

Tipificación molecular como medida de detección y control de brotes intrahospitalarios

Carolina López Santana
Bacterióloga, MSc.
FIDIC-Méderi



FUNDACION INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA





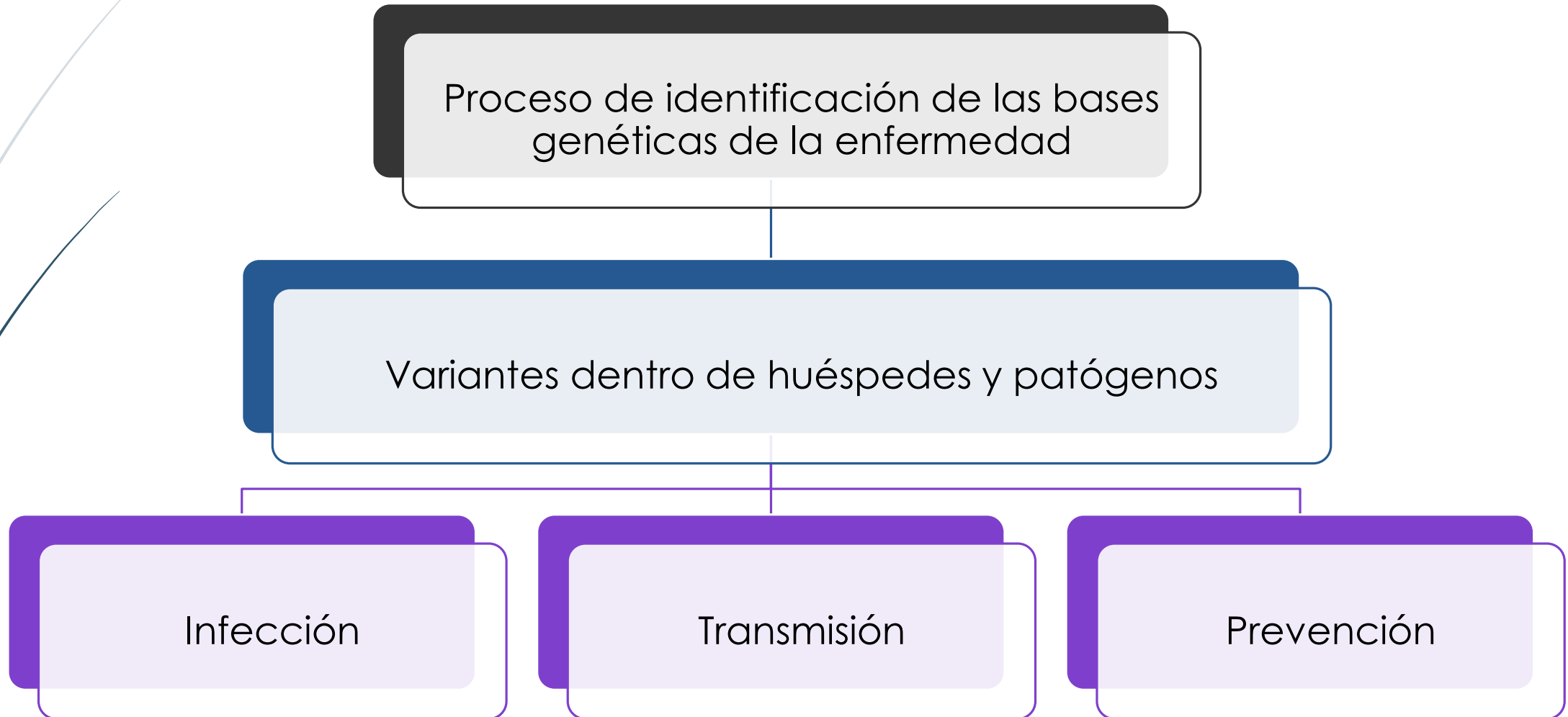
Contenido

- ▶ Introducción
- ▶ Técnicas Moleculares
- ▶ Conclusiones y Perspectivas



Introducción

Epidemiología Molecular



Técnicas de Tipificación

Fenotípicas

Análisis de las características expresadas por el microorganismo

Serotipificación
Perfil de Resistencia a los antimicrobianos

Genotípicas

Análisis de ADN cromosomal y extracromosomal

PCR
VNTR
PFGE

Técnicas Moleculares

Estratificar y refinar los datos proporcionando mediciones más sensibles y específicas

Actividades epidemiológicas

Vigilancia de enfermedades

Investigaciones de brotes

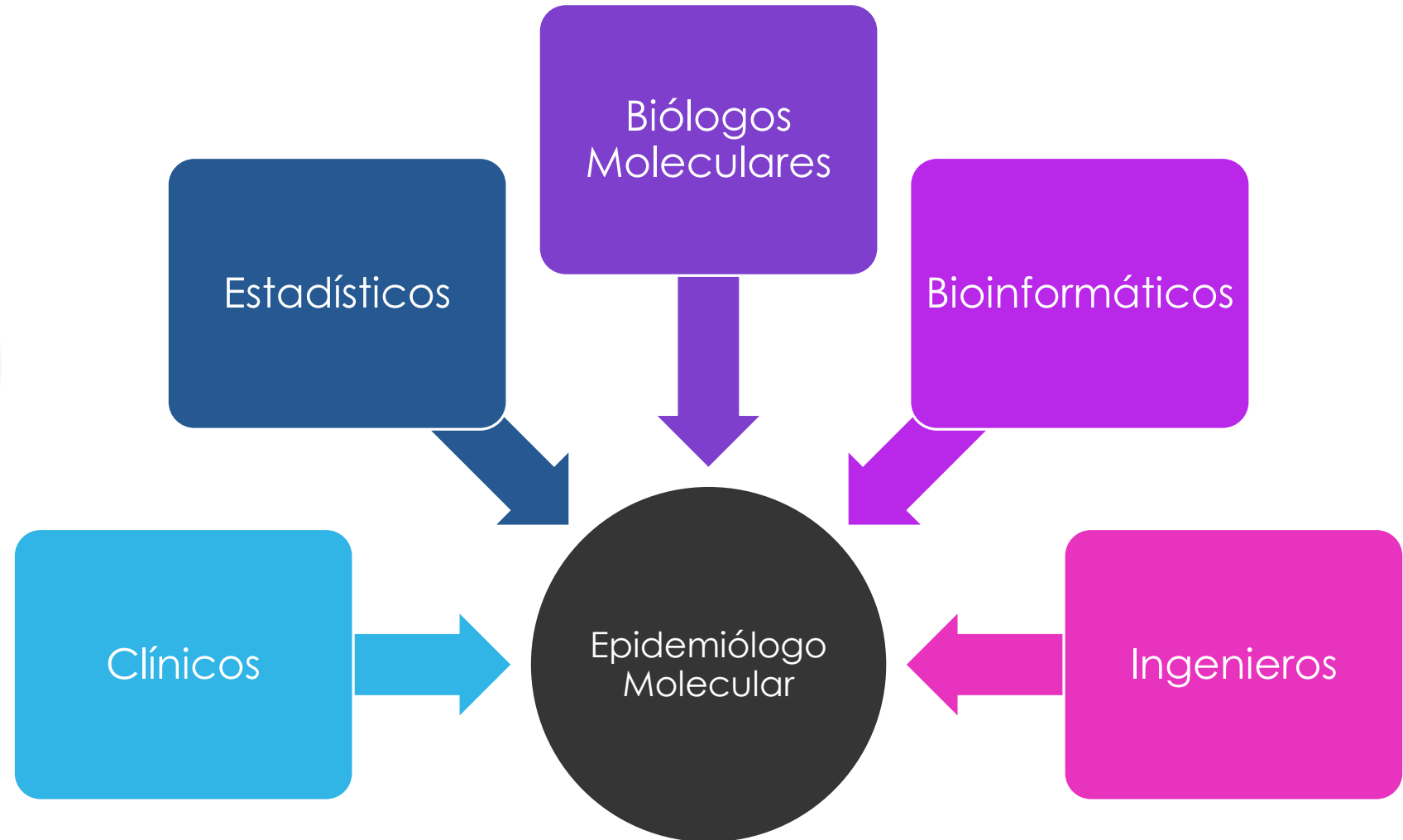
Identificación de patrones de transmisión y factores de riesgo

Caracterización de interacciones huésped-patógeno



Técnicas en Epidemiología Molecular

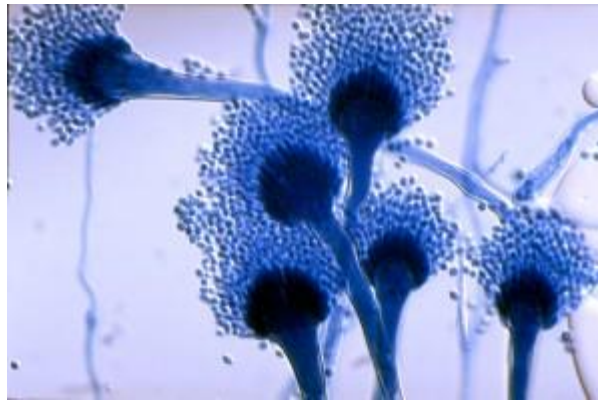
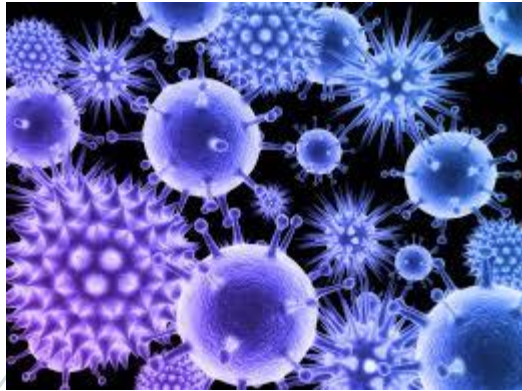
La aplicación práctica de las técnicas de laboratorio y epidemiológicas



Técnicas moleculares en enfermedades infecciosas

TABLE 2. Applications of molecular techniques in epidemiologic studies and available techniques as of this writing

Applications	Method	Technique
Identification	Conventional	Culture Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Enzyme immunoassay (EIA) Monoclonal antibodies
	Nucleic acid based	DNA hybridization for known genes Direct sequencing of one or more regions Multilocus sequence typing (MLST)
	PCR* based	Amplification of a single target specific to a pathogen Ligase chain reaction (LCR)
	Protein based	Western blot or immunoblotting
Fingerprinting	Conventional	Serotype Antibiotic susceptibilities
	Nucleic acid based	Plasmid profiles Restriction fragment length polymorphism (RFLP) Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) Segmented RNA gel electrophoresis Ribosomal RNA gel electrophoresis Direct sequencing of one or more regions Multilocus sequence typing (MLST)
	PCR based	Amplification of a single target specific to a pathogen Targeting known repetitive sequences (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences (ERIC), repetitive extragenic palindromic sequences (REP), double repetitive element (DRE), BOX, insertional sequence (IS), polymorphic guanine/cytosine-rich repetitive sequences (PGRS)) Random primers (randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), arbitrary primed PCR (AP-PCR)) Restriction endonuclease of a single amplified product Amplified fragment length polymorphism (AFLP)
	Protein based	Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)
	Gene expression	Reverse transcriptase PCR Microarray technologies



Brotos intrahospitalarios



Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos

27 DE FEBRERO DE 2017 | GINEBRA

Prioridad 1: CRÍTICA

- *Acinetobacter baumannii*
- • *Pseudomonas aeruginosa*
- • Enterobacteriaceae



Carbapenémicos
Productoras de ESBL

**Bacterias
multirresistentes**

Prioridad 2: ELEVADA

- • *Enterococcus faecium*
- • *Staphylococcus aureus*
- *Helicobacter pylori*
- *Campylobacter* spp.
- *Salmonellae*
- *Neisseria gonorrhoeae*



Vancomicina
Meticilina, vancomicina
Claritromicina
Fluoroquinolonas
Fluoroquinolonas
Cefalosporina, fluoroquinolonas

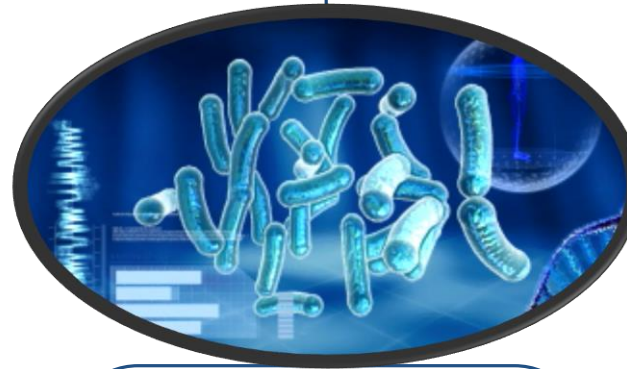
Prioridad 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Shigella* spp.



sin sensibilidad a la penicilina
Ampicilina
Fluoroquinolonas

La misma cepa

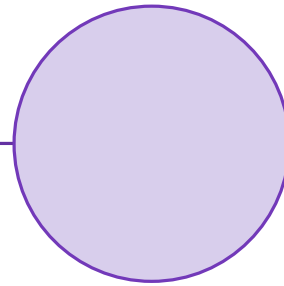


Métodos de
Tipificación

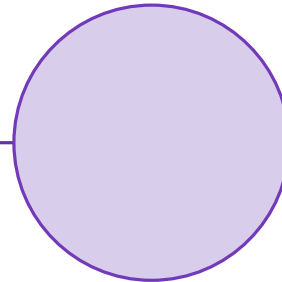
Aislamientos
relacionados
epidemiológicamente

Relacionados
genéticamente

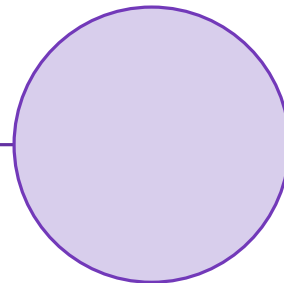
Tipificación molecular



Investigación de brotes de enfermedades infecciosas



Transmisión de microorganismos



Vigilancia epidemiológica

Elección del método de tipificación



Problema a resolver

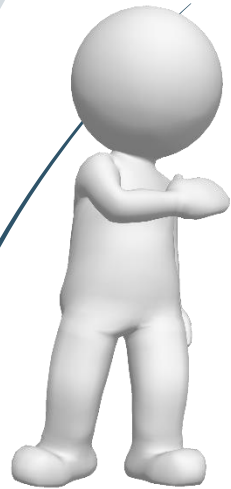
Epidemiología

Tiempo

Contexto geográfico

Recursos disponibles

Características



- ✓ Capacidad de discriminación
- ✓ Altamente reproducible
- ✓ Fácil de realizar e interpretar
- ✓ Rápida

Resultados de tipificación molecular

Los aislamientos que representan el brote son la progenie reciente de un precursor común

Dichos aislamientos tendrán el mismo genotipo

Aislados epidemiológicamente no relacionados tendrán diferentes genotipos

Medicina Traslacional

Aplicar medidas de prevención y control de las infecciones

- Son más rentables cuando se aplican lo antes posible

El uso oportuno de las medidas:

- Minimiza la transmisión de patógenos
- Asegura una atención adecuada y la seguridad del paciente a pesar de los limitados recursos





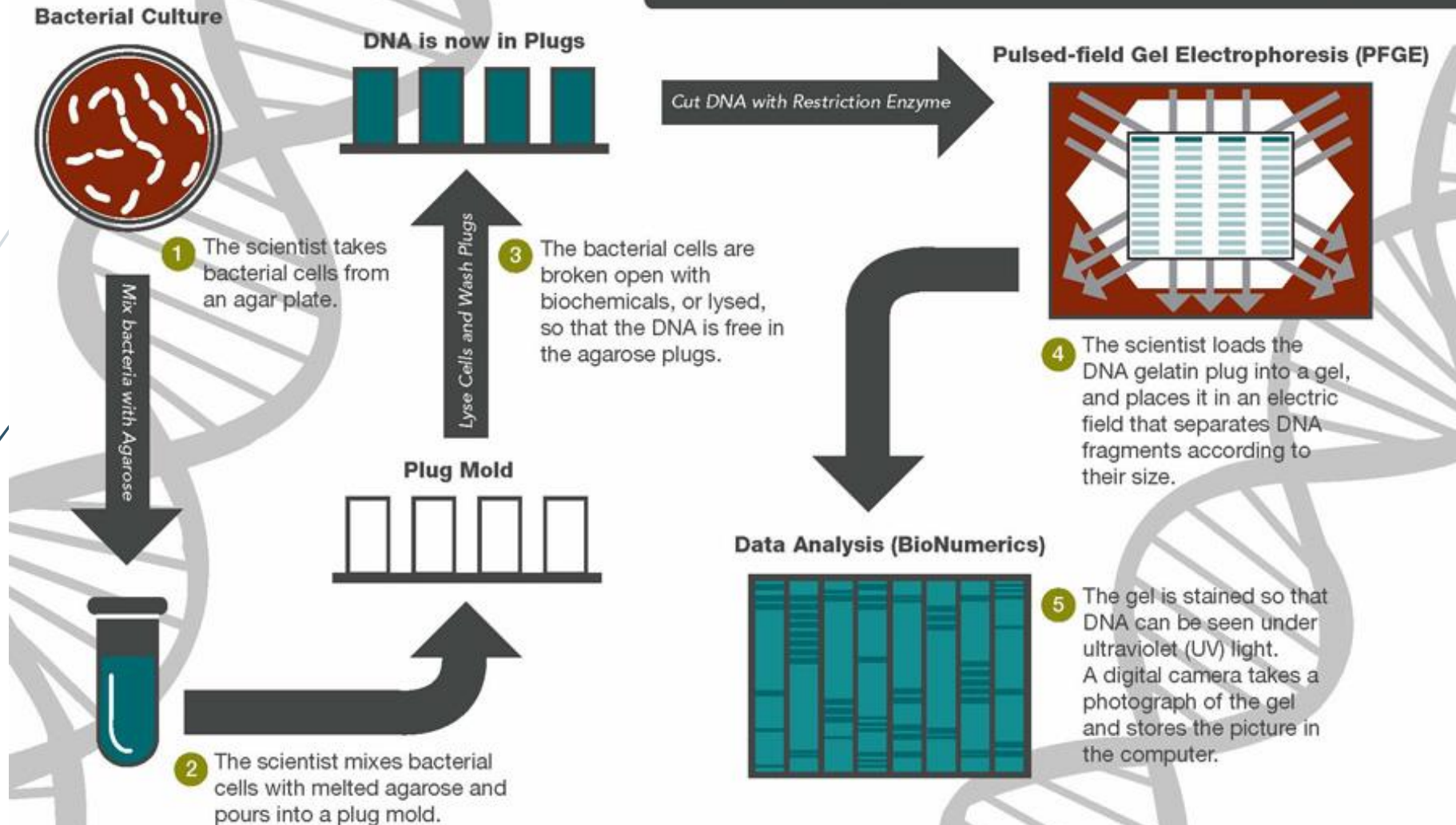
Técnicas Moleculares

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

- Método de tipificación molecular “gold standard”
- Más utilizado para caracterizar los aislamientos bacterianos en brotes
- Analizar eventos de transmisión
- Producir una huella digital de ADN de un aislado bacteriano



The Pulsed-field Gel Electrophoresis Process



Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Ventajas

Aborda una gran porción de un genoma investigado (>90%)

Inserciones o deleciones
Eventos de recombinación

Excelente capacidad discriminadora y alta concordancia epidemiológica

Reproducibilidad intra-laboratorios

Patrones de restricción de ADN estables y reproducibles

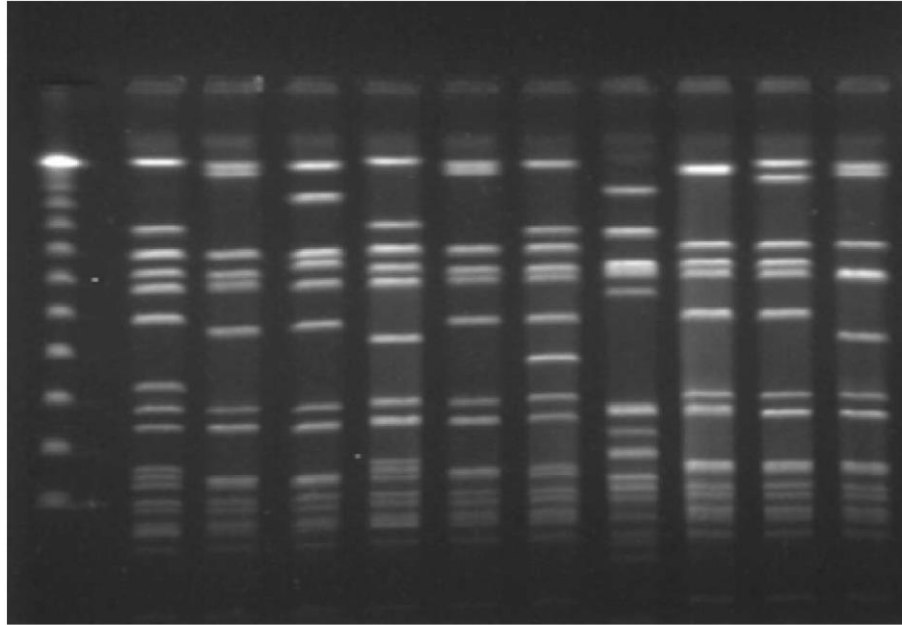


Figure 1. Pulsed-field gel electrophoresis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates.

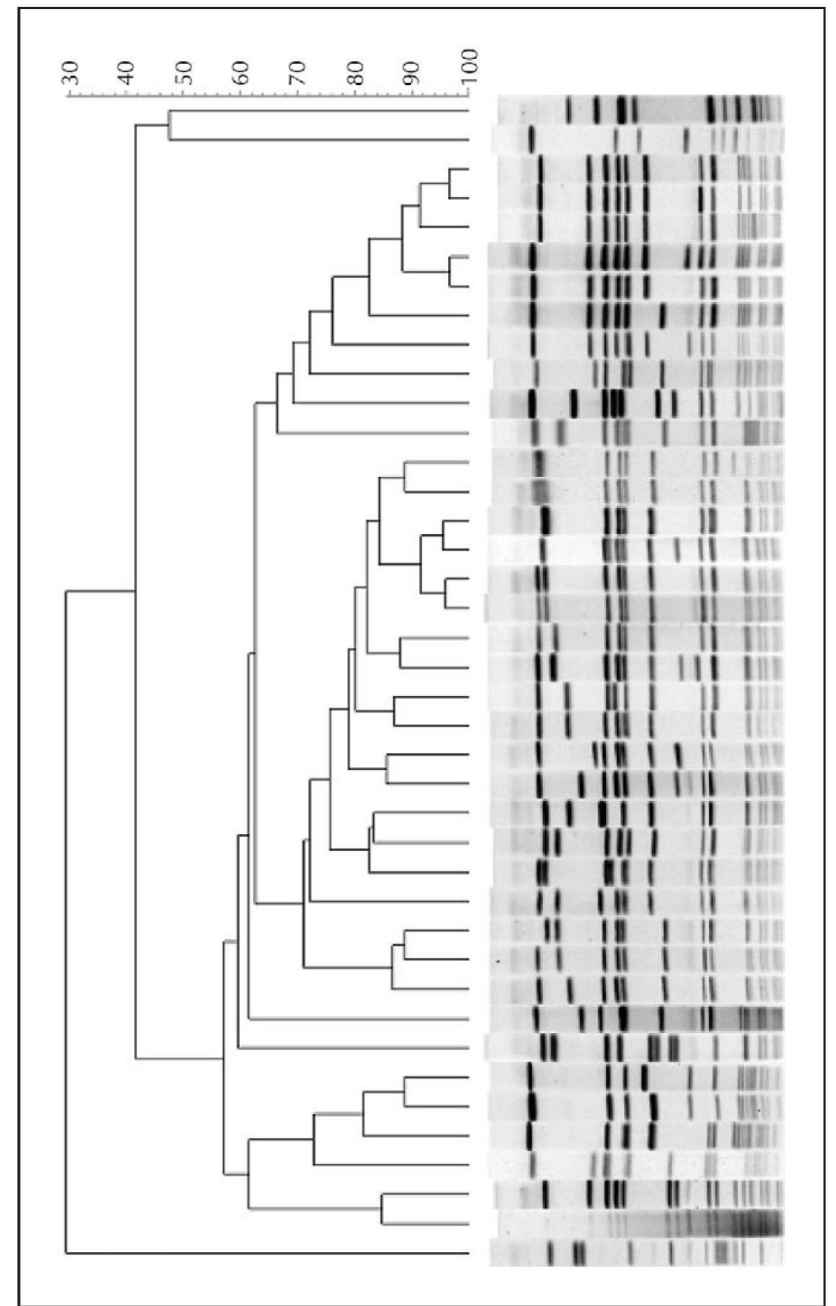


Figure 2. Dendrogram of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates.

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Desventajas

Técnicamente exigente: mano de obra y tiempo

Falta de resolución en bandas de tamaño casi idéntico

Análisis de resultados: subjetivo

Bases de datos internacionales
Seguimiento de cepas

PCR de Elementos Repetitivos (rep-PCR)

- Patrones de huella genómica
- Cebadores que se hibridan con secuencias repetitivas intergénicas no codificantes dispersas a través del genoma
- PCR amplifica rep
- Produce multiples amplicones
- Electroforésis caracterizan tamaños
- Patrón de bandas





PCR de Elementos Repetitivos (rep-PCR)

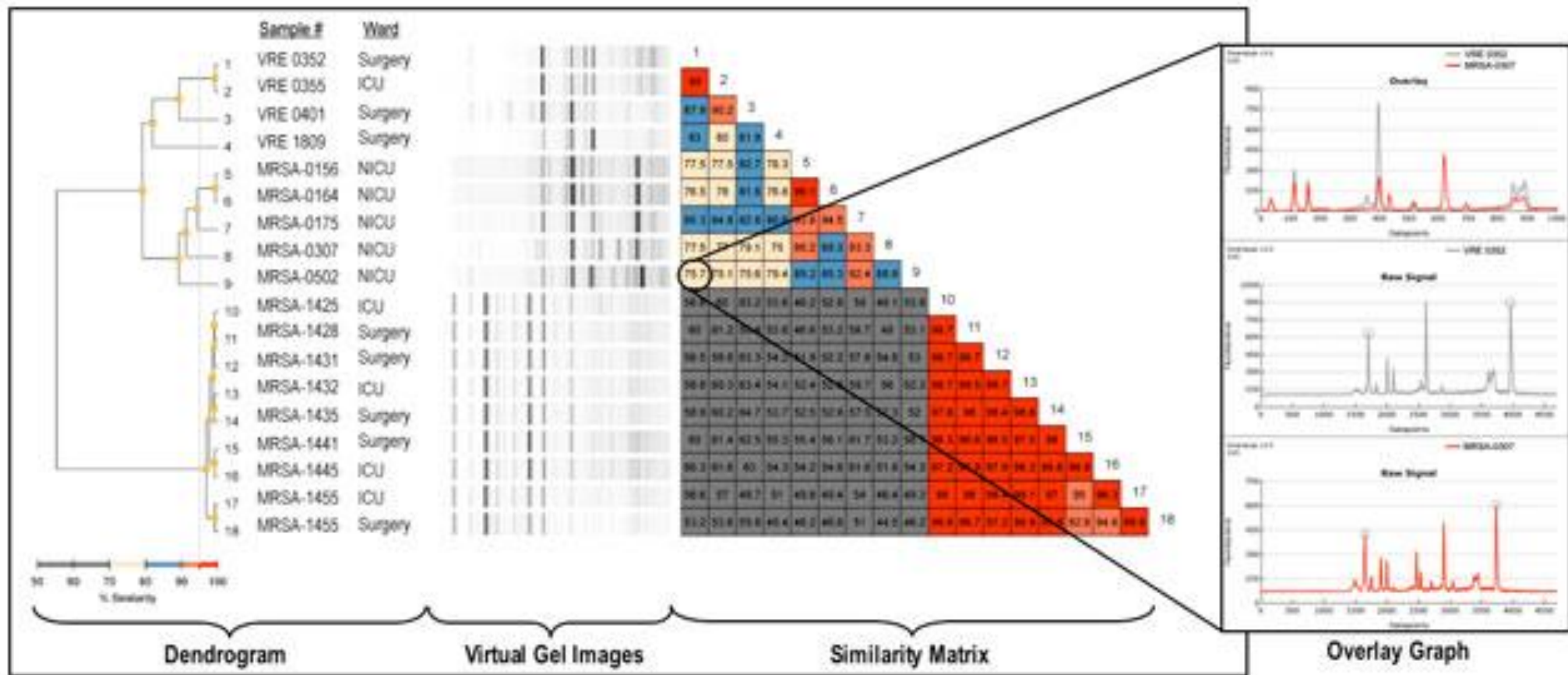
Ventajas

Resultados en corto tiempo

Enfoque económico

Altamente discriminatorio para muchos
microorganismo

Procedimiento estandarizado



PCR de Elementos Repetitivos (rep-PCR)

Desventajas

Carece de reproducibilidad

Tipificación de especies es limitada a los kits disponibles

27 kits para especies bacterianas y 4 kits para especies de hongos

Acinetobacter spp., *Klebsiella* spp.,
E. coli, *Pseudomonas aeruginosa*

Diferenciación Estafilococos y Mycobacteria es limitado

Loci de repetición en tándem de número variable (VNTR)

- Genomas bacterianos poseen muchas regiones con repeticiones de nucleótidos en las secuencias ADN codificante y no-codificante
- Repeticiones son directamente adyacentes entre sí
- Su número en el mismo locus varía entre los aislados
- Las regiones genómicas se llaman locus VNTR
- VRE aislados fueron genotipificados por multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

MLVA Process

(Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis)

Bacterial Culture



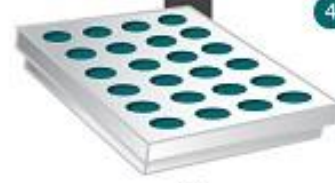
Boil bacteria to release DNA

- 1 Scientists take bacterial cells from an agar plate and boil the cells to release DNA.



- 2 Scientists have to detect the DNA region needed for this type of fingerprinting, called the variable-number tandem repeat arrays (VNTR). To do this, they use polymerase chain reaction (PCR), which combines the DNA with chemicals to amplify the VNTR.

PCR amplification



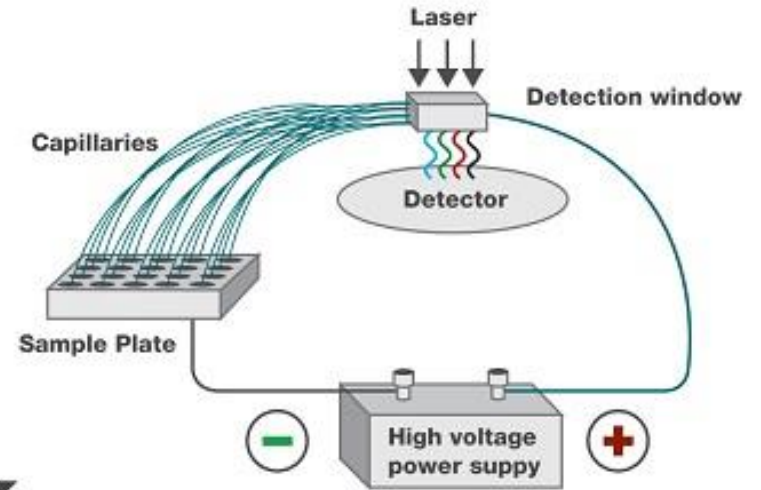
- 4 Scientists load the PCR products into a sample analysis plate and mix them with chemicals that help them determine the size of the product.

Load plate into device

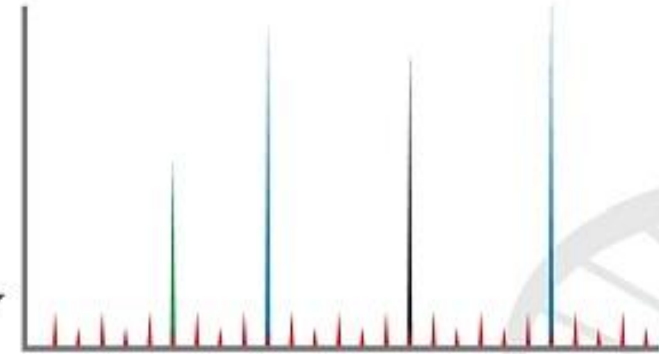


- 3 After PCR, scientists must determine the size of the PCR products. The different sizes will tell scientists how related the bacterial strains are to each other.

PCR product analysis



- 5 Using capillary electrophoresis, the fragment analysis solution is run through a gel matrix in an electric field to determine the sizes of the DNA fragments.



- 6 The data output of the MLVA process is called an electropherogram. It shows the DNA standards of known size in red, and the sizes of the PCR products in blue, green, and black. The PCR products sizes are converted into allele types using special software, which lets scientists determine how closely they are related.

Loci de repetición en tándem de número variable (VNTR)

Ventajas

Sencilla, rápida y relativamente económica

No es necesario un equipo de electroforesis sofisticado

Resultados comparados con bases de datos referencia

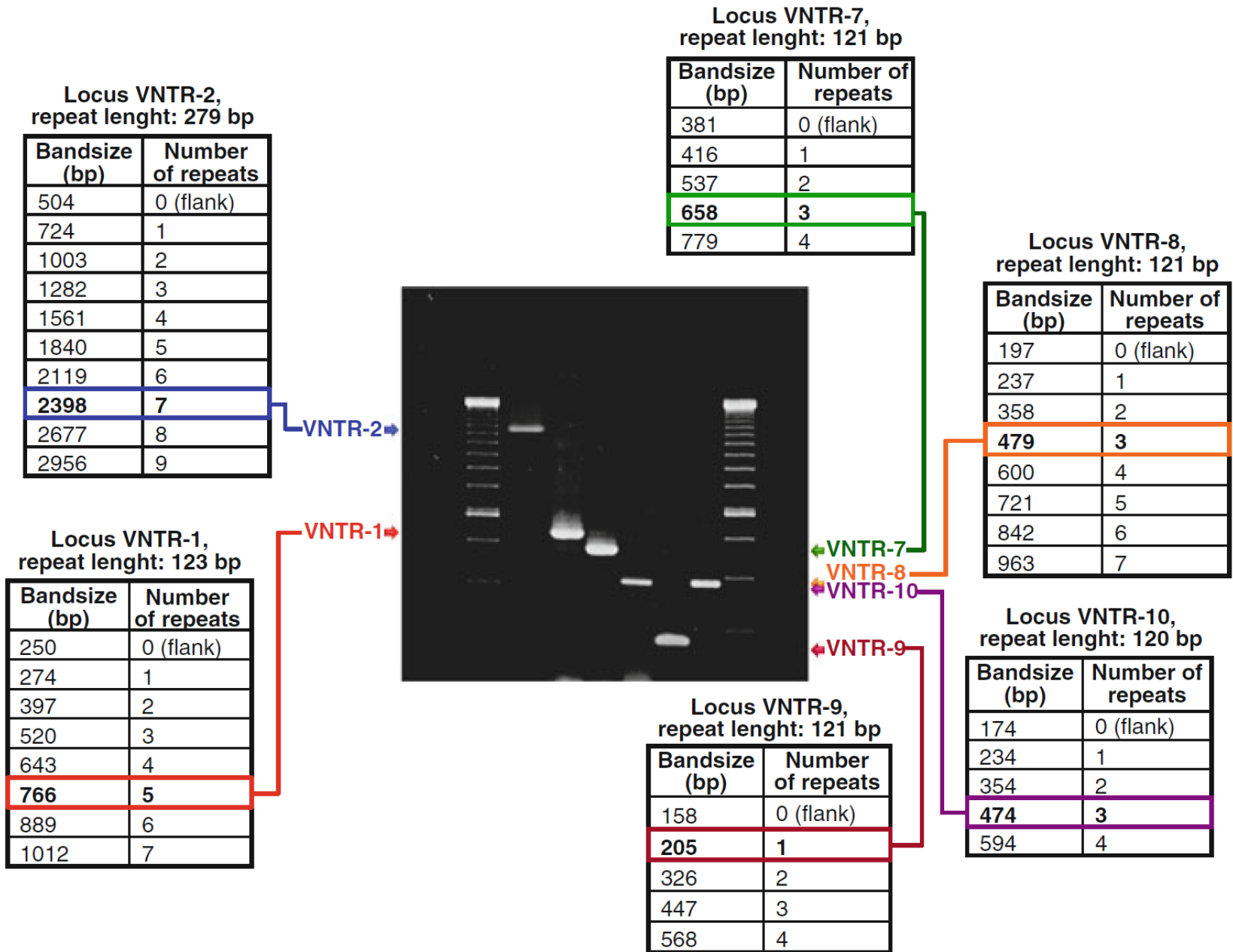


Fig. 2.2 Schematic representation of the MLVA assay for *Enterococcus faecium* isolates. Six loci

Loci de repetición en tándem de número variable (VNTR)

Desventajas

No es un método universal, diseñar primers específicos para cada patógeno

No es 100% reproducible, secuenciar amplicones de los alelos

La diferencia de tamaño en un locus VNTR no siempre puede reflejar el número real de repeticiones en tándem



Tipificación de secuencias Multilocus (MLST)

- ▶ Aumentar el poder discriminatorio del esquema “clásico”
- ▶ Amplificación por PCR y secuenciación
- ▶ MLST basado en siete genes housekeeping
- ▶ atpA, ddl, gdh, purk, gyd, pstS, adk

Tipificación de secuencias Multilocus (MLST)

Ventajas

Datos producidos son inequívocos por una nomenclatura estandarizada a nivel internacional

<https://pubmlst.org/> y <http://www.mlst.net/>

Altamente reproducible

Tipificación de secuencias Multilocus (MLST)

Desventajas

Costosa: consumibles y reactivos

Laboriosa, consume mucho tiempo

Discriminación insuficiente para algunos patógenos



Secuenciación del genoma completo (WGS)

- ▶ Secuencia de las bases nitrogenadas en un organismo, identificar su huella digital de ADN o patrón único
- ▶ Secuenciación determinar el orden de las bases en el genoma de un organismo
- ▶ La secuenciación de próxima generación NGS
- ▶ Análisis altamente exacto y sin hipótesis de múltiples aislamientos para la detección
- ▶ Identificar el organismo y examinar la resistencia y la virulencia

The Whole Genome Sequencing (WGS) Process

WGS is a laboratory procedure that determines the order of bases in the genome of an organism in one process. WGS provides a very precise DNA fingerprint that can help link cases to one another allowing an outbreak to be detected and solved sooner.

Bacterial Culture



1. DNA Extraction

1 Scientists take bacterial cells from an agar plate and treat them with chemicals that break them open, releasing the DNA. The DNA is then purified.



2. DNA Shearing

2 DNA is cut into short fragments of known length, either by using enzymes "molecular scissors" or mechanical disruption.



3. DNA Library Preparation

3 Scientists make many copies of each DNA fragment using a process called polymerase chain reaction (PCR). The pool of fragments generated in a PCR machine is called a "DNA library."



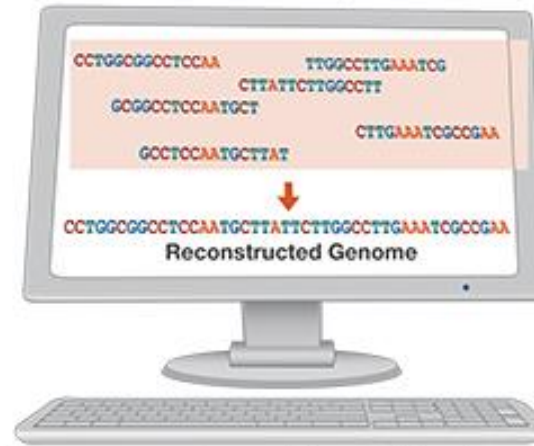
4. DNA Library Sequencing

4 The DNA library is loaded onto a sequencer. The combination of nucleotides (A, T, C, and G) making up each individual fragment of DNA is determined, and each result is called a "DNA read."



5. DNA Sequence Analysis

5 The sequencer produces millions of DNA reads and specialized computer programs are used to put them together in the correct order like pieces of a jigsaw puzzle. When completed, the genome sequence containing millions of nucleotides (in one or a few large pieces) is ready for further analysis.



DNA Reads

Secuenciación del genoma completo (WGS)

Ventajas

Identificación precisa y caracterización de aislamientos bacterianos

Comparar diferentes genomas con una resolución de un solo nucleótido

Identifica variantes de un solo nucleótido

Grandes volúmenes de datos en corto período de tiempo para ensamblaje de nuevos genomas

Secuenciación del genoma completo (WGS)

Desventajas

Interpretar la información importante de un conjunto de datos obtenidos

No es un enfoque rápido, ni costo efectivo



Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones

- La implementación de métodos estándar para tipificación molecular demuestra ser eficaz para la detección y el análisis de un grupo de patógenos.

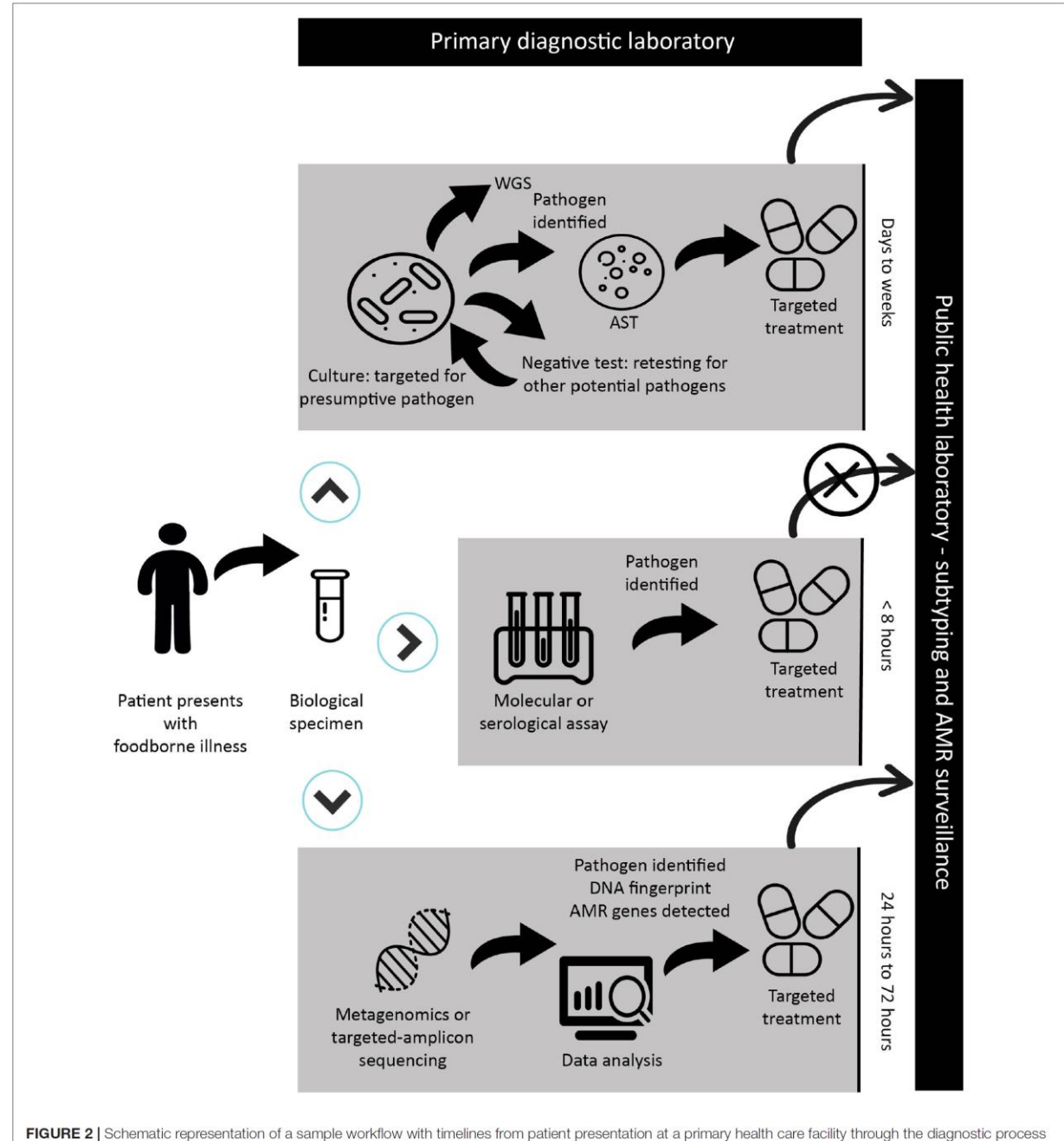


FIGURE 2 | Schematic representation of a sample workflow with timelines from patient presentation at a primary health care facility through the diagnostic process

A decorative graphic on the left side of the slide. It features a dark blue vertical bar on the far left. A black arrow points to the right from the top of this bar. Below the arrow, several thin, curved lines in shades of blue and grey sweep across the page, creating a dynamic, abstract background element.

Conclusiones

- ▶ Métodos proporcionan resultados confiables en un par de días.
- ▶ Permiten una implementación temprana y más precisa de las medidas de control de la infección.
- ▶ Son capaces de identificar casos de brotes falsos positivos basados en características espacio temporales y así ahorrar recursos financieros y de personal.



Perspectivas



- ▶ Mejorar la vigilancia de los brotes de enfermedades intrahospitalarias y la resistencia a los antibióticos.
- ▶ Sistemas nacionales de vigilancia y la infraestructura de laboratorios deben mantenerse a la par con la tecnología cambiante.

Bibliografía

- Andrei, A., and Zervos, M.J. (2006). The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch Pathol Lab Med* 130(5), 662-668. doi: 10.1043/1543-2165(2006)130[662:TAOMTT]2.0.CO;2.
- Foxman, B., and Riley, L. (2001). Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 153(12), 1135-1141.
- Mutters, N.T., Heeg, K., Spath, I., Henny, N., and Gunther, F. (2017). Improvement of infection control management by routine molecular evaluation of pathogen clusters. *Diagn Microbiol Infect Dis* 88(1), 82-87. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.013.
- Singh, A., Goering, R.V., Simjee, S., Foley, S.L., and Zervos, M.J. (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 19(3), 512-530. doi: 10.1128/CMR.00025-05.
- Wale, M., Kibsey, P., Young, L., Dobbyn, B., and Archer, J. (2016). New approaches to infection prevention and control: implementing a risk-based model regionally. *Int J Qual Health Care* 28(3), 405-411. doi: 10.1093/intqhc/mzw041.
- Struelens MJ. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect.* 1996;2(1):2-11.
- van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13 Suppl 3:1-46.
- A. C. Fluit, A. M. Terlingen, L. Andriessen, R. Ikawaty, R. van Mansfeld, J. Top, J. W. Cohen Stuart, M. A. Leverstein-van Hall, and C. H. E. Boel. (2010) Evaluation of the DiversiLab System for Detection of Hospital Outbreaks of Infections by Different Bacterial Species. *JCM.* 48:3979-3989
- I. T. M. A. Overdevest, I. Willemsen, S. Elberts, C. Verhulst, M. Rijnsburger, P. Savelkoul, and J. A. J. W. Kluytmans. (2011) Evaluation of the DiversiLab Typing Method in a Multicenter Study
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* 2013;18(4):20380.







Prosperidad para todos



Grupo funcionales

Grupo promotor: Instituto Nacional de Salud

Grupo de conducción: Experto metodológico y temático INS

Grupo de apreciación: Conformado por expertos nacionales seleccionados bajo los criterios de experticia en el área temática, que aceptaron libremente su participación en el consenso propuesto los cuales fueron:

1. Asociación Colombiana de Infectología (ACIN)
2. Fundación Valle del Lili
3. Red de Vigilancia de Eventos Nosocomiales del Valle (RENOVA)
4. Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM)
5. Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS)
6. Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Medellín (GERMEN)
7. Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque
8. Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) de la Universidad El Bosque
9. Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá (GREBO)-Universidad Nacional de Colombia
10. Grupo de Infecciones Nosocomiales y Resistencia Microbiana (INOREMI) de la
11. Universidad del Atlántico

Criterios para incluir patógenos en la lista OMS

El grado de letalidad de las infecciones que provocan

El hecho de que el tratamiento requiera o no una hospitalización larga

La frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes cuando infectan a las personas de las comunidades

Criterios para incluir patógenos en la lista OMS

La facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas

Si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse

Cuántas opciones terapéuticas quedan

Si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan

