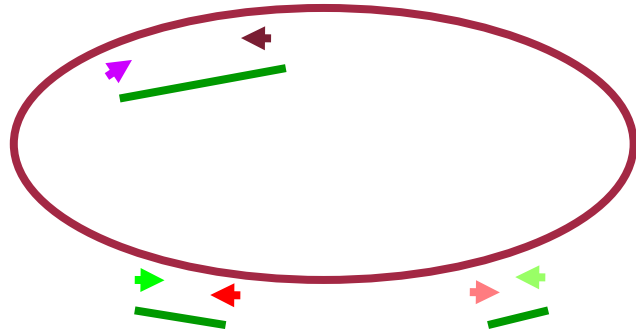


TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



PCR de ponto final Multiplex

PCR Multiplex



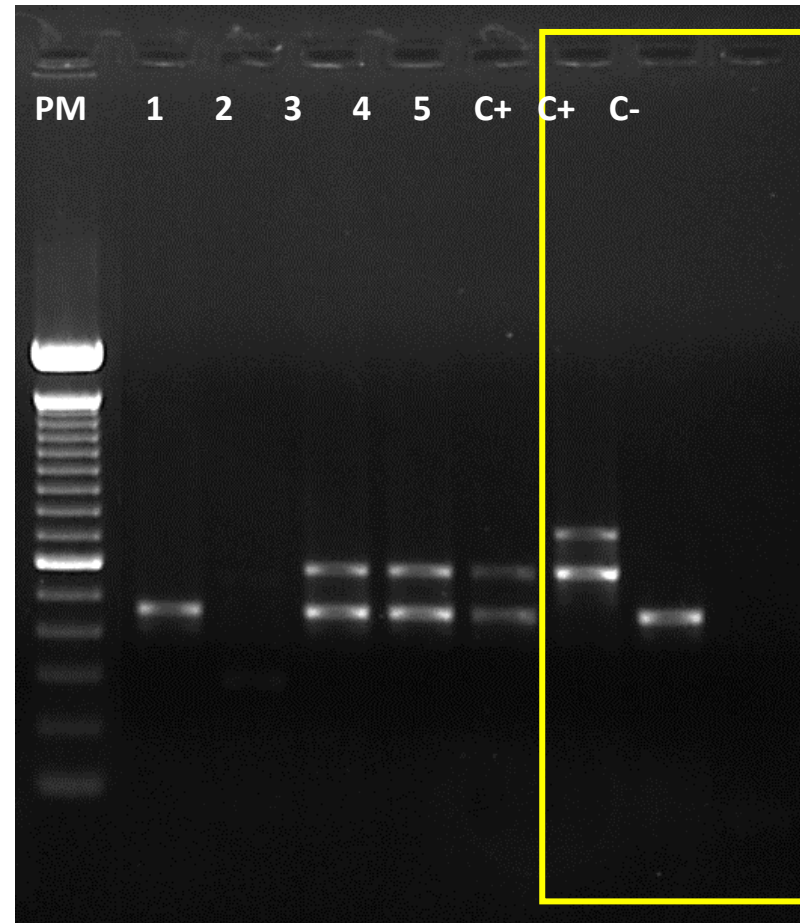
Reações
1



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

PCR Multiplex R-C3G

*bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}, *bla*_{CMY}



739 pb PER-2

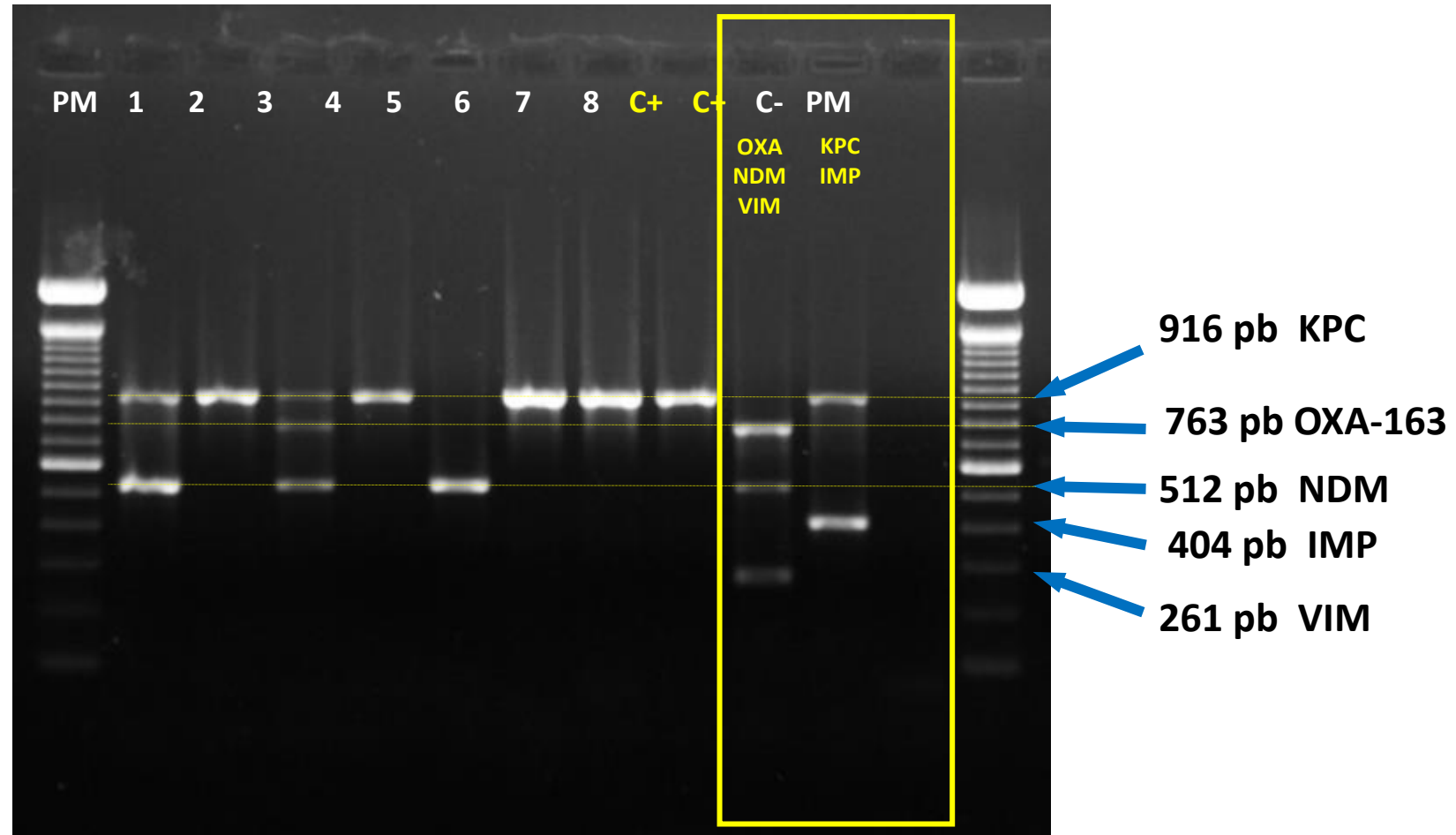
593 pb CTX-M-U

462 pb CMY

PCR de ponto final Multiplex

PCR Multiplex carbapenemases

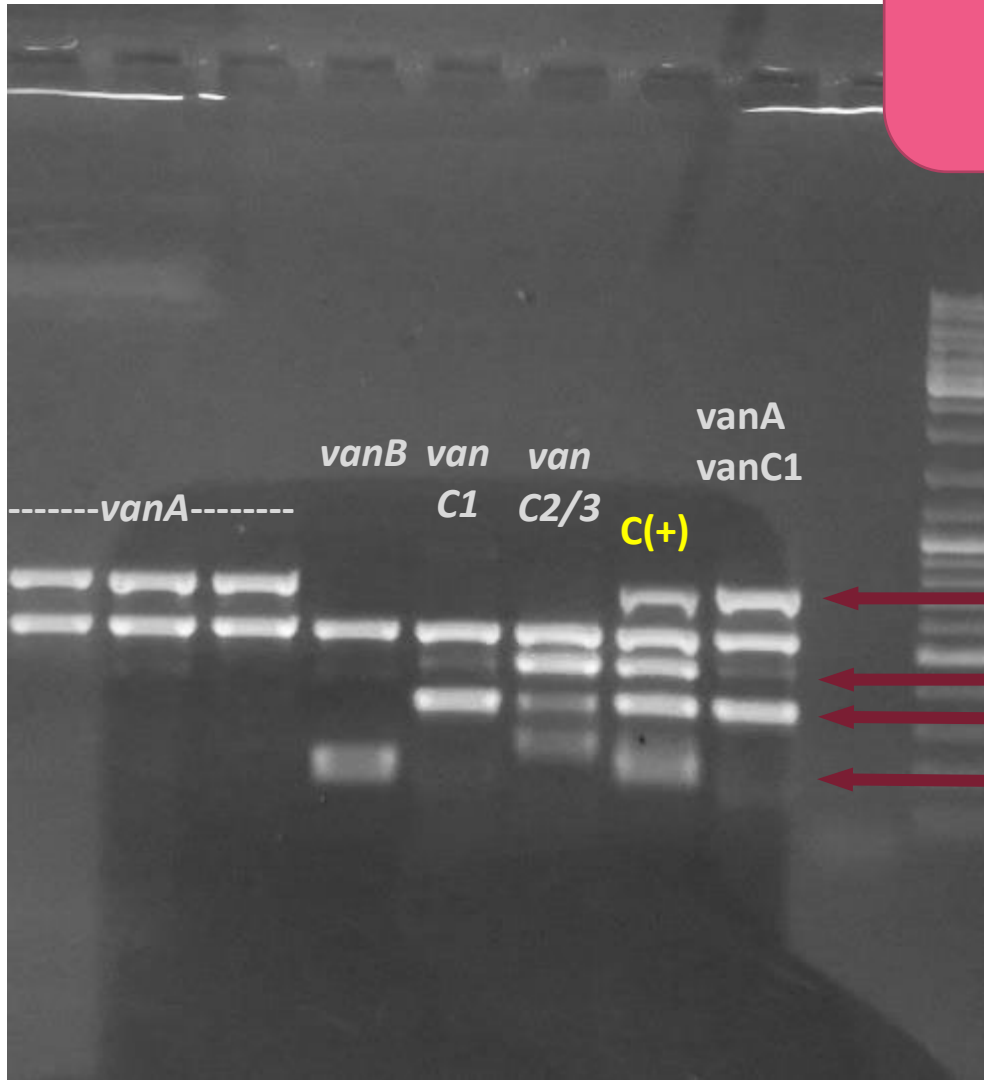
*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48L}



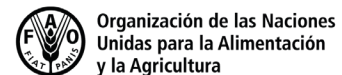
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

PCR de ponto final Multiplex

PCR Multiplex *vanA, vanB, vanC1, vanC2/3*



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



¿Quais mecanismos de resistência deveriam ser procurados por PCR?

Prioridade

E. coli

Cef. 3ra. Gen. → bla_{CTX-M} ; bla_{CMY}

Colistina → *mcr-1*

Salmonella spp.

Cef. 3ra. Gen. → bla_{CTX-M} ; bla_{CMY}

Colistina → *mcr-1*

Macrolídeos → *mphA*

Enterococcus spp.

Glicopeptídeos → *vanA*; *vanB*

Opcionais

E. coli / *Salmonella spp.*

SE FOR CONFIRMADA RESISTÊNCIA FENOTÍPICA A CARBAPENEMAS

→ **Encaminhar para LNR** para PCR

multiplex e/ou sequenciação → bla_{KPC} ;

bla_{NDM} ; bla_{VIM} ; bla_{IMP} ; $bla_{OXA-48L}$

Outros

Dependendo da epidemiologia local

MUITO OBRIGADO!!!

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

