

# Métodos moleculares para diagnóstico de RAM

## Estrategias basadas en PCR y otros métodos moleculares aplicados en la caracterización de la RAM

**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](http://www.antimicrobianos.com.ar)

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



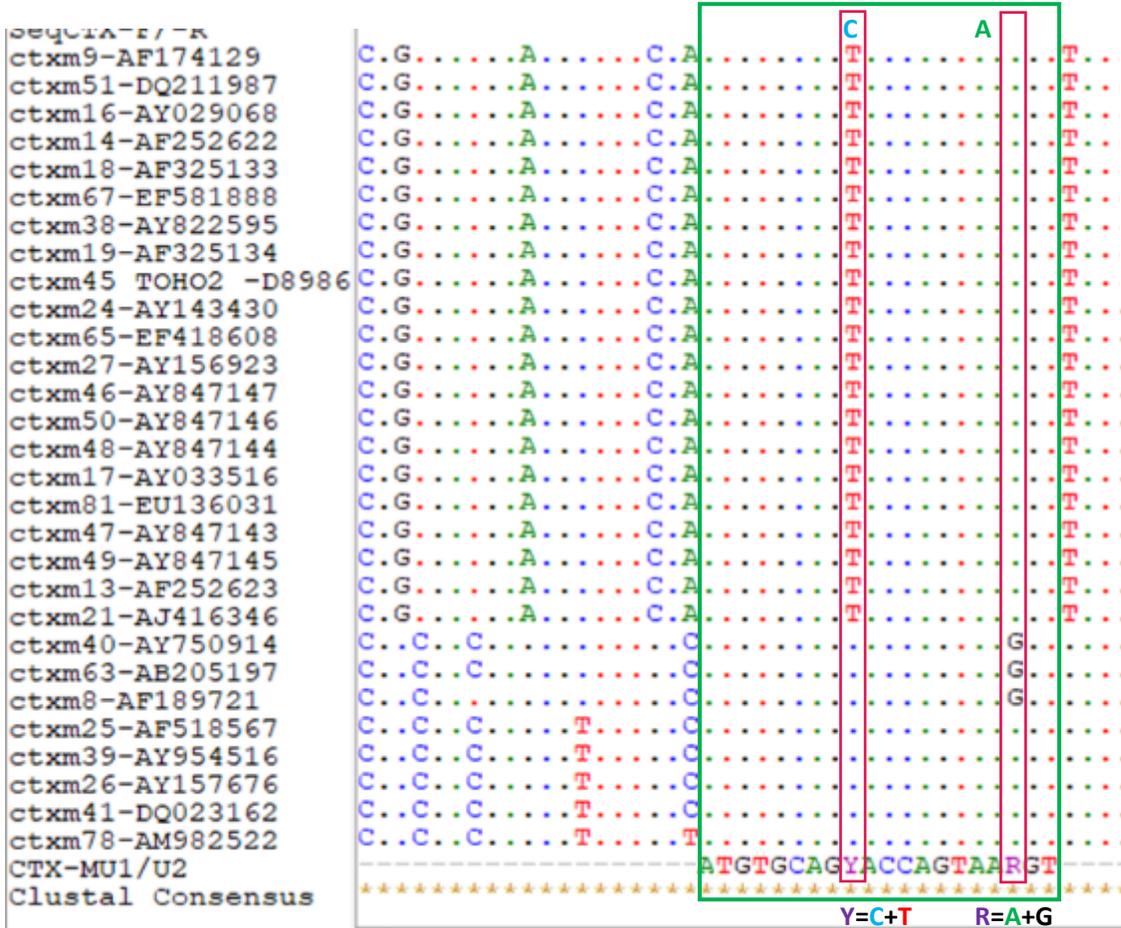
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
*Proteger a los animales, preservar nuestro futuro*



Unión Europea

# Diseño de primers con bases degeneradas

## El caso de CTX-M → PRIMERS UNIVERSALES



| 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 |

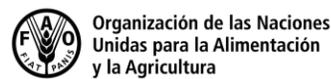
Pagani, et al, JCM 41(9):4264-4269, 2003

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

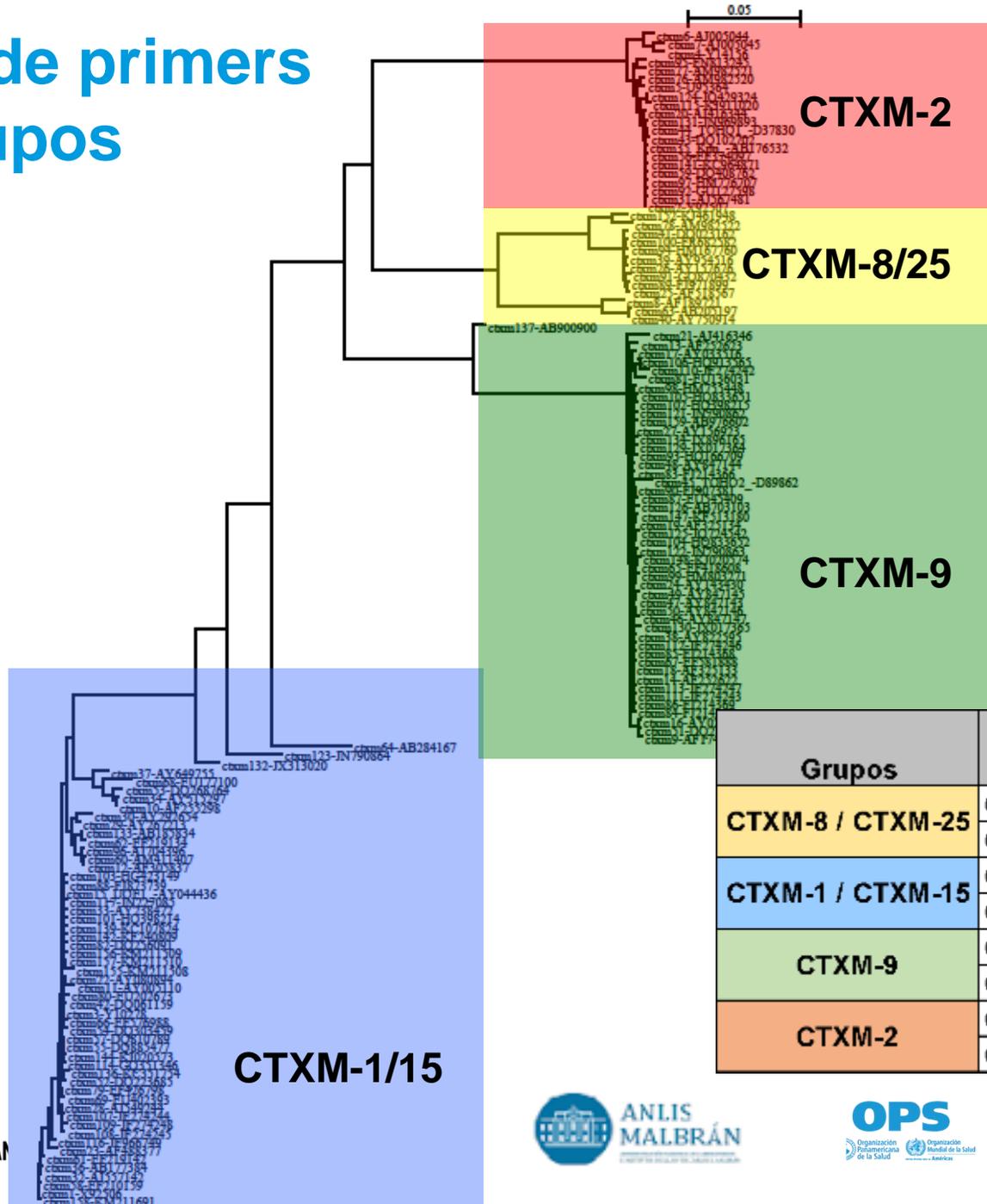
| Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul |              |
|---------------------------------------|--------------|
| Reactivo                              | Volumen      |
| ADN                                   | 2,5 ul       |
| Buffer 10X                            | 2,5 ul       |
| MgCl2 (50 mM)                         | 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      |
| <b>Vol. Final</b>                     | <b>25 ul</b> |

>> concentración de primers

TRABAJAN JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



# Diseño de primers para grupos



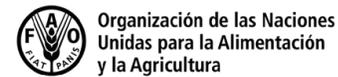
*bla*<sub>CTX-M</sub> = 159 alelos

El caso de CTX-M →  
**PRIMERS POR GRUPO**

| Grupos           | primer      | secuencia 5'-3'         | amplicon |
|------------------|-------------|-------------------------|----------|
| CTXM-8 / CTXM-25 | CTXM8/25G-F | CTGGAGAAAAGCAGCGGGGG    | 604 pb   |
|                  | CTXM8/25G-R | CGCTGCCGGTTTTATCCCGAC   |          |
| CTXM-1 / CTXM-15 | CTXM1/15G-F | CAGTTCACGCTGATGGCGACG   | 756 pb   |
|                  | CTXM1/15G-R | CGGCGCACGATCTTTTGGCCA   |          |
| CTXM-9           | CTXM9G-F    | ATGGTGACAAAGAGAGTGCAACG | 808 pb   |
|                  | CTXM9G-R    | GCGGCTGGGTAAAATAGGTCACC |          |
| CTXM-2           | CTXM2G-F    | GCCGCTCAATGTTAACGGTGA   | 851 pb   |
|                  | CTXM2G-R    | ACCGTGGGTTACGATTTTCGC   |          |

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIAN

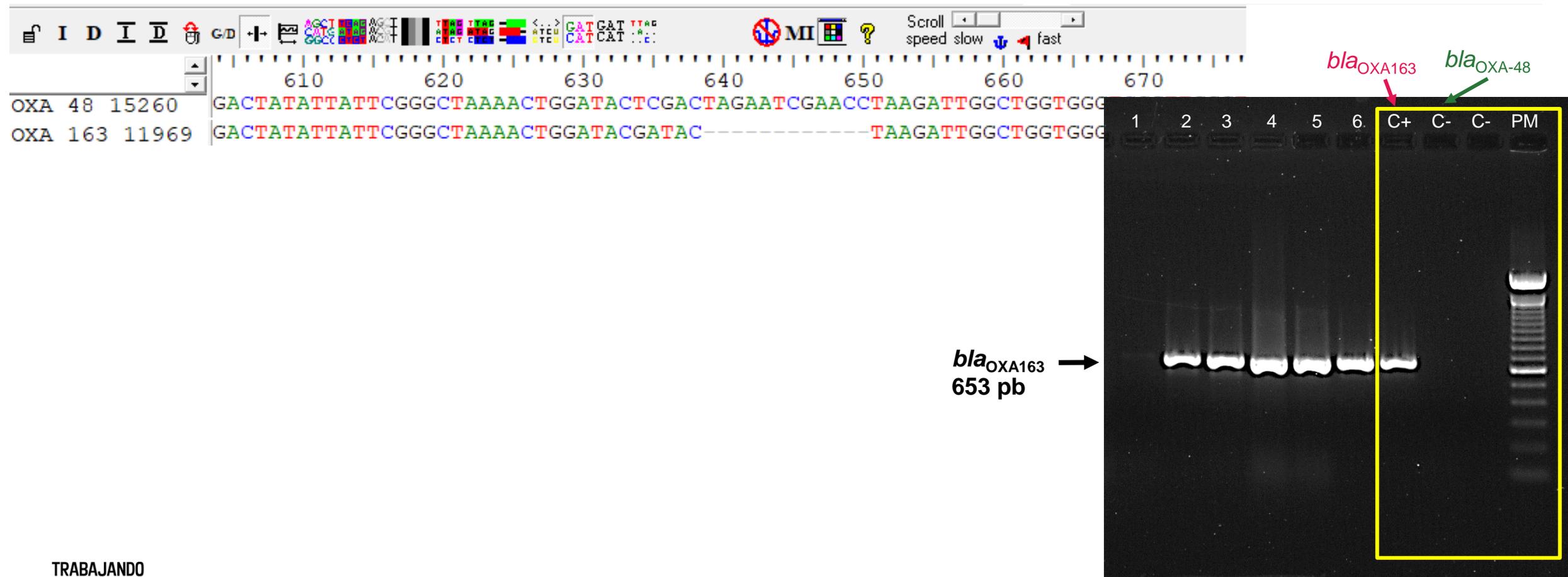
CTXM-1/15





# Diseño de primers para discriminación de alelos

## Discriminación entre OXA-48 y OXA-163



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

# Detección de clones por PCR multiplex

## Rapid Identification of Major *Escherichia coli* Sequence Types Causing Urinary Tract and Bloodstream Infections

M. Doumith,<sup>a</sup> M. Day,<sup>a</sup> H. Ciesielczuk,<sup>a,b</sup> R. Hope,<sup>a</sup> A. Underwood,<sup>a</sup> R. Reynolds,<sup>c</sup> J. Wain,<sup>d</sup> D. M. Livermore,<sup>a,d</sup> N. Woodford<sup>a,b</sup>

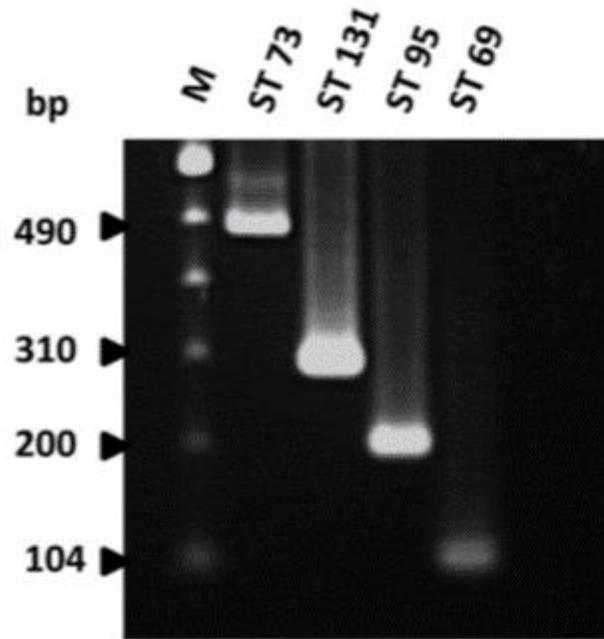


FIG 1 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by the new multiplex PCR for the four major *E. coli* STs. Lane M, 100-bp ladder (Invitrogen, Paisley, United Kingdom).

### Rápida identificación de clones de relevancia clínica:

- ST73/ST95/ST69** sensibles a la mayoría de ATB  
→ Tratamiento óptimo
- ST131** resistente a múltiples drogas  
→ carbapenem para complicadas;  
→ fosfomicina o nitrofurantoina para ITU
- Ninguno de estos ST  
→ Tratamiento empírico según guías.

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

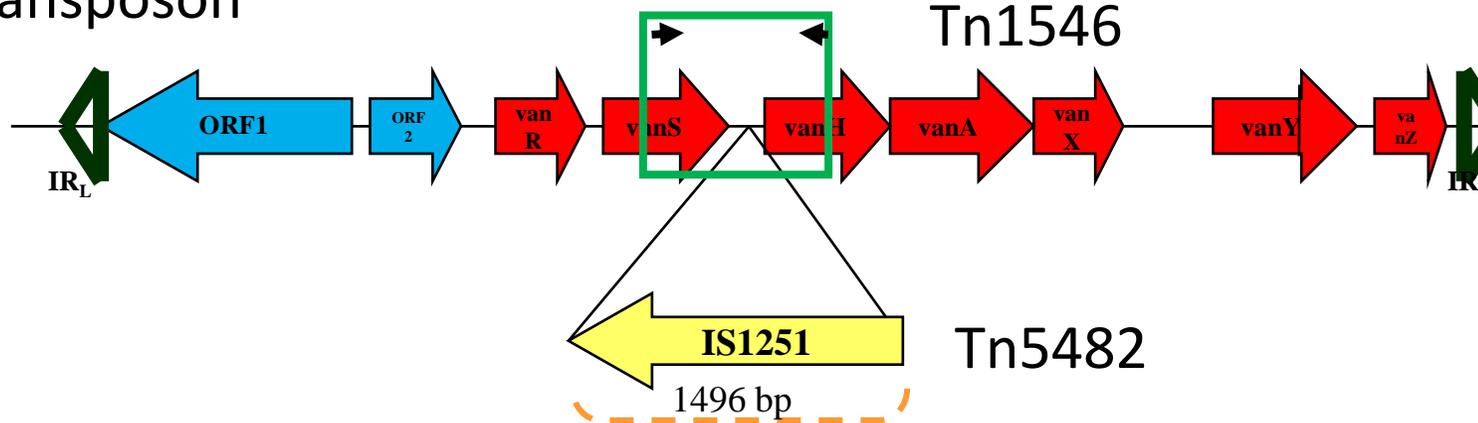


Unión Europea

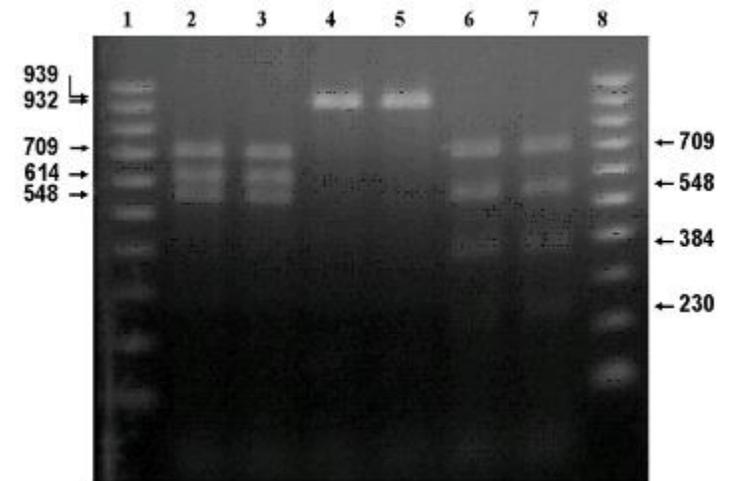
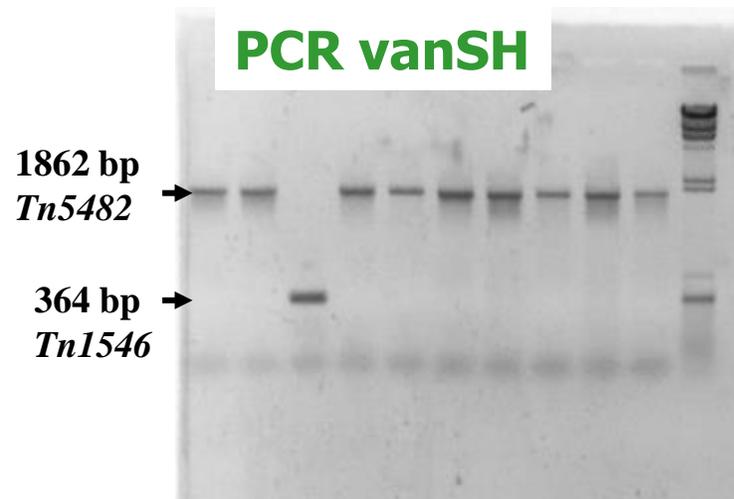
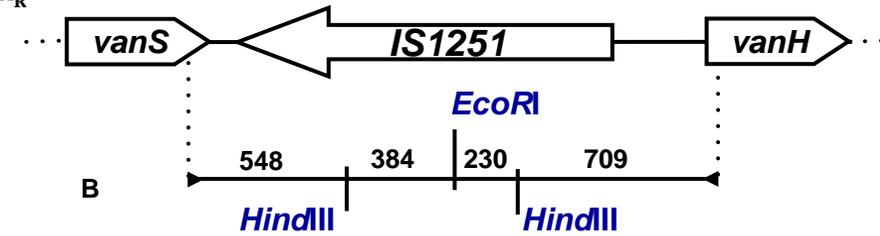
# Otras aplicaciones PCR de punto final

## Mapeo de plataformas

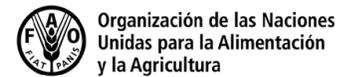
Transposon



A PCR-RFLP vanSH



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



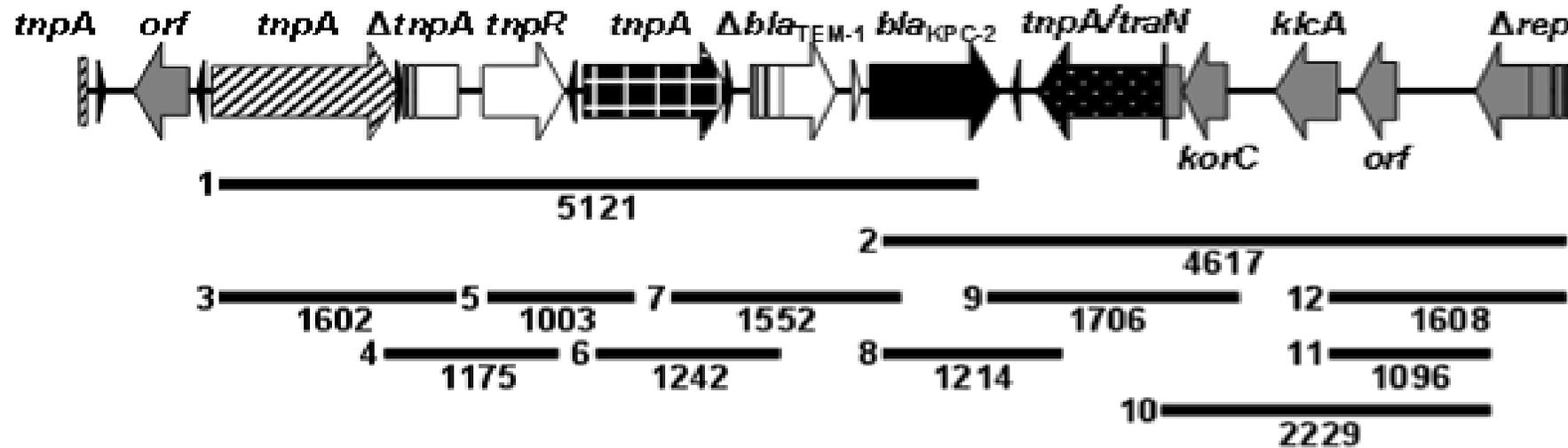
Corso A. et al. IJID. 11:69-75. 2007.



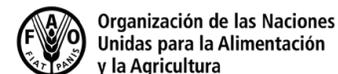
# Otras aplicaciones PCR de punto final

## Mapeo de plataformas

### Mapeo por PCR de variantes de *Tn4401*



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

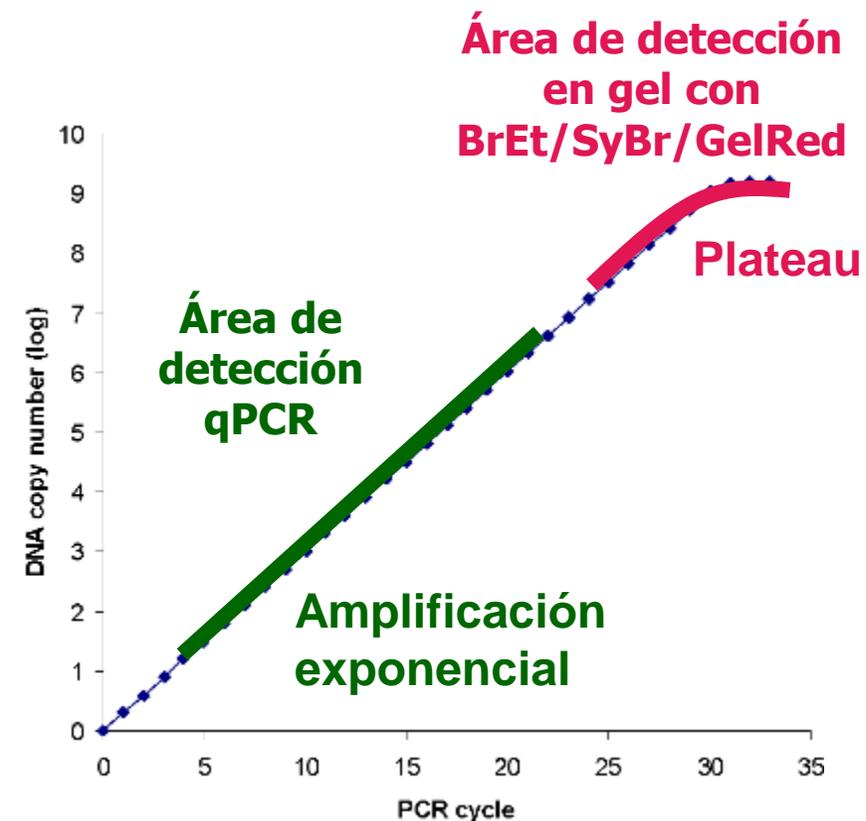


Gomez, *Clin Microbiol Infect*, 2011

# PCR punto final

vs.

# PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en Tiempo Real



- Detección de genes en tiempo real
- Cuantificación de ácidos nucleicos
- > velocidad de resultados
- < contaminación
- > especificidad

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

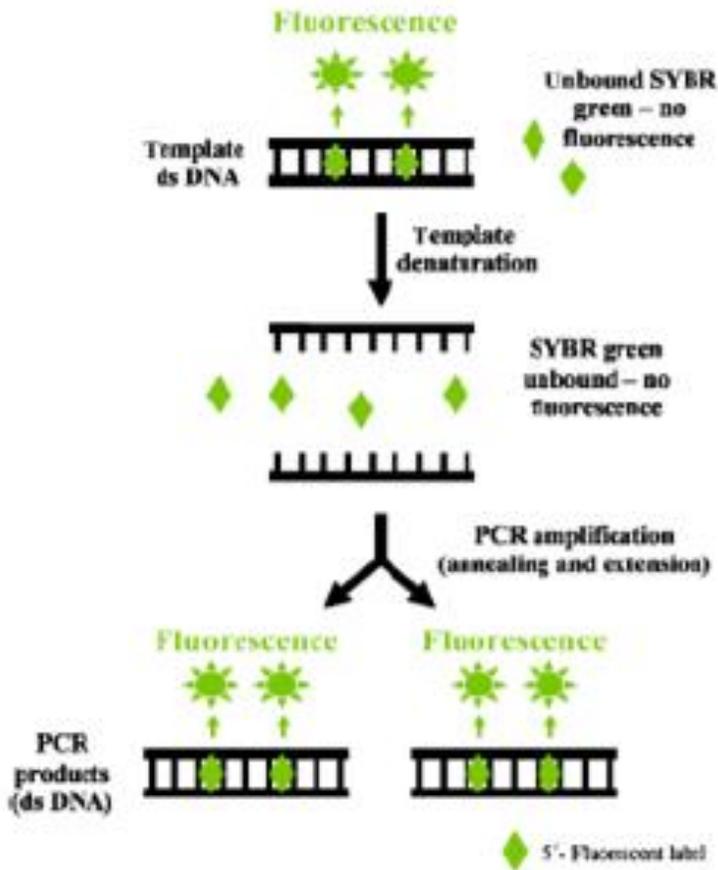
# PCR cuantitativa (qPCR)

## SYBR-Green

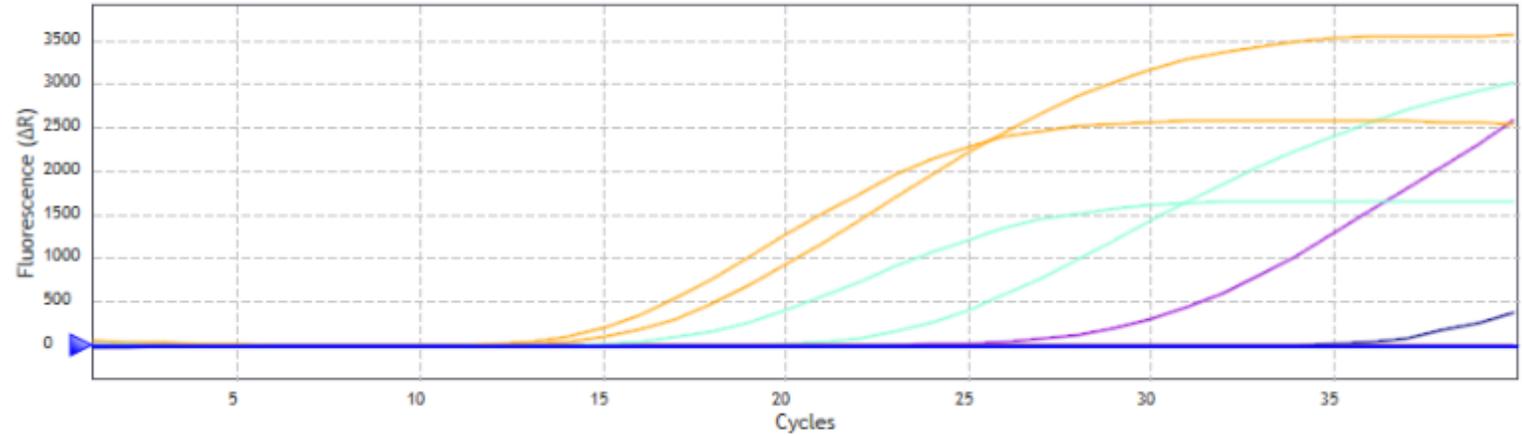
- Económico
- Fácil de usar
- Sensibilidad

- Unión a doble cadena

(a) SYBR green assays



Amplification Plots

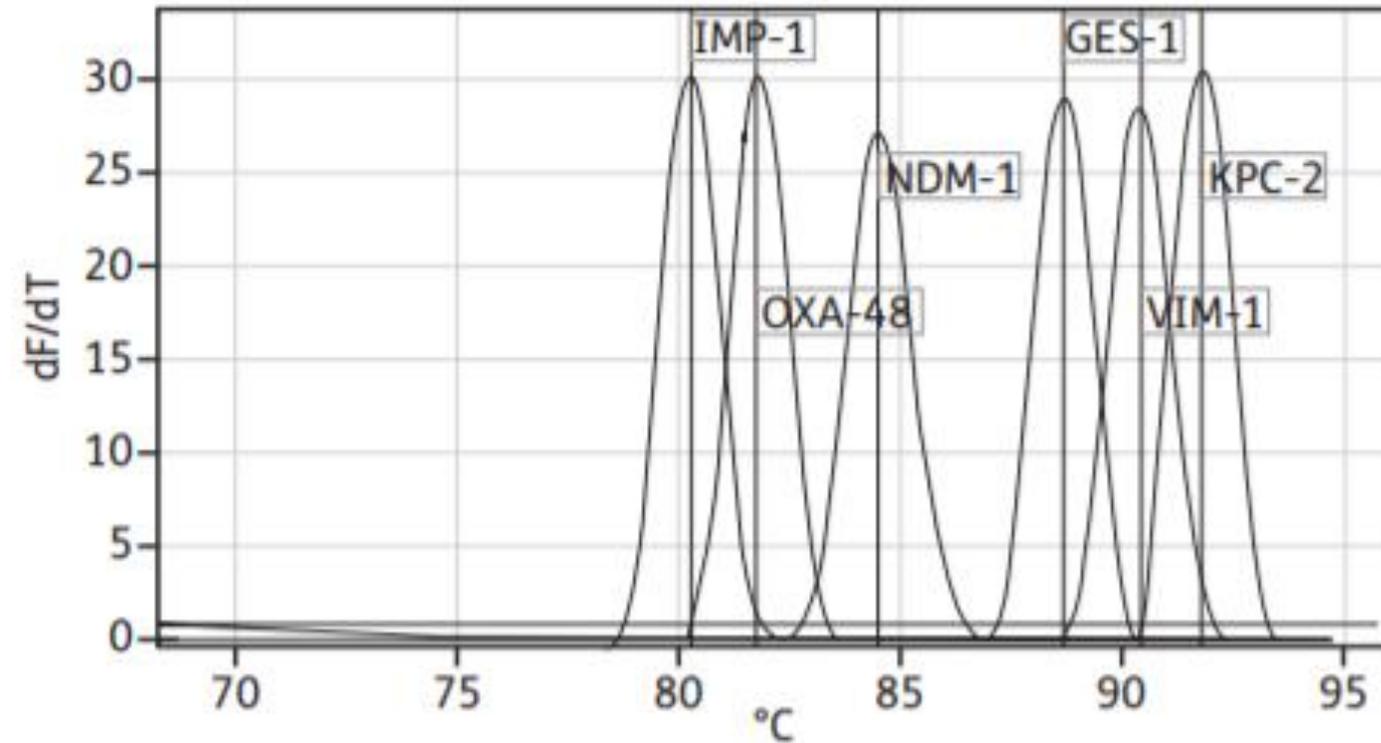


TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

## SYBR-Green

### Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR

Jussimara Monteiro<sup>1,2</sup>, Raymond H. Widen<sup>1</sup>, Antonio C. C. Pignatari<sup>2</sup>, Carly Kubasek<sup>1</sup> and Suzane Silbert<sup>1\*</sup>



**Figure 1.** Results from the real-time multiplex PCR melting curves of the amplicons generated by primers targeting the six carbapenemases types. The gene targets, from left to right, are as follows: *bla*<sub>IMP</sub> type ( $T_m$  80.1°C), *bla*<sub>OXA-48</sub> ( $T_m$  81.6°C), *bla*<sub>NDM-1</sub> ( $T_m$  84°C), *bla*<sub>GES</sub> type ( $T_m$  88.4°C), *bla*<sub>VIM</sub> type ( $T_m$  90.3°C) and *bla*<sub>KPC</sub> type ( $T_m$  91.6°C).

# PCR cuantitativa (qPCR) con sonda

Específico  
Sensibilidad  
Multiplex

Costo

## Sistema Taqman

ADN molde

ACCTGTA CT CCGGCTAAG  
TGGACATGAGCCGATTC

Polimerasa



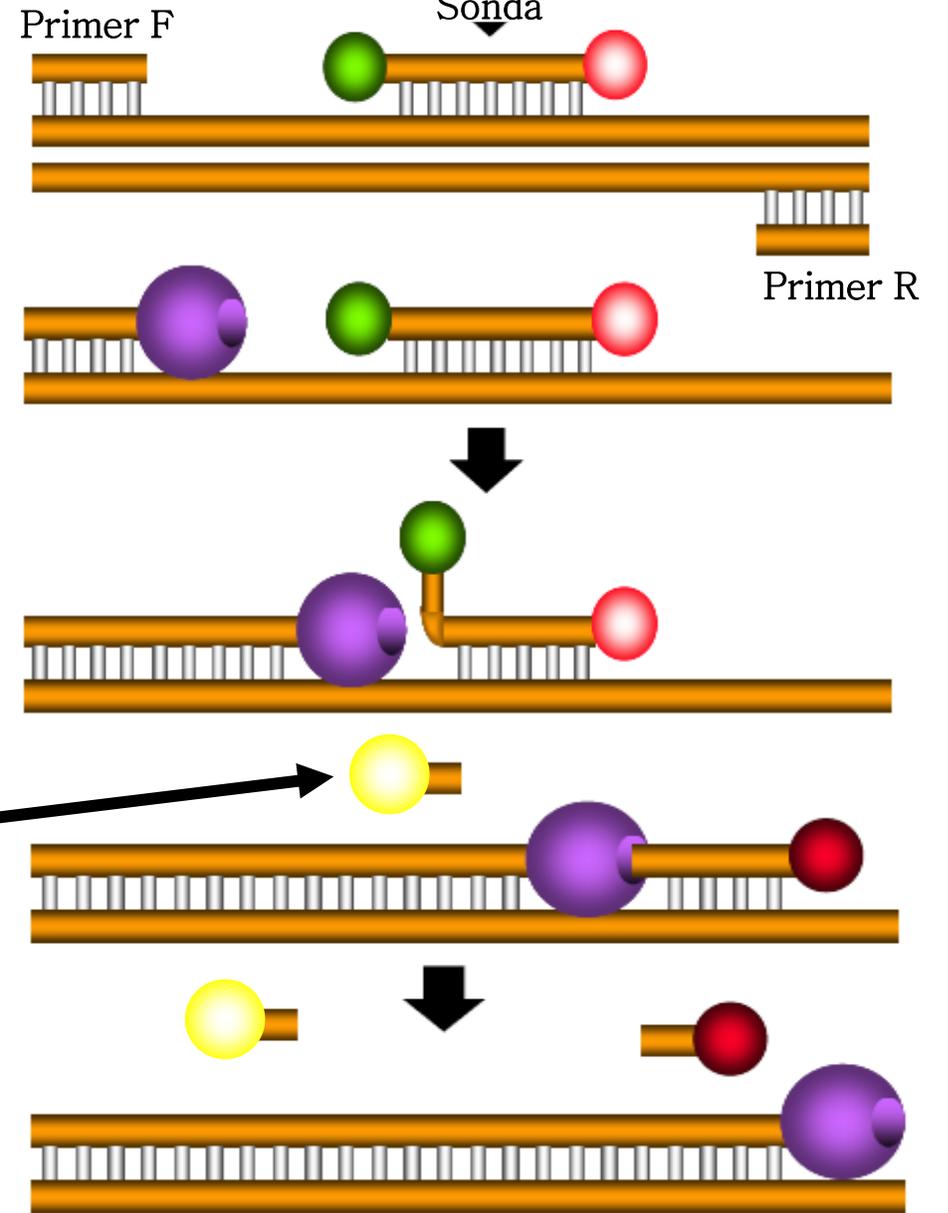
Primers



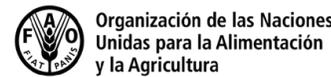
dNTPs

C A T G  
T T T T

TaqMan Probe

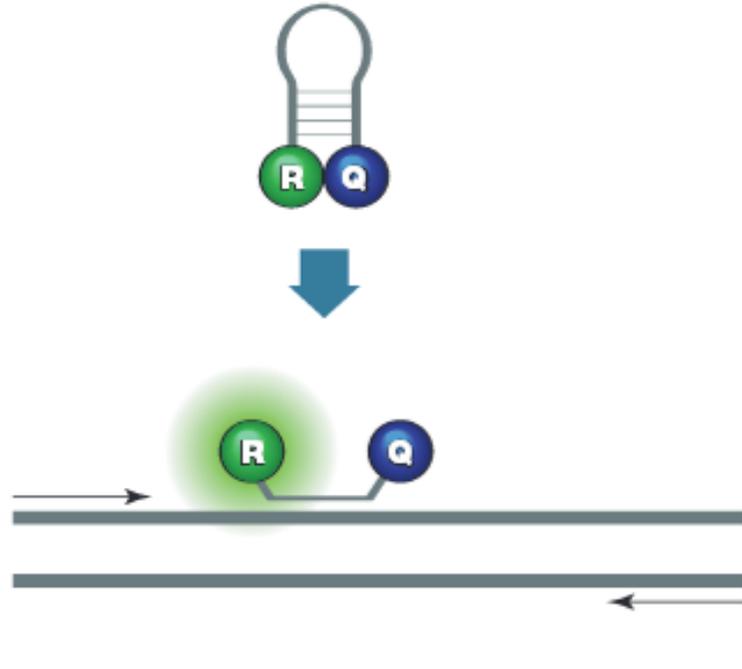


TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# PCR cuantitativa (qPCR) con sonda

## Molecular Beacons



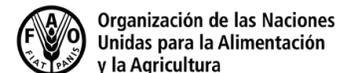
Molecular beacons are hairpin probes with reporter and quencher

During annealing, the probe binds to the target sequence to separate reporter and quencher. The reporter fluoresces

**R** Reporter

**Q** Quencher

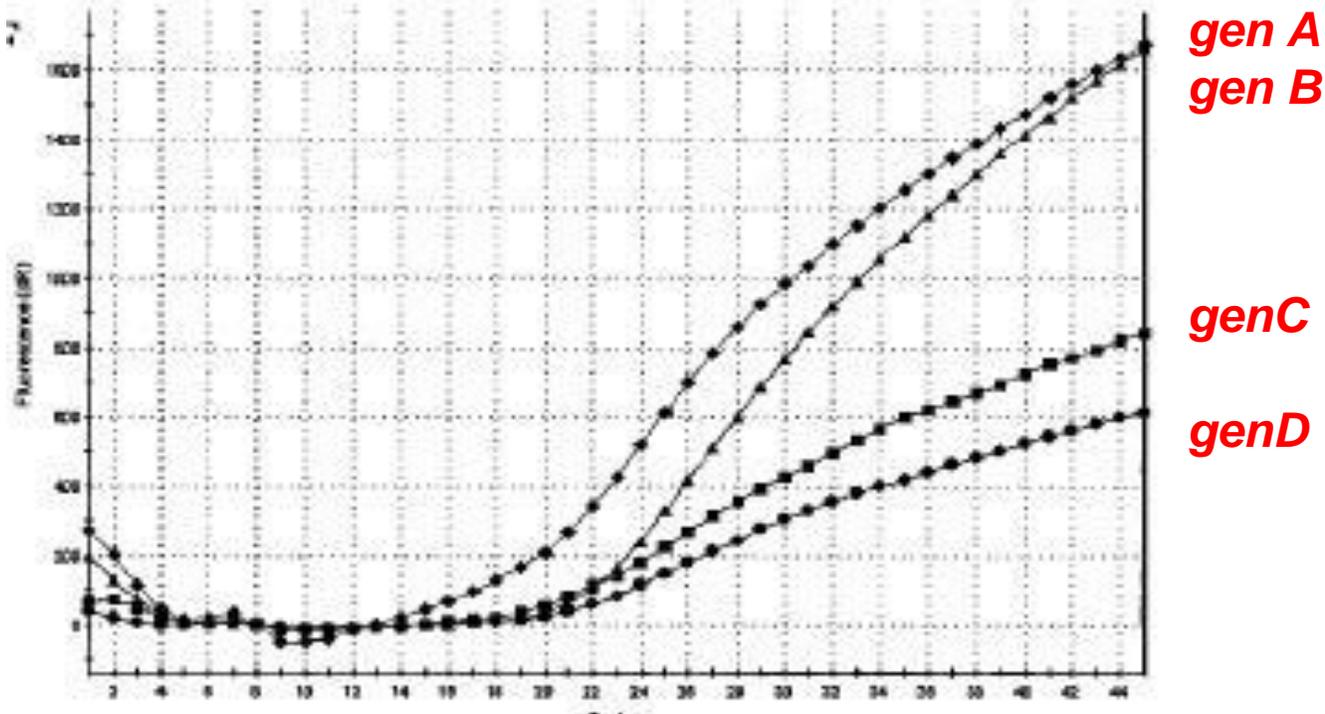
TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



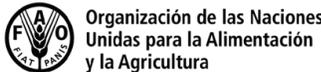
# PCR cuantitativa (qPCR)

Sonda (ej. Taqman)  
Específico  
Sensibilidad  
Multiplex

Costo

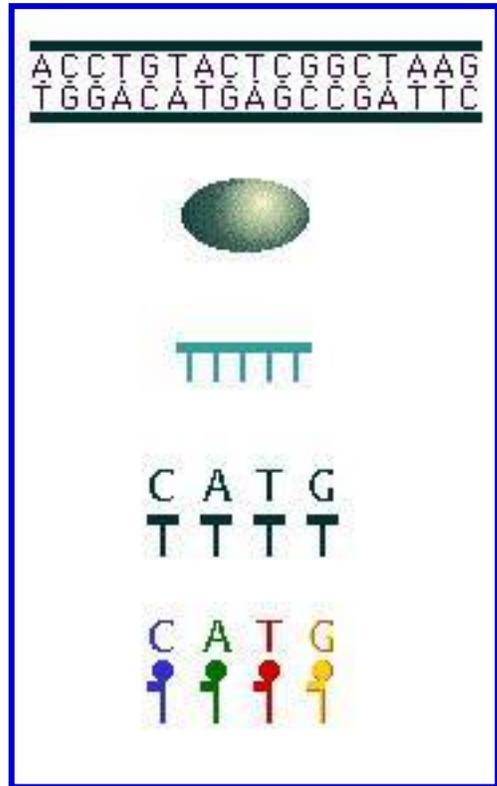
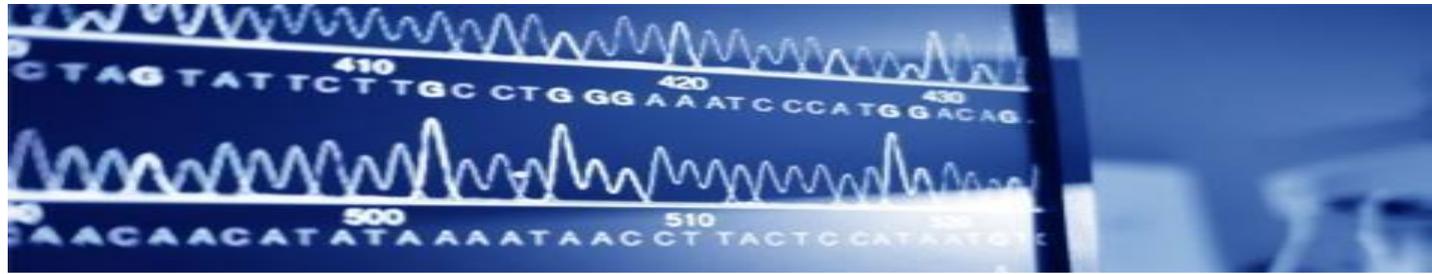


TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# Secuenciación de ácidos nucleicos

## Método de Sanger



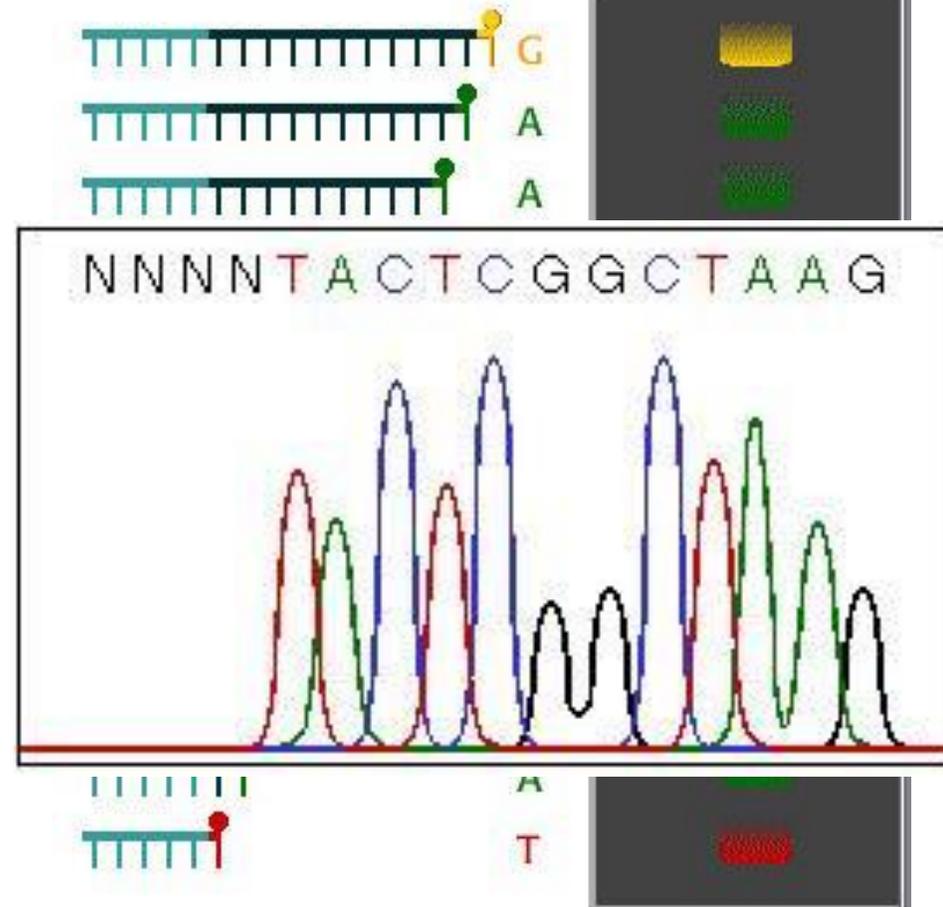
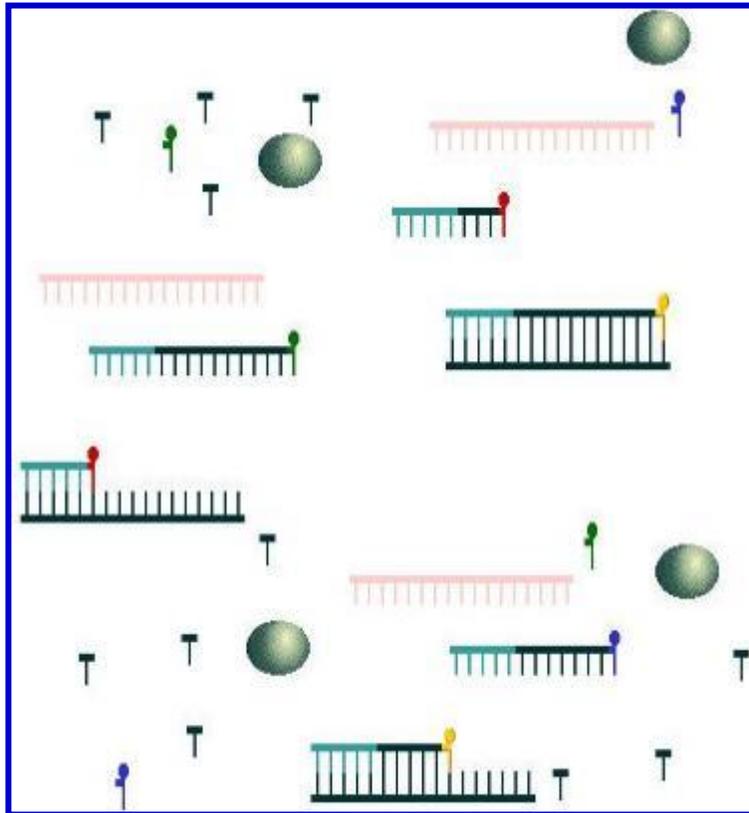
ADN molde

Polimerasa

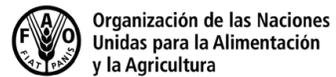
primer

dNTP's

dideoxi-dNTP's



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# Secuenciación de ácidos nucleicos Sanger

|        |   |                    |
|--------|---|--------------------|
| GYRSAL | CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATC  | 110                |
| 5400   | CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATC  | 65                 |
| 90400  | CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATC  | 65                 |
| 90500  | CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATC  | 65                 |
| 15400  | CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATC  | 65                 |
| 42300  | -----ACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATC  | 44                 |
|        | *****   |                    |
|        | <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>Ser #3</span> <span>Codón 87</span> </div>          |                    |
| GYRSAL | GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATGACAC   | FCGTATGG <b>WT</b> |
| 5400   | GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC   | FCGTATGG 120       |
| 90400  | GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC   | FCGTATGG 120       |
| 90500  | GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC   | FCGTATGG 120       |
| 15400  | GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATTACAC   | FCGTATGG 120       |
| 42300  | GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATTACAC   | FCGTATGG 99        |
|        | *****   |                    |
|        | <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>Asp</span> <span>Asn</span> <span>Tyr</span> </div> |                    |
| GYRSAL | CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC   | 220                |
| 5400   | CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC   | 175                |
| 90400  | CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC   | 175                |
| 90500  | CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC   | 175                |
| 15400  | CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC   | 175                |
| 42300  | CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC   | 154                |
|        | *****   |                    |

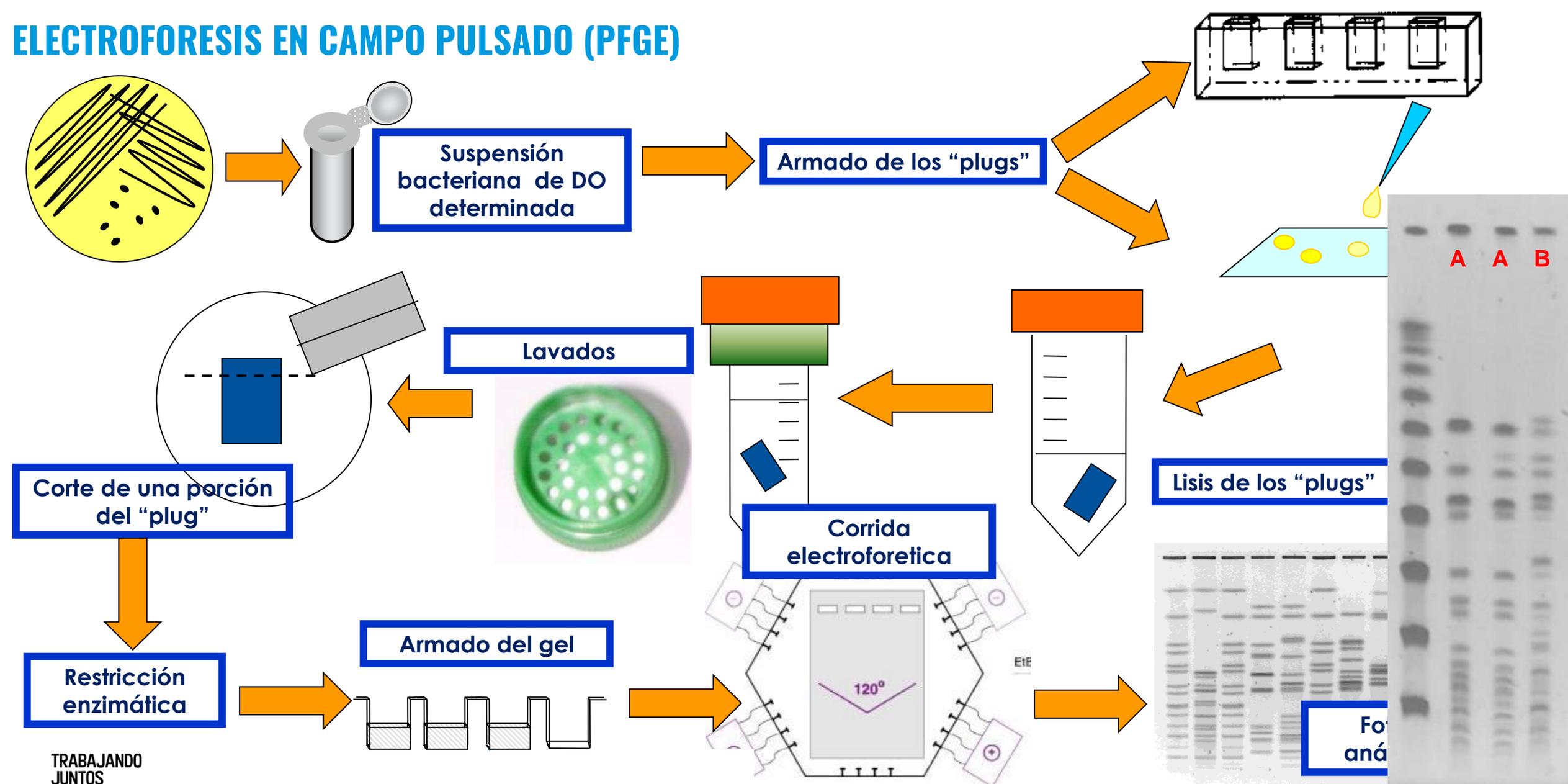
# Tipificación molecular bacteriana

## APLICACION CLINICA Y EPIDEMIOLOGICA

- Confirmación de brotes
- Determinación de reinfección o recidiva en un paciente
- Diseminación intra- e inter-hospitalaria de clones
- Vigilancia epidemiológica de clones geográfica y temporalmente
- Caracterización de Enfermedades Transmitidas por Alimentos
- Caracterización de Enfermedades Zoonóticas

**Estas técnicas buscan confirmar hipótesis epidemiológicas, no son técnicas de uso rutinario!**

# ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)



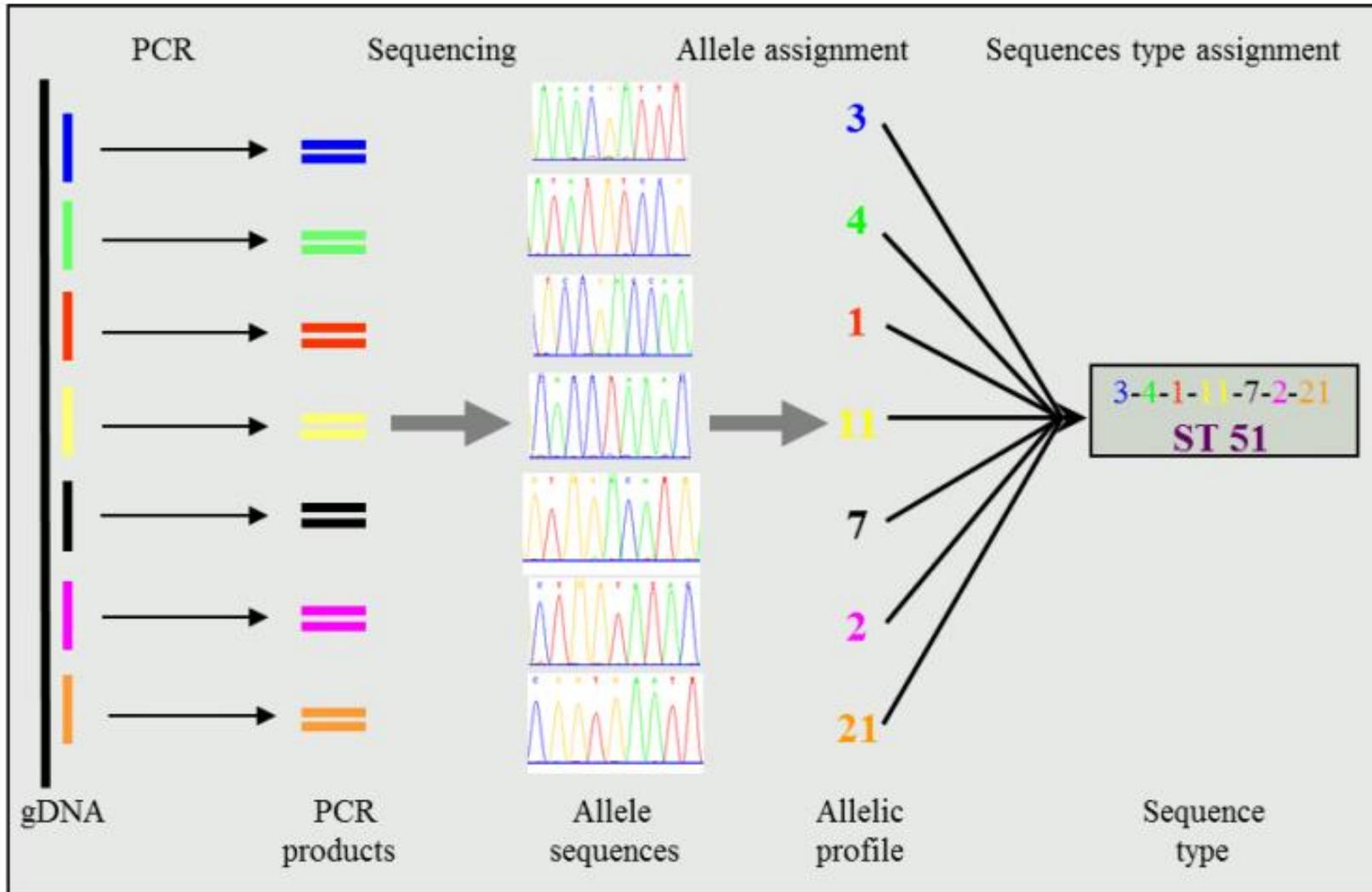
TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



# MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)



- Genes que codifican proteínas con funciones metabólicas centrales (*core*) / **housekeeping genes**
- **Conservados**
- **Transmitidos verticalmente**
- **Única copia**
- Los genes seleccionados deberían estar **distanciados físicamente** para minimizar posibles *linkage* genético de locis.

# MULTILOCUS SEQUENCE TYPING

## (MLST)

|        | aspA | glnA | gltA | glyA | pgm | tkf | uncA |
|--------|------|------|------|------|-----|-----|------|
| ST-45  | 4    | 7    | 10   | 4    | 1   | 7   | 1    |
| ST-2   | 4    | 7    | 51   | 4    | 1   | 7   | 1    |
| ST-25  | 4    | 7    | 10   | 1    | 1   | 7   | 1    |
| ST-94  | 4    | 7    | 10   | 1    | 1   | 1   | 1    |
| ST-68  | 4    | 7    | 10   | 4    | 32  | 7   | 6    |
| ST-88  | 4    | 7    | 10   | 4    | 36  | 28  | 1    |
| ST-243 | 4    | 7    | 10   | 3    | 42  | 7   | 1    |
| ST-109 | 2    | 7    | 10   | 4    | 1   | 7   | 5    |
| ST-116 | 26   | 7    | 10   | 5    | 1   | 7   | 21   |
| ST-203 | 17   | 7    | 10   | 30   | 1   | 7   | 4    |

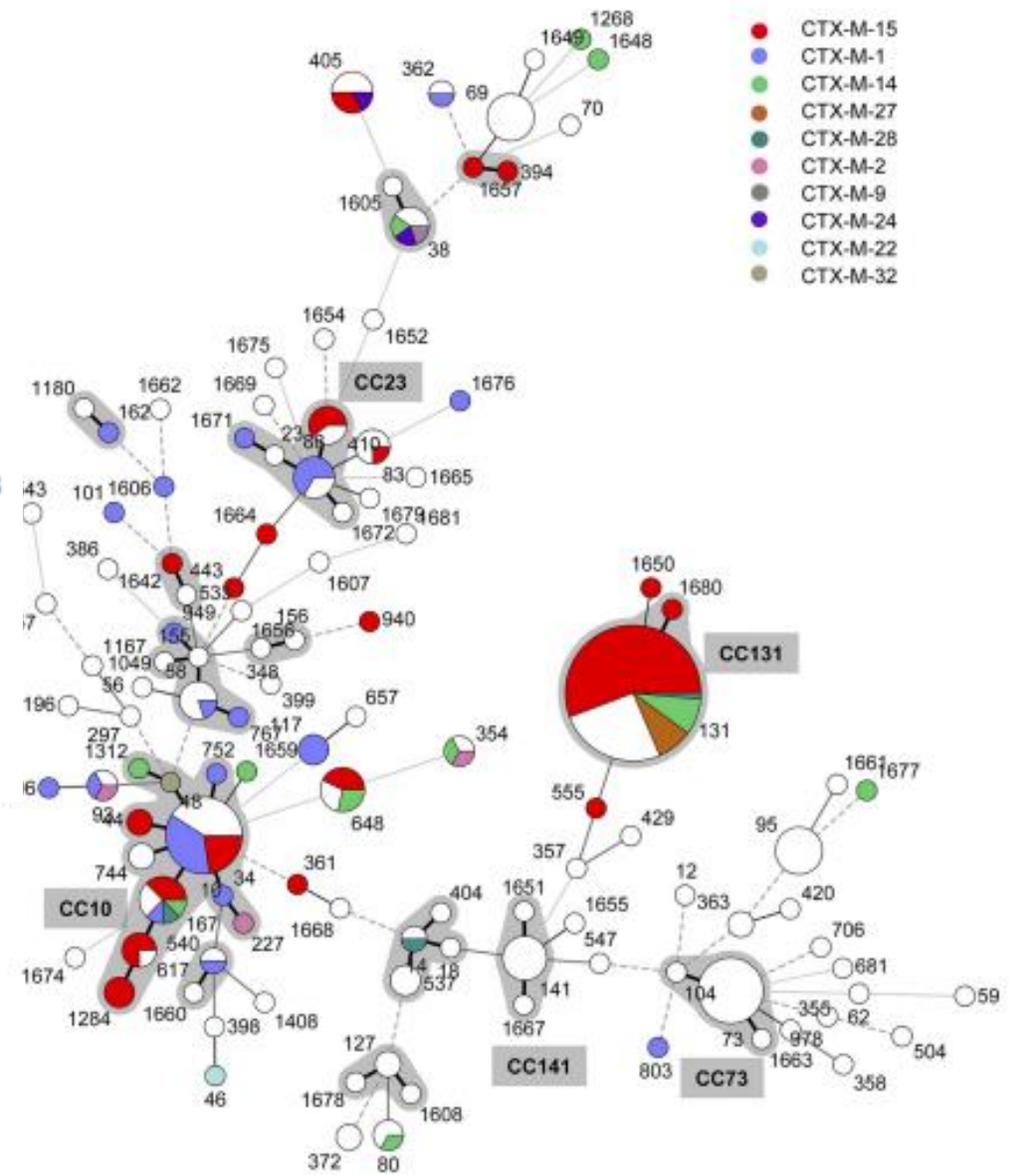
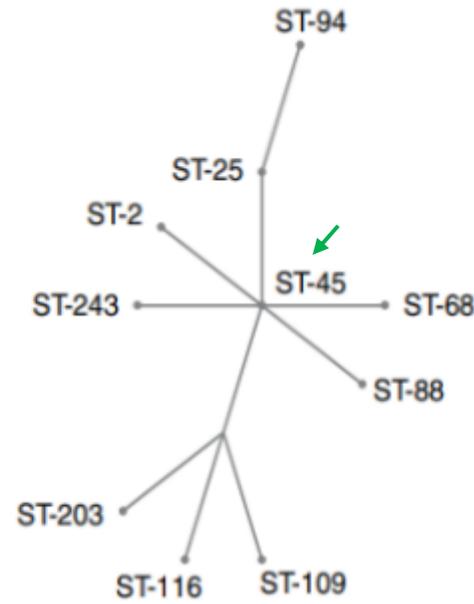


Figure 2

Clonal complex structures as revealed by MLST data. Clonal complexes are currently defined informally, by defining a central genotype and related genotypes, i.e., those that share up to four identical MLST loci. Identifying the central genotype depends on their frequency in samples of the population in question, their longevity, and a central position when analyzed by a variety of heuristic techniques. Once a central genotype is assigned, the MLSTdBN software can identify all members of a clonal complex automatically. The figure shows the allelic profiles of members of the *C. jejuni* ST-45 complex visualized by split decomposition.

Maiden. Annu. Rev. Microbiol. 2006. 60:561–88

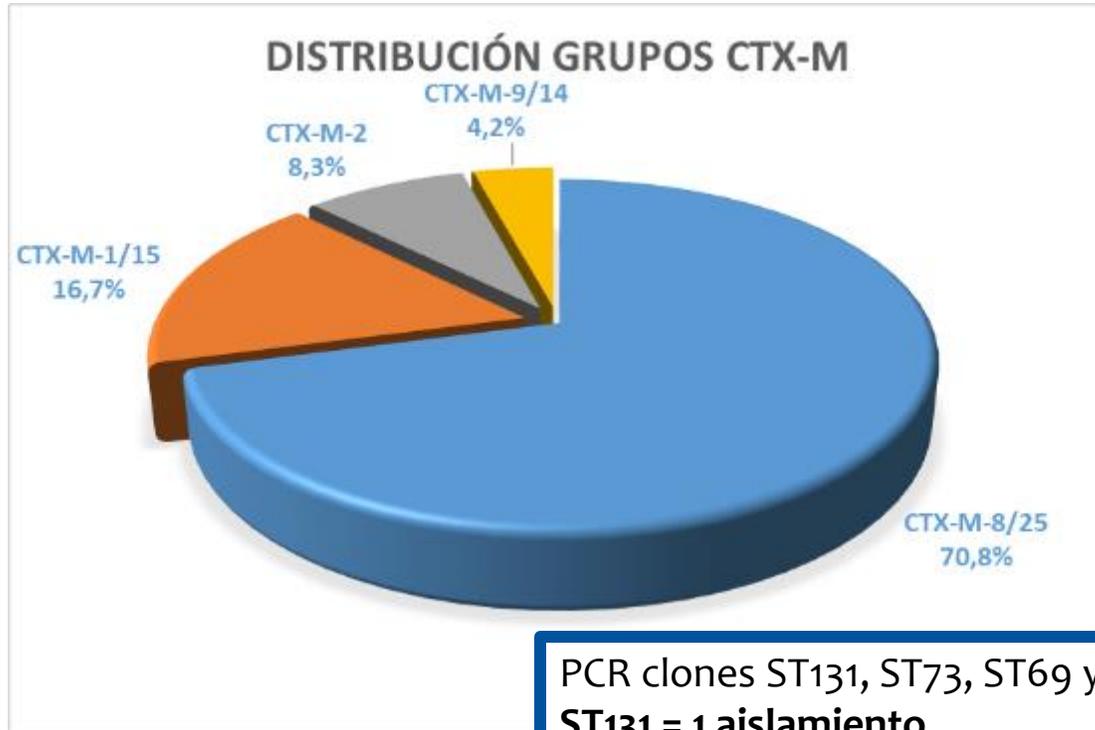
Brisse. JCM.50:2974-81.2012

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

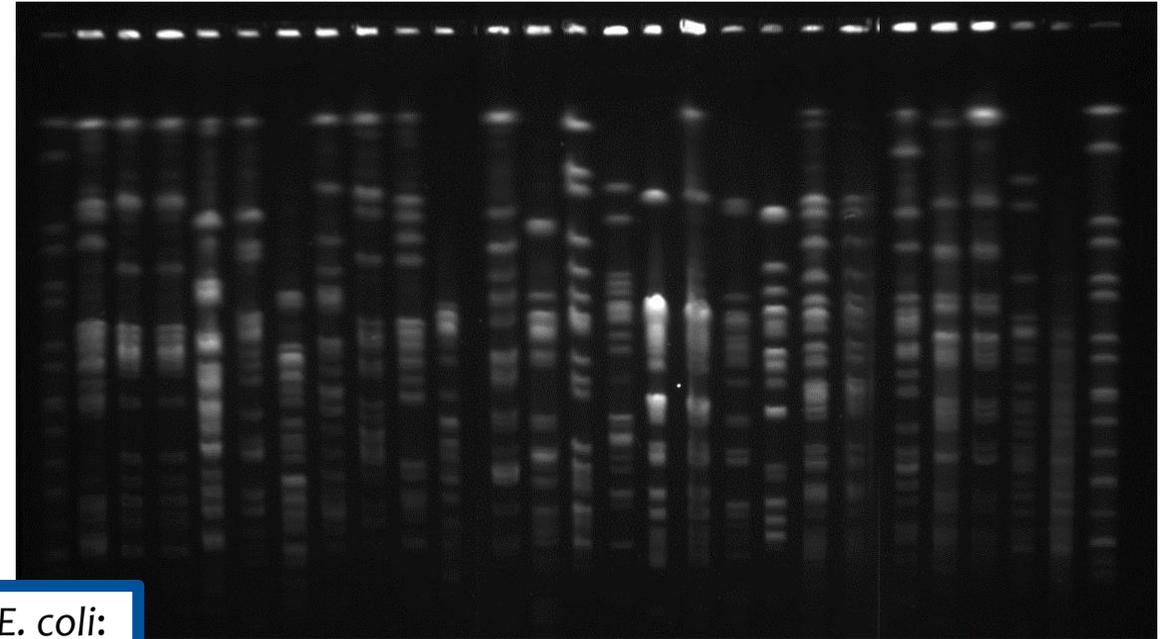




# Caracterización de *E. coli* de muestras fecales de cerdos de Argentina



PCR clones ST131, ST73, ST69 y ST95 de *E. coli*:  
ST131 = 1 aislamiento  
ST95 = 2 aislamientos



Alta diversidad genética → 29 perfiles de PFGE

**CONCLUSIONES:** Los aislamientos de *E. coli* recuperados de lechones con diarrea y cerdos sanos portaban BLEE y/o genes *mcr-1*. La resistencia a cefalosporinas de 3ra generación estuvo asociada con la presencia de la BLEE tipo CTX-M, y en particular la variante CTX-M-8/25.

Se detectaron en cerdos clones de *E. coli* generalmente asociados a infecciones en humanos.

# Caracterización de *E. coli* productora de BLEE de pacientes sanos y cerdos

409 hisopados personas (223) y cerdos (186) sanos.  
 Selección en agar Mac Conkey con 4 mg/mL de ceftriaxona.  
 212 *E. coli* productores de BLEE: humanos (111) y cerdos (101).

Multilocus sequence typing and *bla*<sub>ESBL</sub> characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand

**Table 3** Distribution of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, and *bla*<sub>SHV</sub> in ESBL-*E. coli* isolated from healthy people (n=111) and swine (n=101)

| <i>bla</i> genes  | Number of isolates     |                       |               |
|---|------------------------|-----------------------|---------------|
|   | Healthy humans (n=111) | Healthy swine (n=101) | Total (n=212) |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>   | 46                     | 32                    | 78            |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>                             | 1                      | 0                     | 1             |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM</sub>                             | 57                     | 63                    | 120           |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub> | 3                      | 1                     | 4             |
| <i>bla</i> <sub>TEM</sub>   | 4                      | 5                     | 9             |

203  
95,8%

# Caracterización de *E. coli* productora de BLEE de pacientes sanos y cerdos

Chakkrachong Seenama<sup>1,2</sup>  
 Visanu Thamlikitkul<sup>2</sup>  
 Panan Rattawongjirakul<sup>3</sup>

Infection and Drug Resistance

Dovepress  
 open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

Multilocus sequence typing and *bla*<sub>ESBL</sub> characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand

**Table 6** Distribution of the clonal complexes and their sequence type members detected in ESBL-*E.coli* isolates from humans and swine

| Clonal complex       | Number of isolates |                       |                |                      |               |    |
|----------------------|--------------------|-----------------------|----------------|----------------------|---------------|----|
|                      | Sequence types     | Healthy humans (n=59) | Sequence types | Healthy swine (n=73) | Total (n=132) |    |
| <b>CC10 (ST10)</b>   | CC 10              | ST 10, 34, 48, 617    | 18             | ST 10, 34, 48, 218   | 30            | 48 |
|                      | CC 14              | ST 1193               | 2              | ST 1193              | 1             | 3  |
|                      | CC 23              | ST 23, 410            | 5              | ST 23, 410           | 9             | 14 |
|                      | CC 38              | -                     | -              | ST 38                | 4             | 4  |
|                      | CC 46              | -                     | -              | ST 46                | 2             | 2  |
|                      | CC 86              | ST 86                 | 1              | ST 86                | 1             | 2  |
|                      | CC 95              | ST 142                | 1              | -                    | -             | 1  |
|                      | CC 101             | ST 101                | 8              | ST 101               | 1             | 9  |
| <b>CC131 (ST131)</b> | CC 131             | ST 131                | 17             | ST 131               | 7             | 24 |
|                      | CC 155             | ST 55, 56, 58         | 5              | ST 58, 155           | 9             | 14 |
|                      | CC 156             | -                     | -              | ST 156               | 3             | 3  |
|                      | CC 165             | -                     | -              | ST 165               | 2             | 2  |
|                      | CC 168             | ST 93                 | 1              | ST 168               | 2             | 3  |
|                      | CC 206             | -                     | -              | ST 206               | 1             | 1  |
|                      | CC 405             | -                     | -              | ST 405               | 1             | 1  |
|                      | CC 648             | ST648                 | 1              | -                    | -             | 1  |

TRABAJANDO  
 JUNTOS  
 PARA COMBATIR  
 LA RESISTENCIA  
 A LOS ANTIMICROBIANOS



# Caracterización de *E. coli* productora de BLEE de pacientes sanos y cerdos

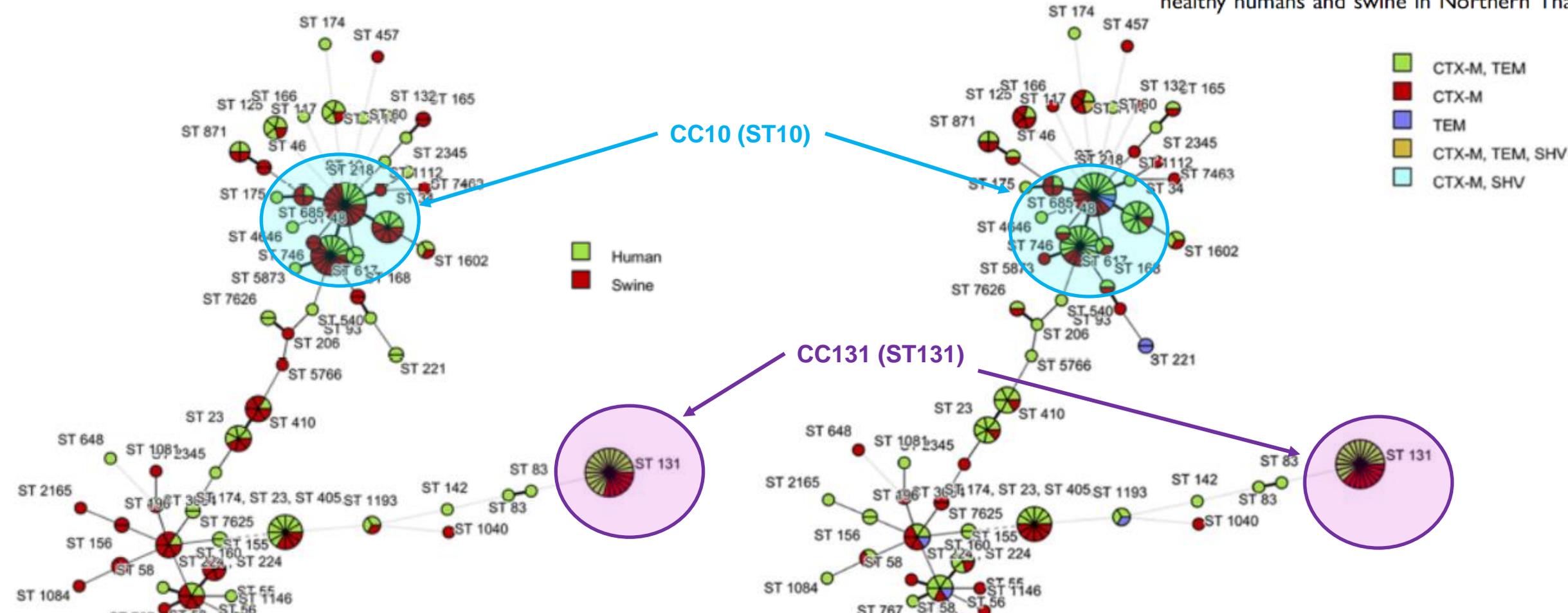
Chakkrachong Seenama<sup>1,2</sup>  
Visanu Thamlikitkul<sup>2</sup>  
Panan Ratthawongjirakul<sup>3</sup>

Infection and Drug Resistance

Dovepress  
open access to scientific and medical research

ORIGINAL RESEARCH

Multilocus sequence typing and *bla*<sub>ESBL</sub> characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand



**CONCLUSIONES:** Los aislamientos de *E. coli* que portaban BLEE y provenían de personas sanas y cerdos compartían idénticos STs, lo que sugiere un posible nexo epidemiológico o transmisión entre estos huéspedes. Esto también indica que tanto las personas sanas como los cerdos de granja son reservorios de genes de resistencia.

# EJEMPLO DE SITUACIONES POSIBLES....

## Observación

## Pregunta

## Acción

### SITUACIÓN: VIGILANCIA

Resistencia a cefalosporinas de tercera generación

Es una beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) o un AmpC?

- Diferenciar BLEE de AmpC del antibiograma inicial

### SITUACIÓN: INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA MOLECULAR

Actividad BLEE y/o AmpC positiva

Que gen esta presente?

- PCR para el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> y/o *bla*<sub>CMY</sub>

PCR positiva para *bla*<sub>CTX-M</sub> y/o *bla*<sub>CMY</sub>

Que variante alélica está presente?

- Opcional: PCR de grupo o PCR y secuenciación Sanger

- Actividad BLEE positiva  
- PCR negativa para *bla*<sub>CTX-M</sub> y/o *bla*<sub>CMY</sub>

Que BLEE es?

- Derivar al LNR  
PCR genes adicionales / clonado y secuenciación Sanger / WGS

# EJEMPLO DE SITUACIONES POSIBLES....

## Observación

## Pregunta

## Acción

### SITUACIÓN: VIGILANCIA Y DETECCIÓN DE LA PRIMERA CARBAPENEMASA

Resistencia a cefalosporinas de tercera generación

El aislamiento es resistente a carbapenemes?

- Evaluar sensibilidad a los carbapenemes

Resistencia a carbapenemes

Es una carbapenemasa?

- Ensayos fenotípicos confirmatorios de actividad carbapenemasa

Actividad carbapenemasa positiva

Que gen esta presente?

Derivar al LNR:

- PCR para carbapenemasas más comunes

De que variante se trata?

- Secuenciación Sanger

Es un clon relevante?

- Tipificación molecular: PFGE / MLST / WGS

***MUCHAS GRACIAS!!!***

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

