

Métodos moleculares para diagnóstico de RAM

PCR: fundamentos, requerimientos del laboratorio y limitaciones

Dr. Diego Faccone

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

Lab. Nacional/Regional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos.

Centro Colaborador de OMS en Vigilancia de Resistencia a los 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



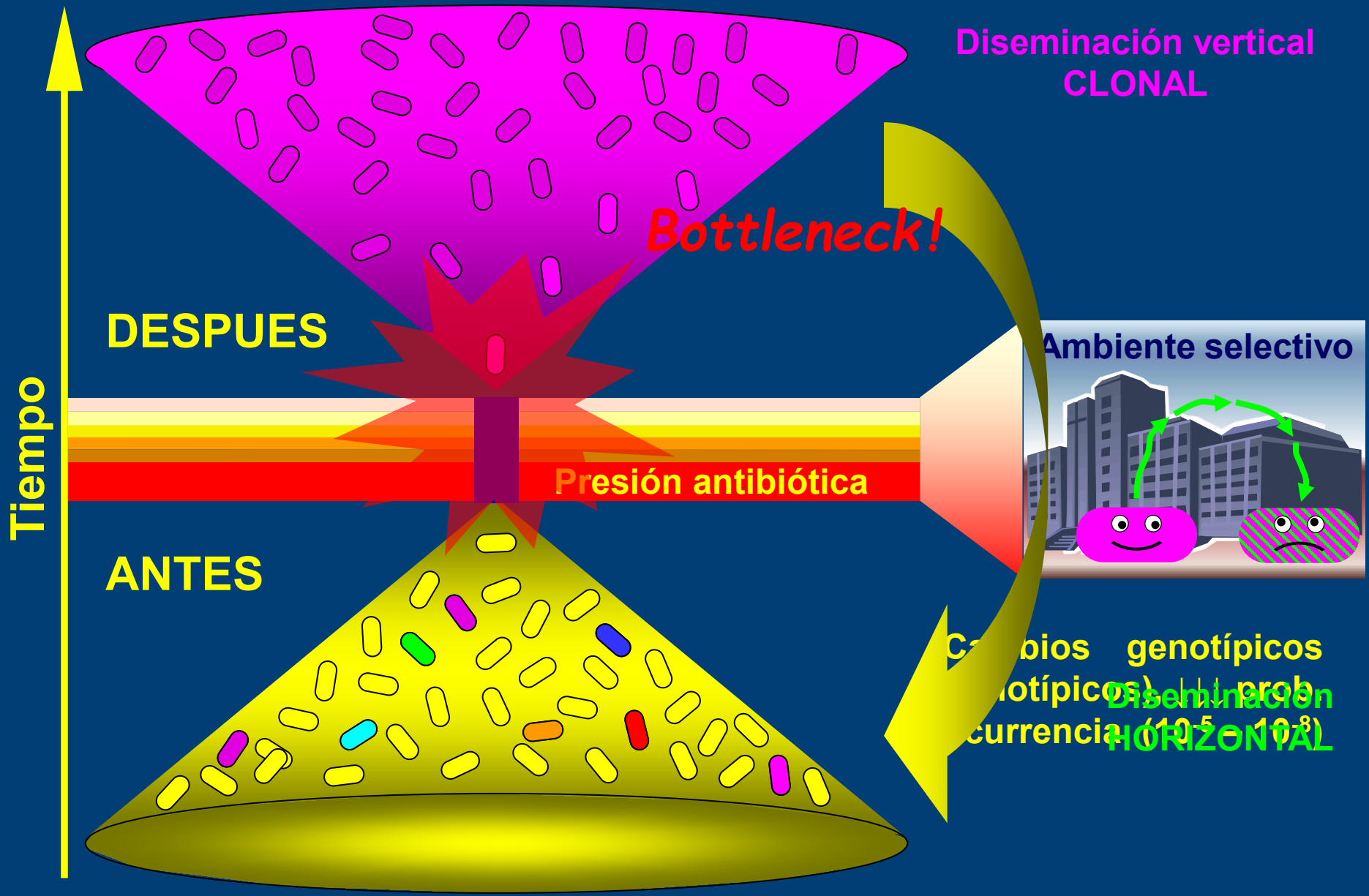
Unión Europea



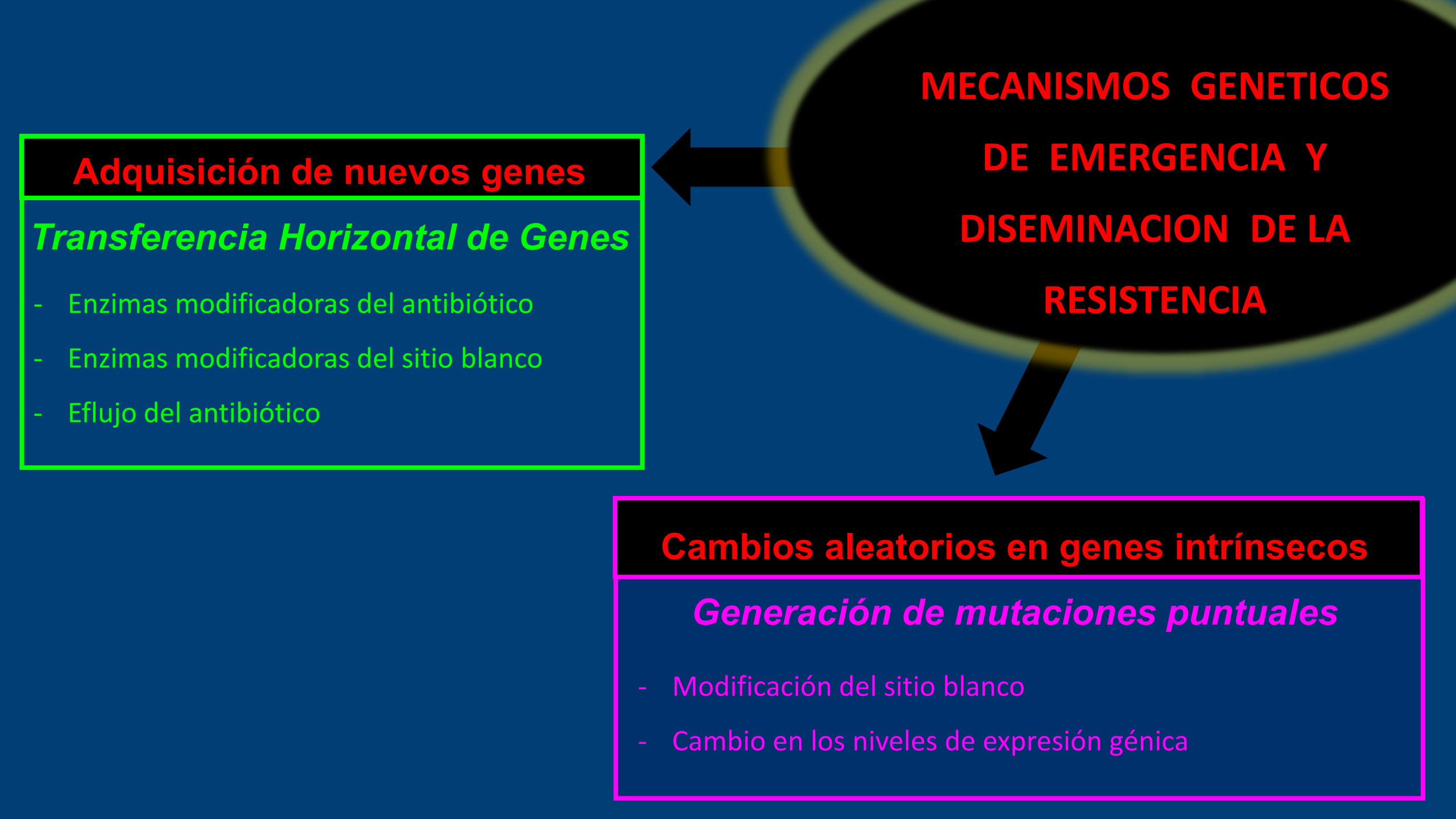
EMERGENCIA

DISEMINACIÓN

EMERGENCIA Y DISEMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



**MECANISMOS GENETICOS
DE EMERGENCIA Y
DISEMINACION DE LA
RESISTENCIA**



Adquisición de nuevos genes

Transferencia Horizontal de Genes

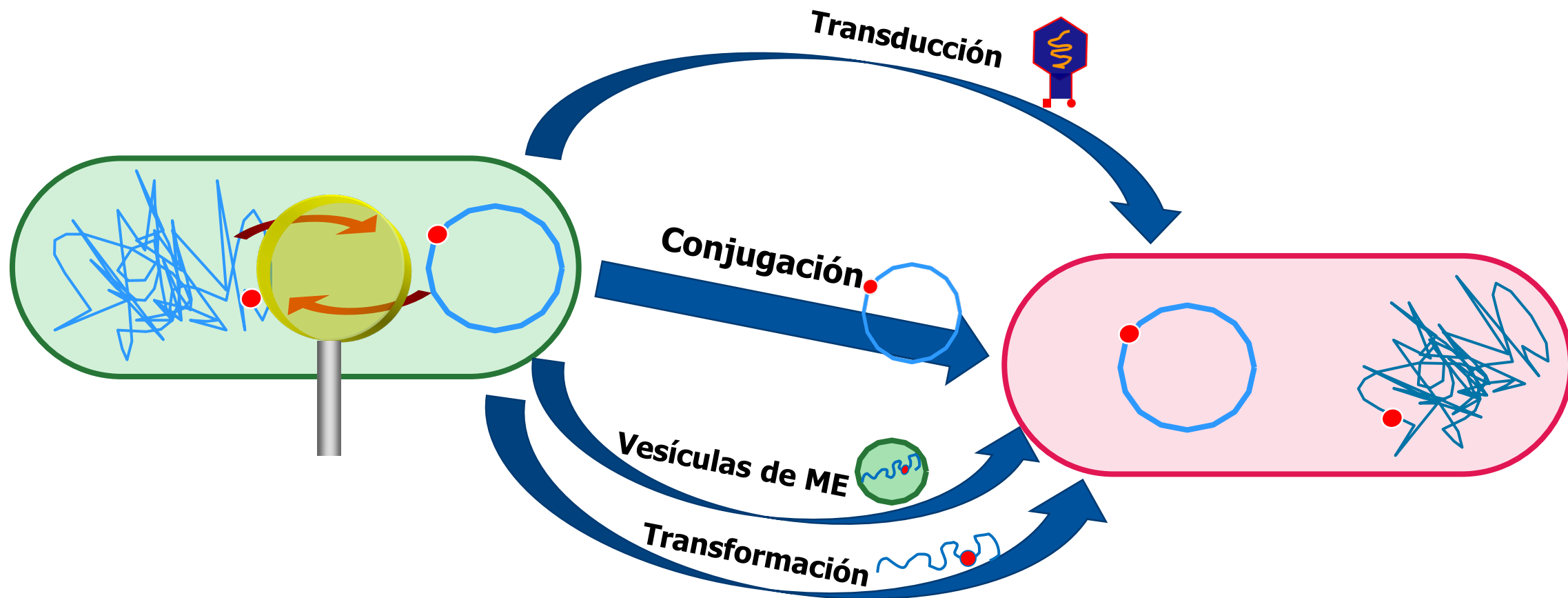
- Enzimas modificadoras del antibiótico
- Enzimas modificadoras del sitio blanco
- Eflujo del antibiótico

Cambios aleatorios en genes intrínsecos

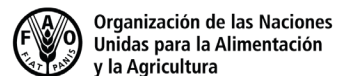
Generación de mutaciones puntuales

- Modificación del sitio blanco
- Cambio en los niveles de expresión génica

Genes de resistencia y su movilidad



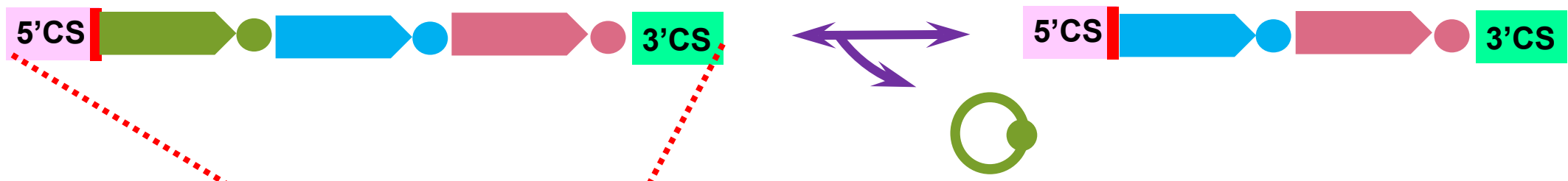
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



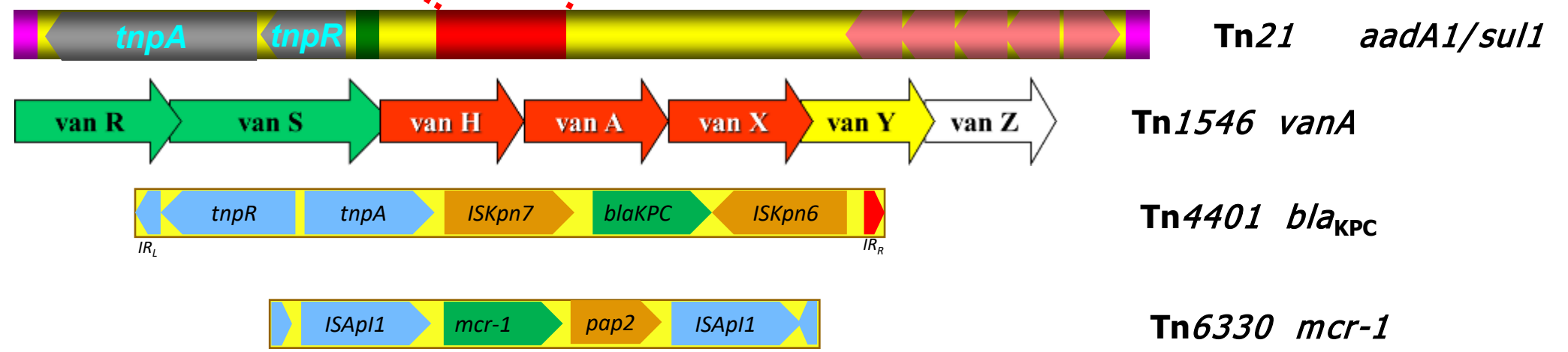


Genes de resistencia y su movilidad

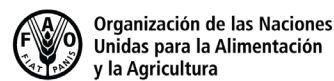
Integrones



Transposones

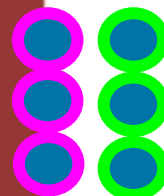


TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



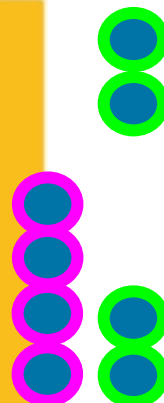
Priority 1: CRITICAL

- *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 Prioritarios WHO

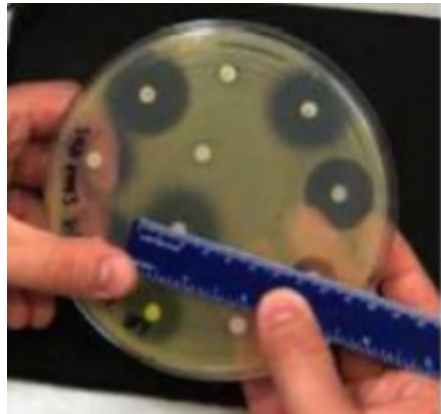
 **Cambios aleatorios en genes intrínsecos**

- Mutaciones espontaneas

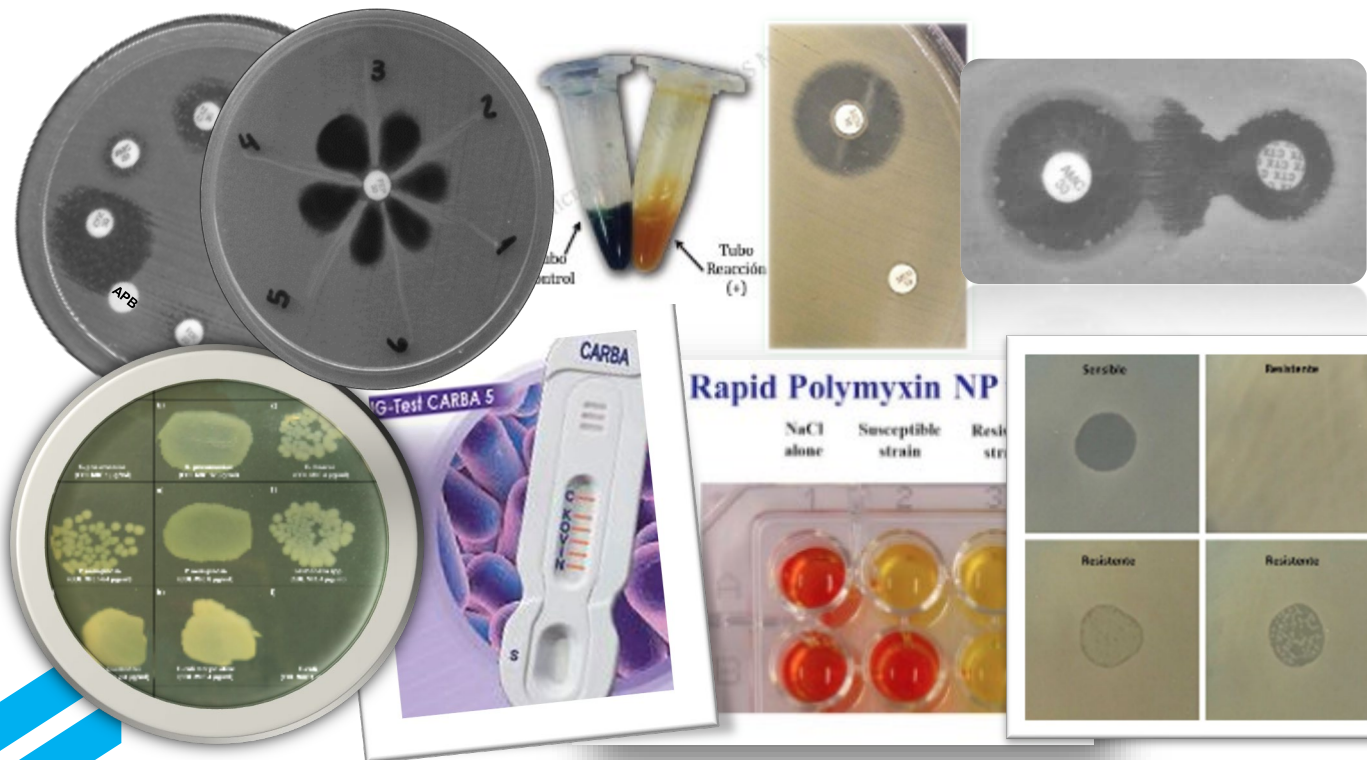
 **Adquisición de nuevos genes (THG)**

- Conjugación
- Transformación
- Transducción
- Vesículas de ME

Evaluación fenotípica de la sensibilidad a los ATMs

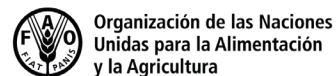


Confirmación fenotípica de mecanismos de resistencia



Confirmación molecular de mecanismos de resistencia

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Confirmación molecular de mecanismos de resistencia

Detección de genes

- Amplificación ADN
 - i) Cambios de temperaturas → Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - ii) Isotérmica → Amplificación isotérmica mediada por loop (LAMP)
- Hibridación de ADN
- Secuenciación completa de genoma

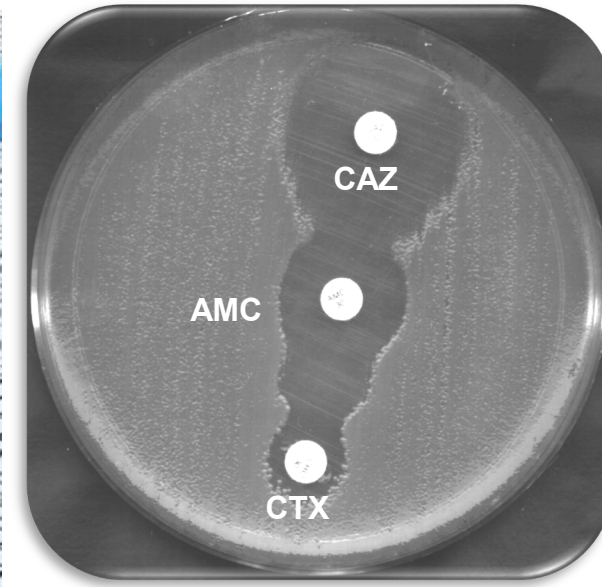


*bla*_{CTX-M}



CTX-M

BLEE

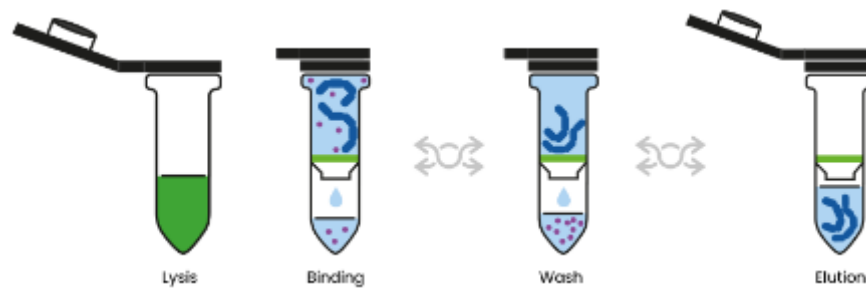


Área extracción ADN

Hervido o boiling



Sistema comercial



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Área libre de ADN

Instrumental exclusivo para este procedimiento

Preparación
mezcla reacción



Cabina para PCR

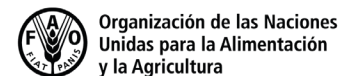


Espacio exclusivo

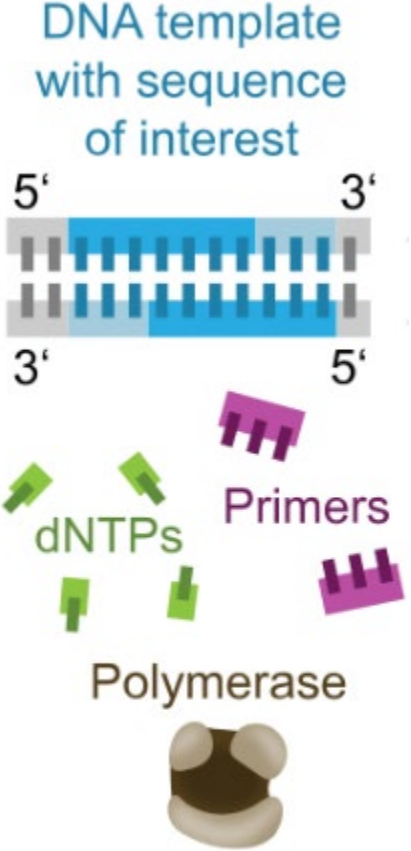


Gradilla refrigerada o
contenedor con hielo

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Reactivos para PCR



- ### Mezcla de reacción (Master Mix)
- ADN polimerasa **termoestable**
 - Buffer de reacción comercial
 - Cloruro de Magnesio (Mg^{2+})
 - dNTP 's = ATP + CTP + GTP + TTP
 - Primer Forward/Plus/Más
 - Primer Reverse/Minus/Menos
 - Agua calidad biología molecular

- **ALTAMENTE SENSIBLE**
- **ESPECÍFICA**
- **ECONÓMICA**
- **RÁPIDA**

- **ADN molde o templado** (sospechoso de contener el gen en cuestión) (se agrega en un área distinta de donde se prepara la mezcla de reacción)

- ### Master Mix Comercial (opcional)
- Master Mix
 - Primer Forward/Plus/Más
 - Primer Reverse/Minus/Menos
 - Agua calidad biología molecular

Área agregado ADN

Agregado de ADN
templado a los tubos de
reacción



Amplificación y detección



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura

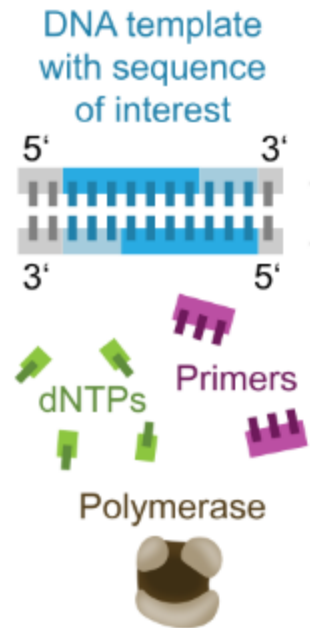


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

Fundamento de la PCR



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Amplificación y detección

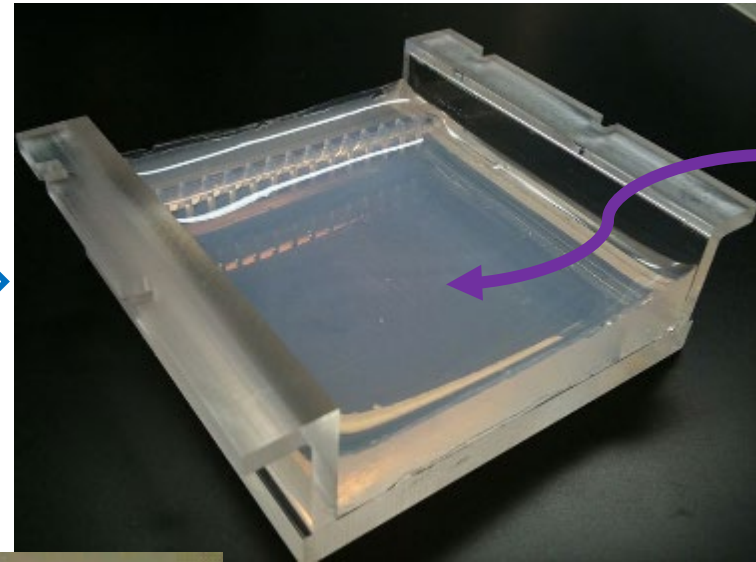


Agregado de ADN templado a los tubos de reacción



PCR

Termociclador



Área de electroforesis

Agarosa 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

Amplificación y detección



Agregado de ADN templado a los tubos de reacción

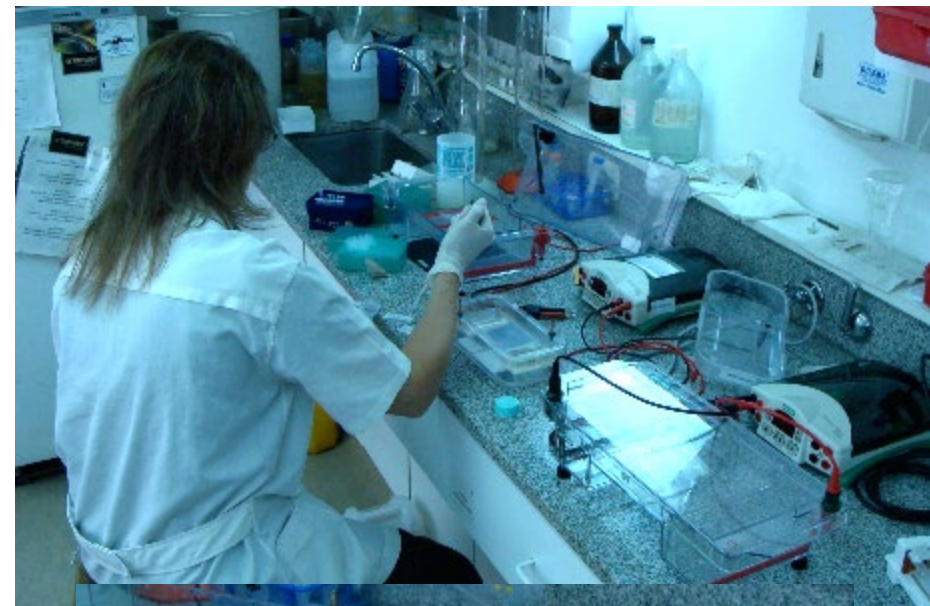


PCR

Termociclador



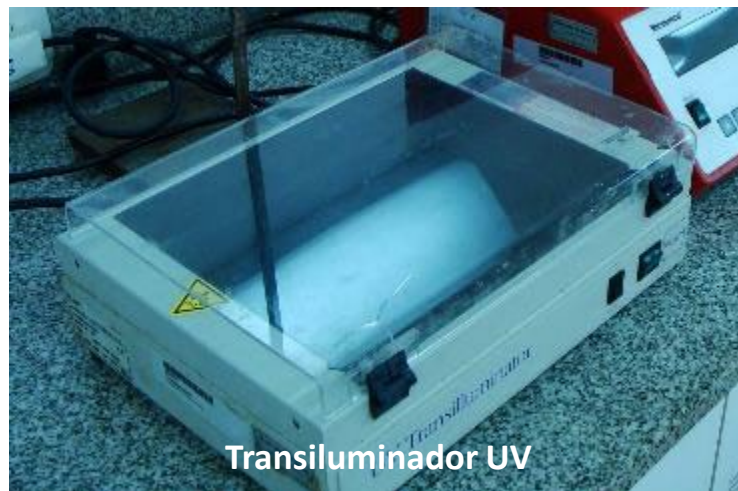
Área de electroforesis



Sistema de electroforesis



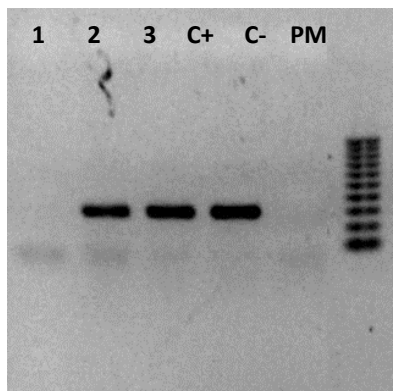
Visualización y registro



Transiluminador UV



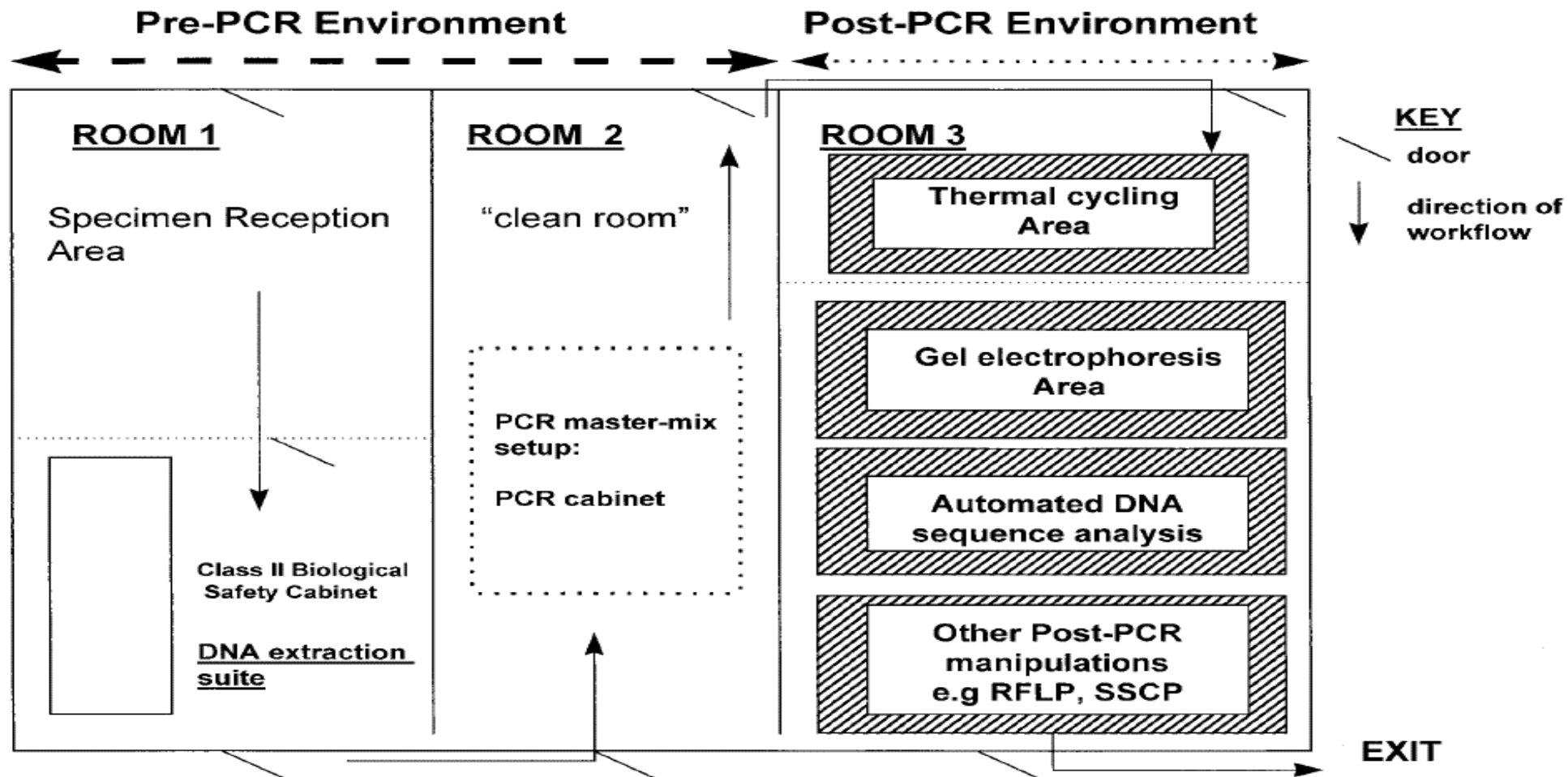
Análisis de resultados



TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



COMPARTIMENTALIZACIÓN DE ÁREAS PARA PCR

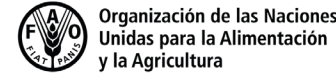


Extracción de ácidos nucleicos

Preparación mezcla reacción

Amplificación y detección

TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



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



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

Controles positivos y negativos

Muestra
- Detección **gen X**

Tubos

- 1 Muestra
- 2 Control (+) gen X
- 3 Control (-) gen X

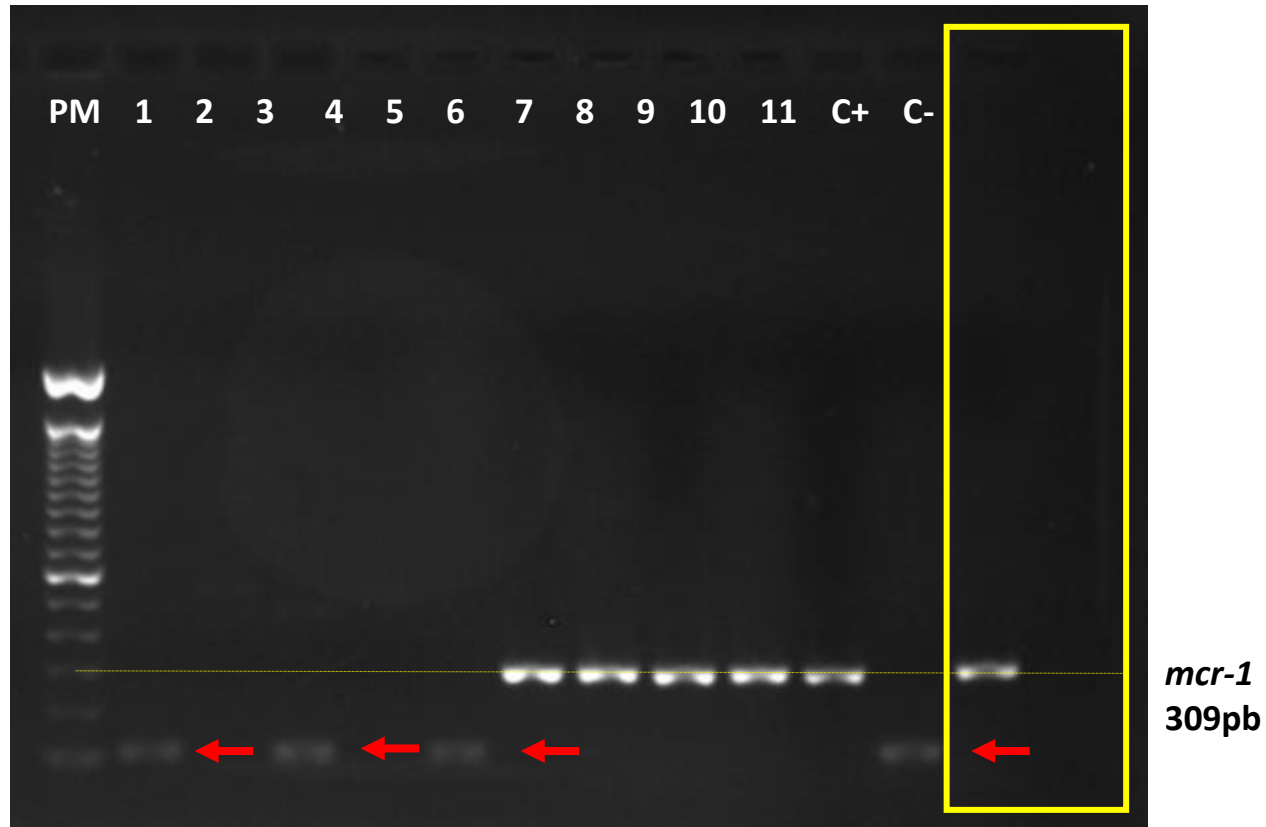
- Detección **gen 16S**
control extracción

- 4 Muestra
- 5 Control (+) gen extracción
- 6 Control (-) gen extracción

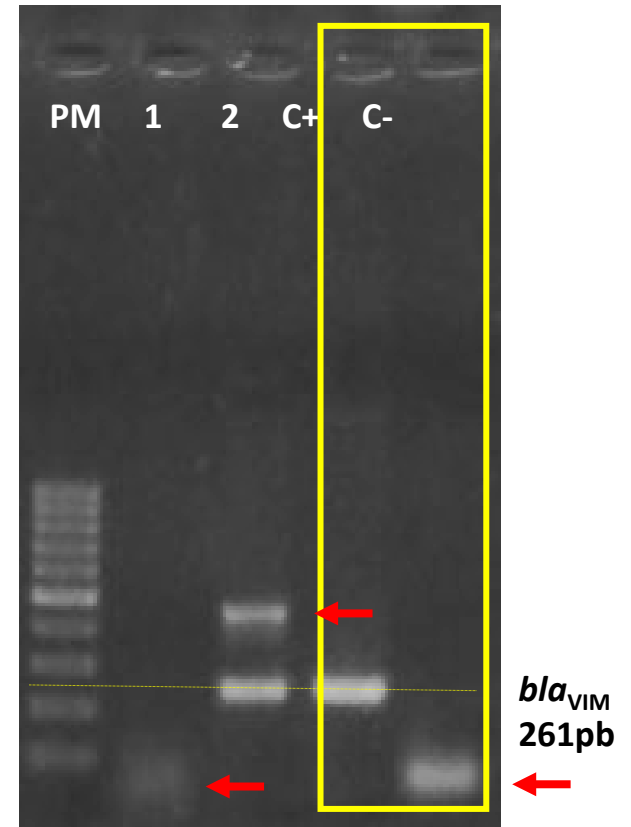
		Posibles resultados					
		+	-	-	+/-	+/-	+/-
		+	+	-	+	+	+
		-	-	-	-	-	+
		+	+	+	-	+	+
		+	+	+	+	+	+
		-	-	-	-	+	-
Validez del ensayo →		SI	SI	NO	NO	NO	NO
Resultado →		+	-	Error gen X	Error extr. ADN	Cont. PCR extr.	Cont.P CR gen X

Análisis de resultados

PCR detección gen *mcr-1*



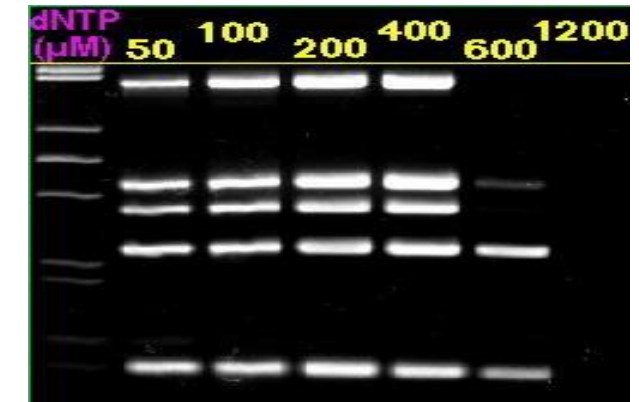
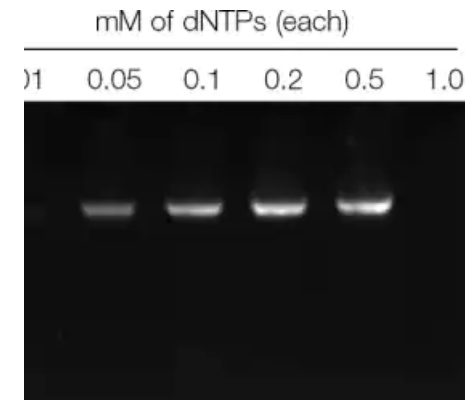
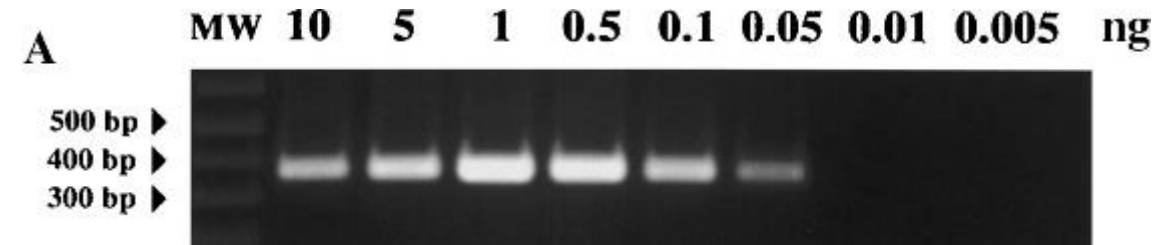
PCR detección gen *bla_{VIM}*



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Factores que influyen sobre la amplificación por PCR - 1

- **Agua** → calidad óptima MilliQ o bi-destilada o similar



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>

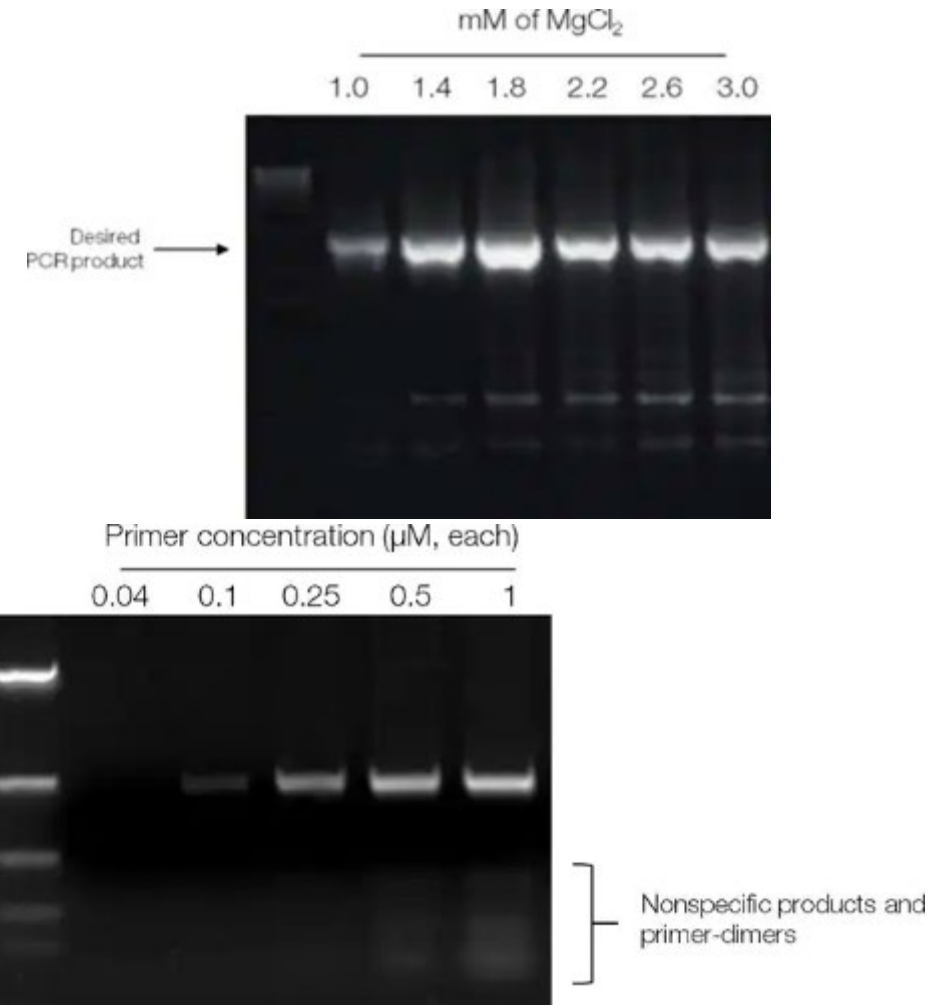
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Factores que influyen sobre la amplificación por PCR - 2

- **Magnesio** (Mg²⁺) → >> concentración << astringencia

Rango concentración → 1-5 mM

Conc. Final: 1,5 mM



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

Factores que influyen sobre la amplificación por PCR – 3 Primers

- **Primers** → **secuencia nucleotídica** (pegado propio/formación de dímeros)



DISEÑO DE PRIMERS

Longitud: 18-24 nucleótidos (largos 30-35 ntds)

Contenido GC: 40-60%

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

Secuencia: Evitar ≥ 3 C o G en el extremo 3'

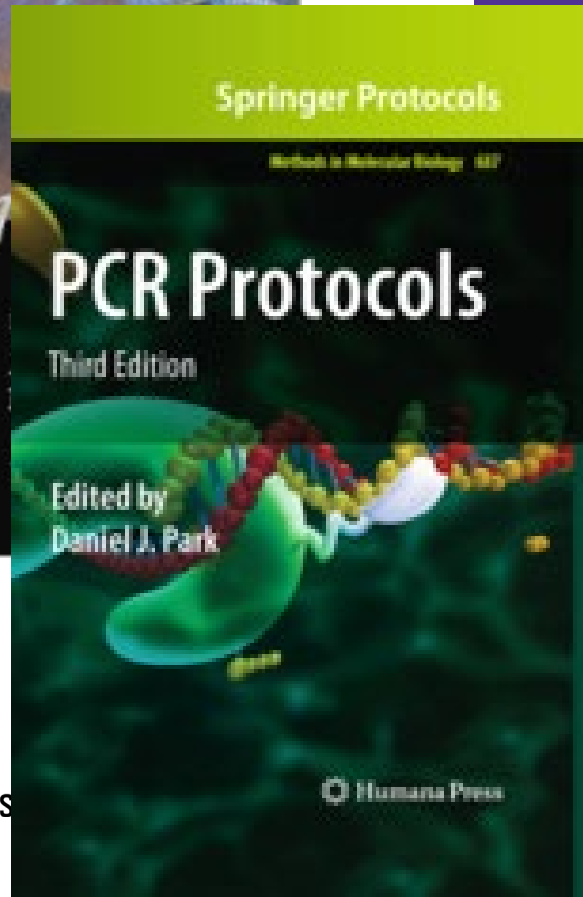
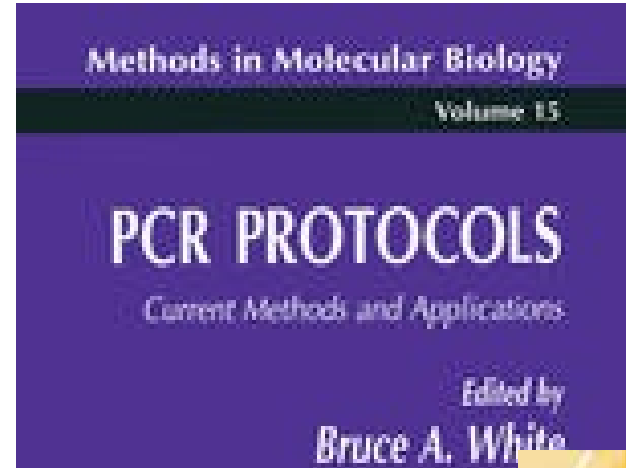
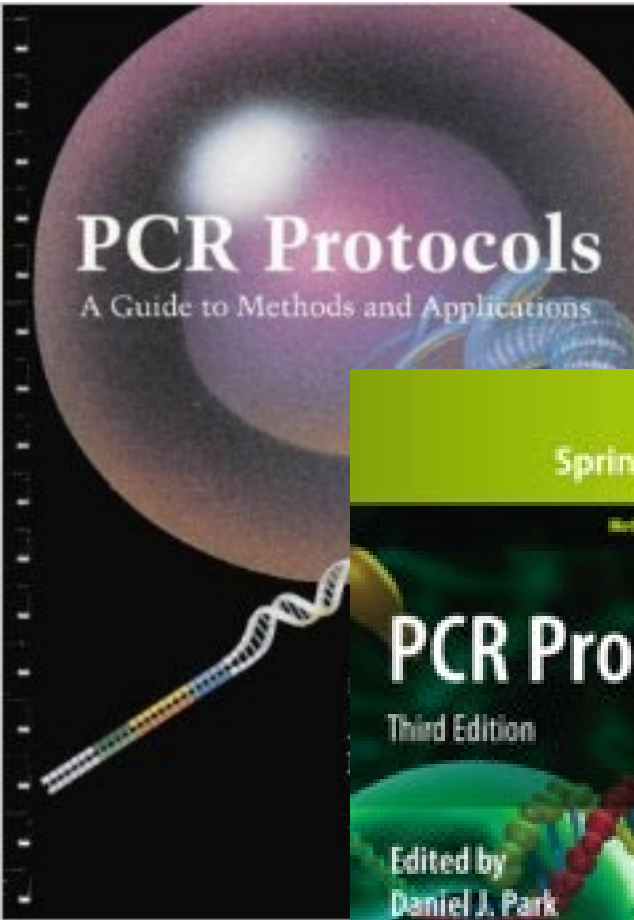
Evitar complementariedad interna en el extremo 3'

Evitar complementariedad entre primers (dimerización)

Concentración: 0,1-0,5 μM → 0,2 μM útil para la mayoría de casos

Almacenamiento: Solución stock 1-0,1mM en H₂O o buffer TE a -20°C

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.

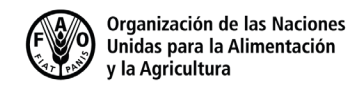
CONCLUSION: Isolated Sp had TEM gene (TEM-129, EM-1 genotype) with a positive rate of 91.3%. The Sp with penicillin resistance.

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*}

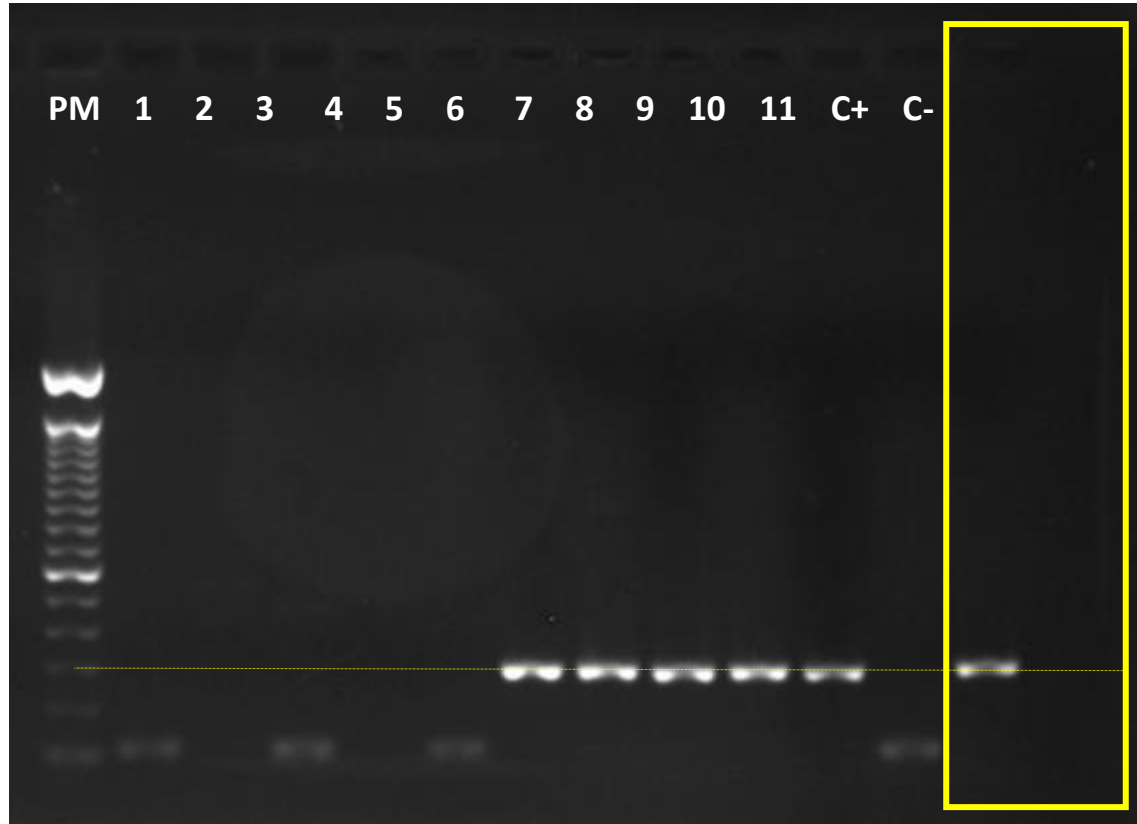
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



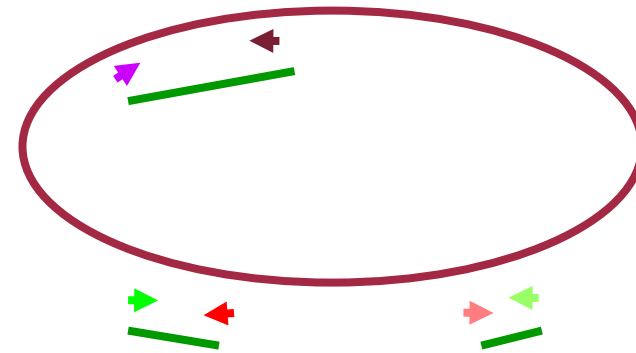


PCR de punto final

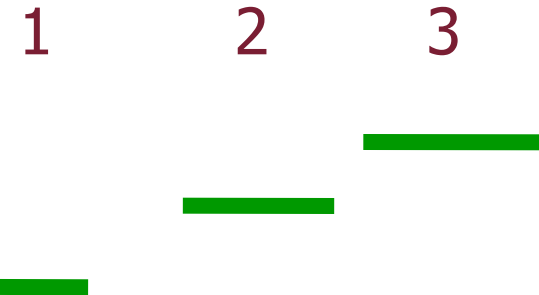
PCR detección gen *mcr-1*



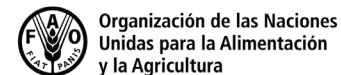
PCR monoplex



Reacciones

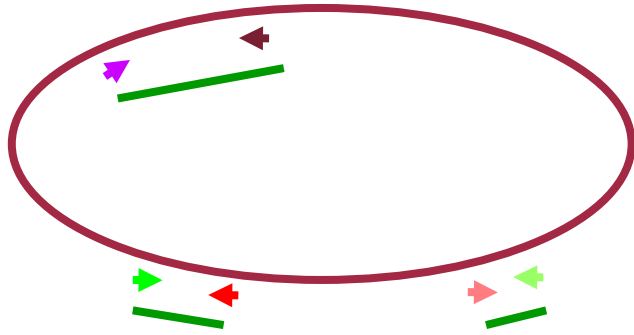


TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



PCR de punto final Multiplex

PCR Multiplex



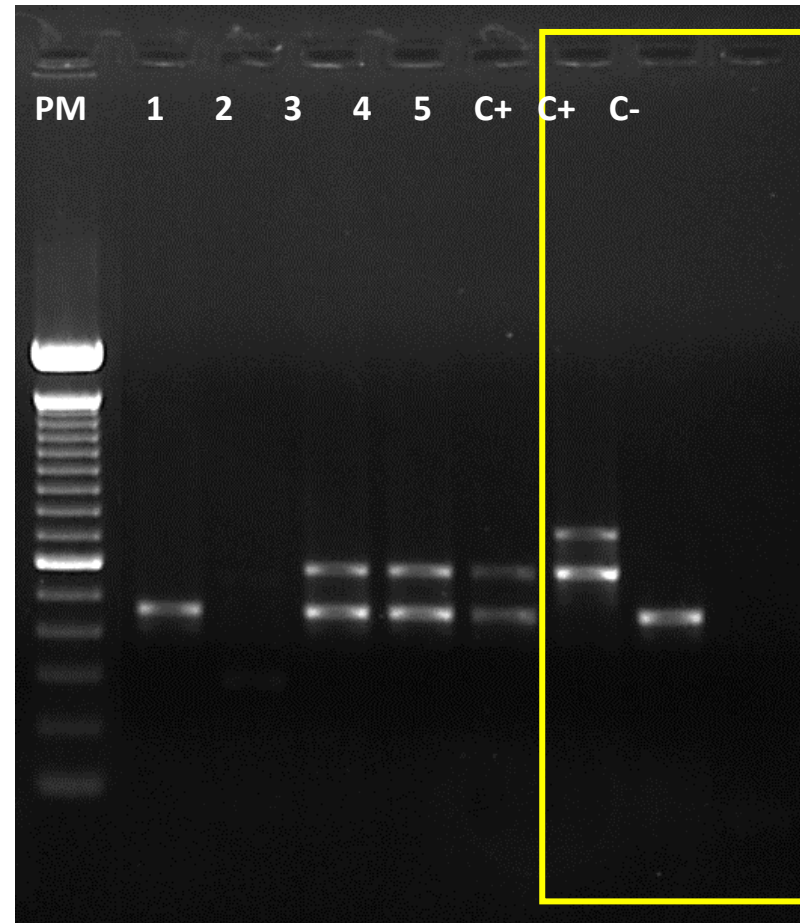
Reacciones
1



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

PCR Multiplex R-C3G

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

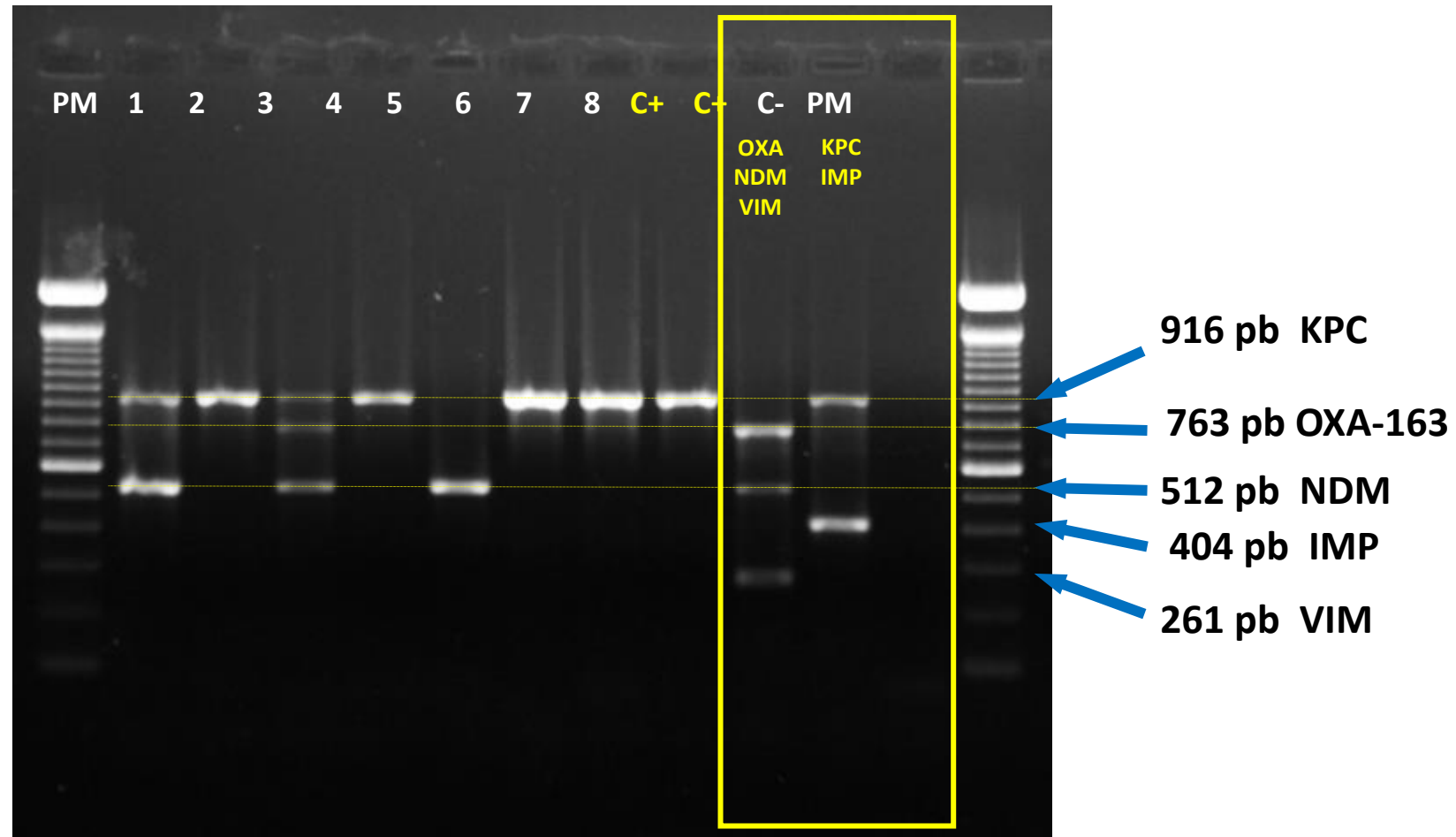


739 pb PER-2
593 pb CTX-M-U
462 pb CMY

PCR de punto final Multiplex

PCR Multiplex carbapenemasas

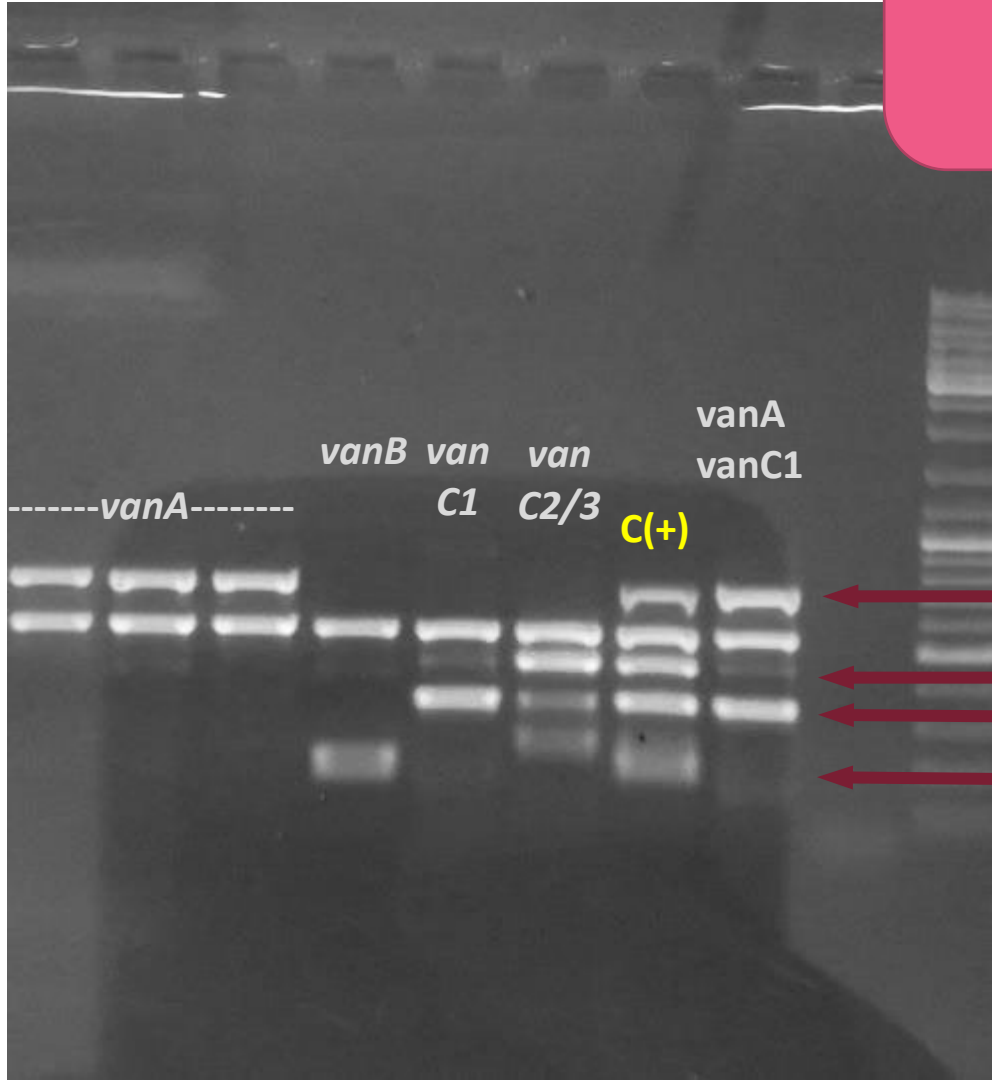
*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48L}



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

PCR de punto final Multiplex

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



549 pb
16SEnt

-----vanA-----

vanB van C1 van C2/3 C(+) vanA vanC1

731 pb *vanA*
448 pb *vanC2/3*
329 pb *vanC1*
175 pb *vanB*

¿Qué mecanismos de resistencia se deberían buscar por PCR?

Prioridad

E. coli
Cef. 3ra. Gen. → bla_{CTX-M} ; bla_{CMY}
Colistin → $mcr-1$

Salmonella spp.
Cef. 3ra. Gen. → bla_{CTX-M} ; bla_{CMY}
Colistin → $mcr-1$
Macrólidos → $mphA$

Enterococcus spp.
Glicopéptidos → $vanA$; $vanB$

Opcionales

E. coli / Salmonella spp.
SI SE CONFIRMA RESISTENCIA FENOTÍPICA A CARBAPENEMES
→ **Derivar al LNR** para PCR multiplex y/o secuenciación → bla_{KPC} ; bla_{NDM} ; bla_{VIM} ; bla_{IMP} ; $bla_{OXA-48L}$

Otros

Dependiendo de la epidemiología local

MUCHAS GRACIAS!!!

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

