



Universidad Nacional de Asunción

RECTORADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD

Epidemiología molecular de Staphylococcus aureus resistente a meticilina aislados de niños en el año 2013



Fátima Rodríguez, MSc

Área de Bacteriología Molecular

Dpto. Biología Molecular y Biotecnología-IICS, UNA

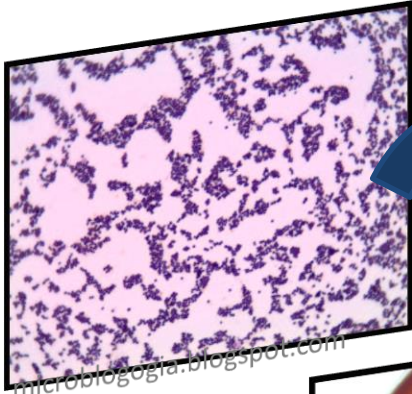
Estancia de Vinculación Financiada por el CONACYT



Unidad de Bacteriología,
Dpto. de Laboratorios de Salud Pública, MSP
Montevideo, Uruguay

Agosto 2017

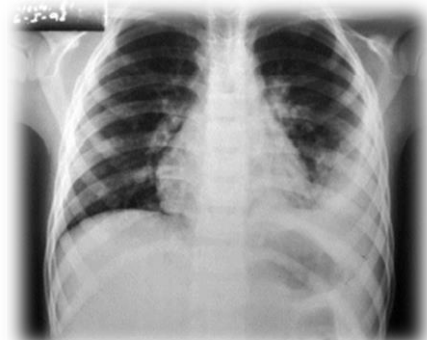
Staphylococcus aureus



NODARSE HERNANDEZ, R y DEL CAMPO ABAD, R. CMM 2013

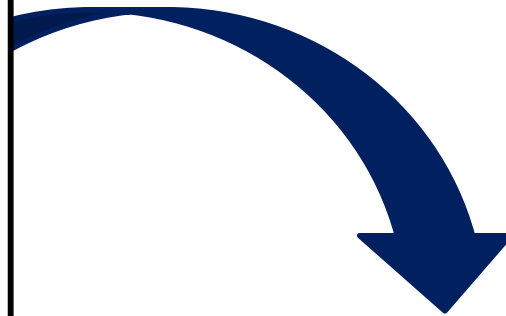
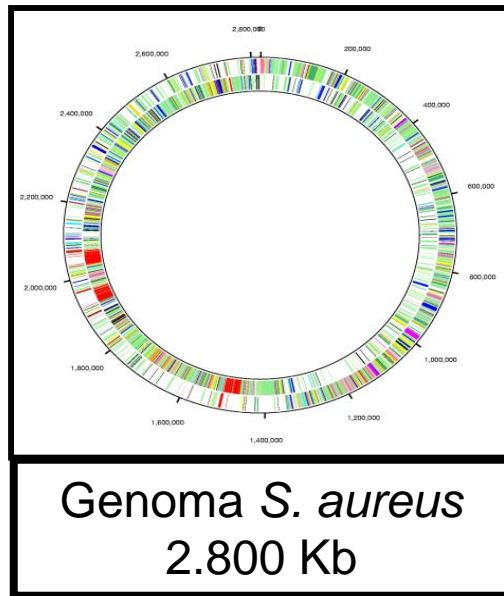


nutuv.blogspot.com



TAMAYO MENESES, L y CASTILLO LOAYZA, J. CHC, 2006

Staphylococcus aureus



S. aureus

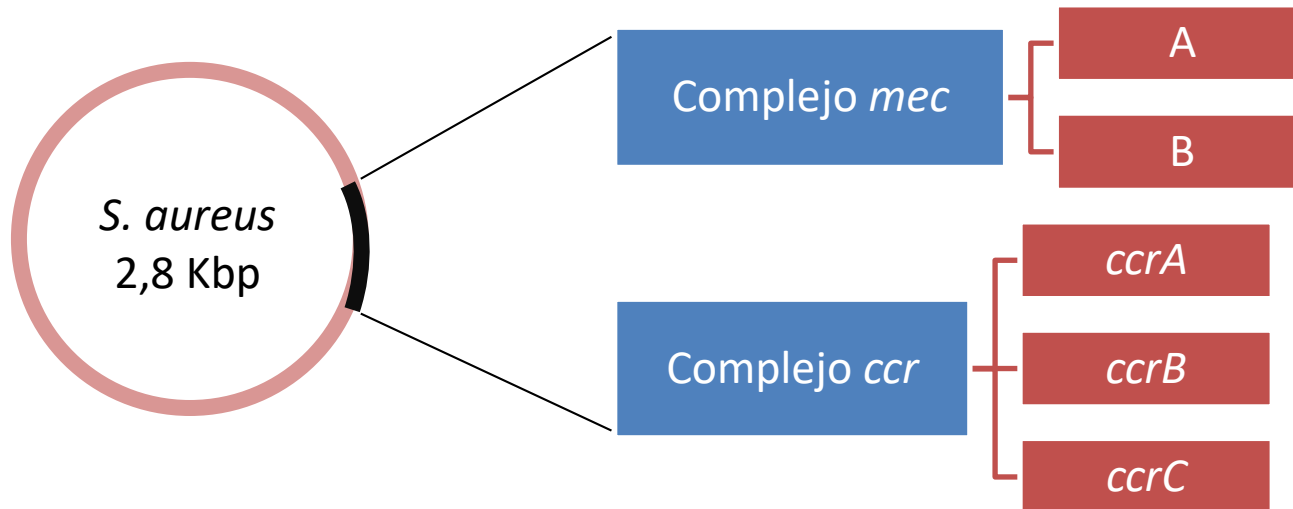
Resistencia
ATB

Factores de
Virulencia

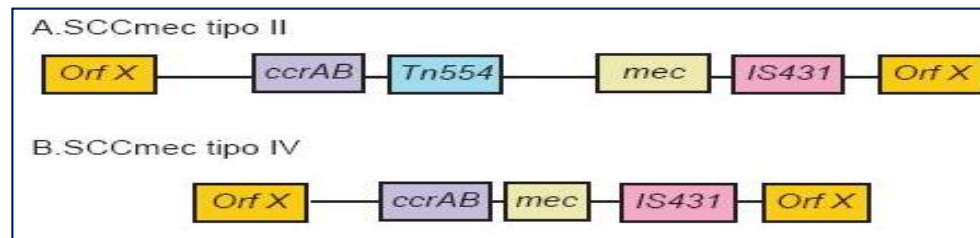
Variabilidad
Genética

Resistencia a meticilina

PBP2a: con afinidad reducida a atb betalactámicos: gen *mecA*.
Transportado por un elemento genético móvil: *cassette SCCmec*.



Ejemplo:

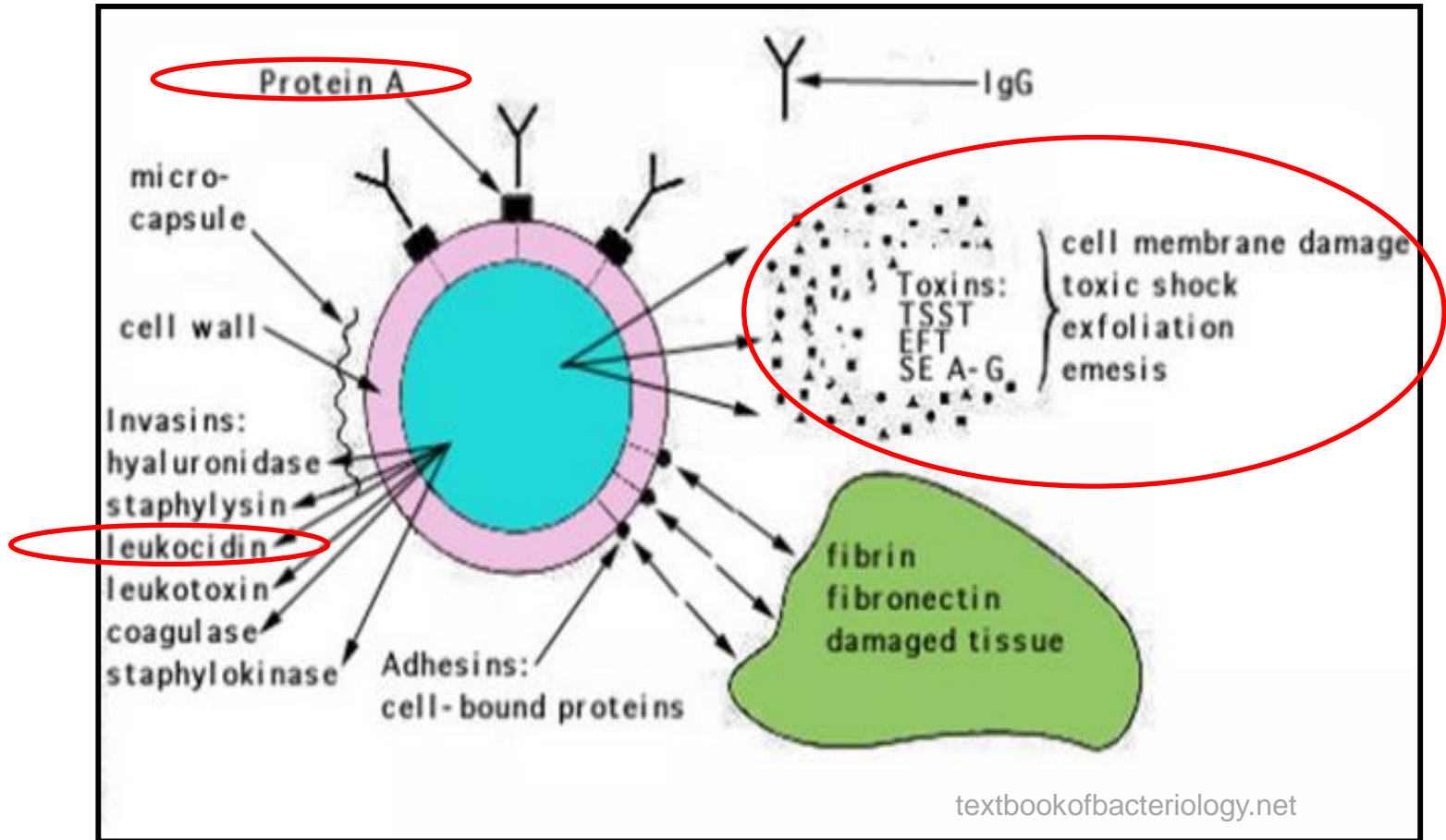


Nosocomial y Comunitario

| Características | SARM-AH (1961) | SARM-CO (1980) |
|---------------------------------------|--|---|
| Factores de Riesgo | Cirugía reciente, Diálisis, Catéter o vías, Residencia en Institución. Edad adulta. | Lesiones de Piel, Picaduras de Insectos, Contacto Directo con Infectados o Portadores, Hacinamiento. Niños y jóvenes. |
| Manifestación Clínica | Bacteriemia, infecciones asociadas a catéteres o prótesis | IPPB, osteomielitis, ocasionalmente neumonía necrotizante |
| Perfil de Susceptibilidad Antibiótica | Multidrogo-resistencia: betalactámicos, macrólidos, TMS, LIN, TET, RIF, QUIN, incluso a glucopéptidos. | Resistencia a betalactámicos. Susceptibilidad variable a macrólidos, TMS, TET, LIN. |
| SCCmec asociado | I, II, III | IV y V |
| Expresión de PVL | Raro | Común |

Adaptado de: Rodríguez-Noriega et al, 2010

Factores de Virulencia



Factores de Virulencia

Leucocidina de
Panton-
Valentine

- Destrucción leucocitaria y necrosis tisular
- Acción mediante formación de un poro

Proteína A

- Capacidad de unirse a la fracción Fc de IgG, dificultando opsonización y fagocitosis

Hemolisinas
 α y β

- α actúa a través de la formación de poros
- β es una esfingomielinasa

Toxinas
Exfoliativas

- Actividad proteolítica
- Síndrome de piel escaldada e impétigo

Enterotoxinas

- Asociadas a Intoxicaciones alimentarias

Variabilidad genética

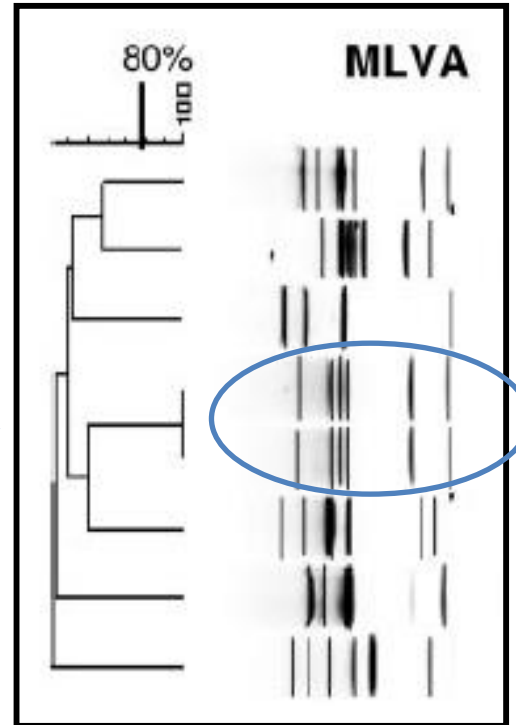
Epidemiología compleja, circulación de diversos clones a nivel mundial

Herramientas moleculares

| Identificación Clonal | | Similitud de Aislados | |
|--|---|--|---|
| MLST | <i>spA typing</i> | PFGE | MLVA |
| Estándar para evolución a largo plazo | | Estándar para seguimiento a corto plazo (BROTOS) | Específico para <i>S. aureus</i> . |
| Secuenciación de 7 genes constitutivos | Secuenciación del gen que codifica para la proteína A (simple locus). | Alto poder discriminatorio. Analiza genoma completo. Patrón Smal PFGE. | Amplificación de 7 genes VNTR PCR + Electroforesis |

Multiple-Locus Variable Analysis (MLVA)

| Genes Blanco |
|---------------------|
| <i>ClfA</i> |
| <i>ClfB</i> |
| <i>Sdr C, D y E</i> |
| <i>Spa</i> |
| <i>SspA</i> |



(Tenover et al, 2007)

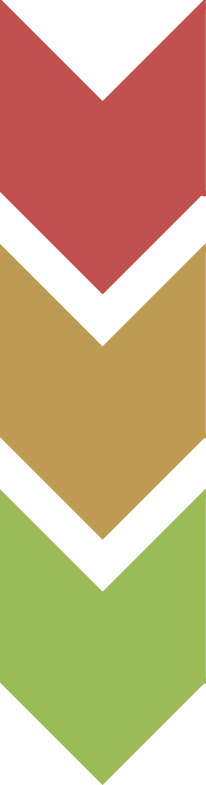
- ✓ Similitud de aislados, útil para estudios de brotes.
- ✓ Bajo Costo
- ✓ Poco tiempo
- ✓ Fácil de ejecutar
- ✓ Poder discriminatorio comparable con PFGE

(Malachowa 2005)

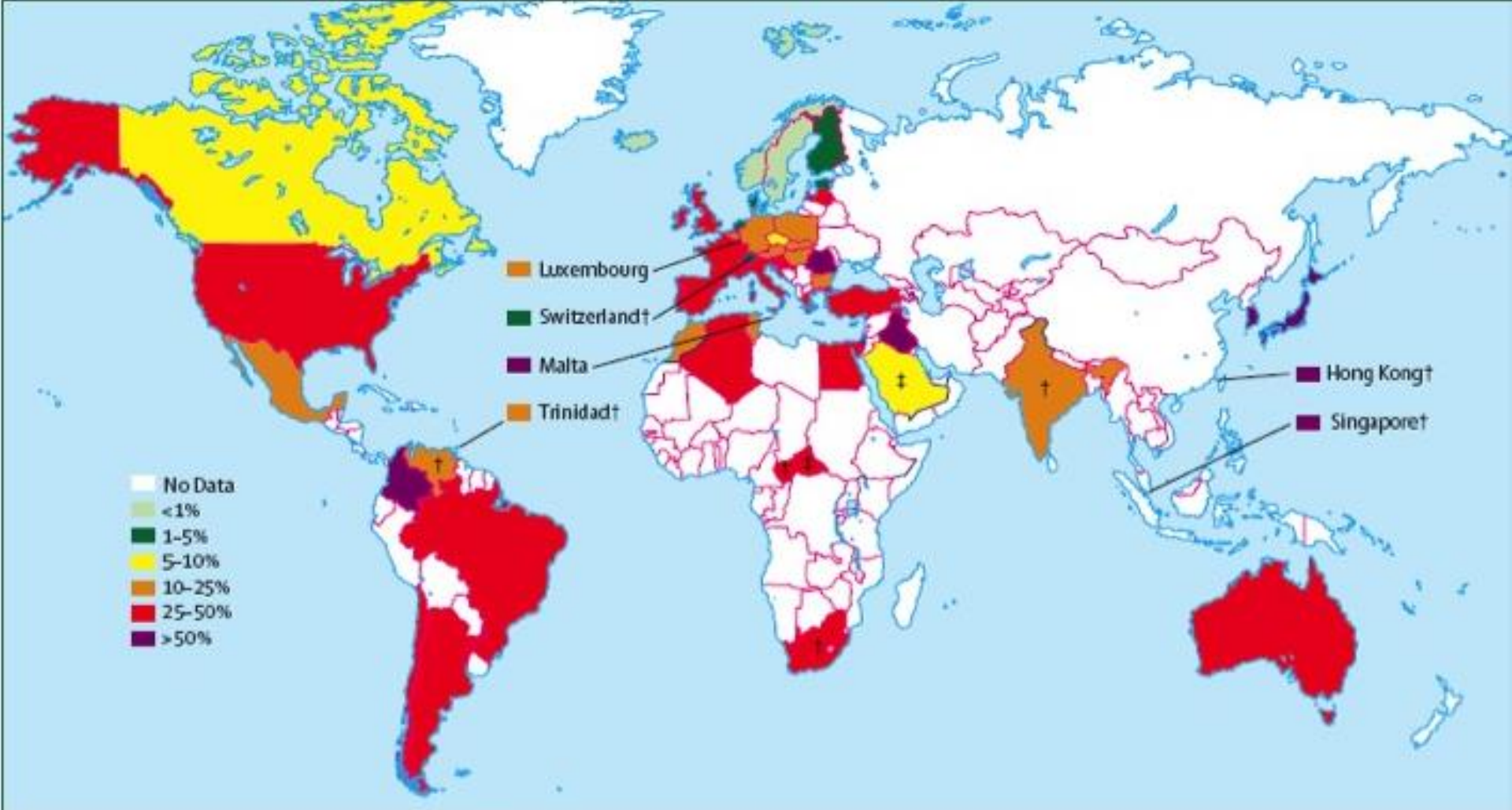
POTENCIAL: INVESTIGACIÓN EN CASOS SOSPECHOSOS DE BROTES Y EPIDEMIOLOGIA

Variabilidad genética

UTILIDAD EPIDEMIOLÓGICA

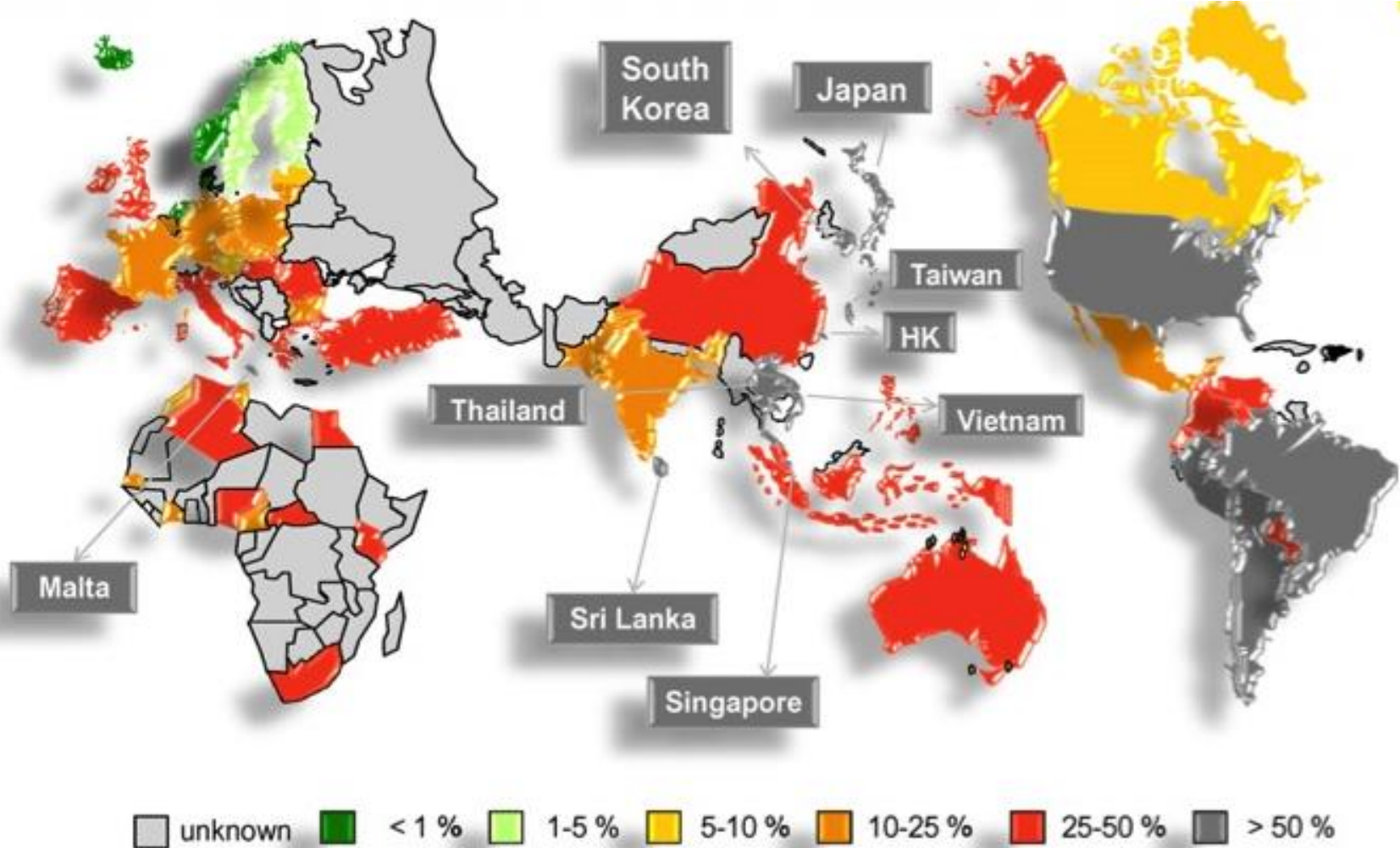
- 
- Identificar fuentes y patrones de diseminación de cepas
 - Establecimiento de medidas adecuadas para el control de brotes
 - Evaluación de la efectividad de programas implementados

Antecedentes mundiales y regionales



SARM - Amenaza global – 2006

Grundman H et al. Lancet 2006, 2; 368 (9538): 874-85



Prevalencia mundial de SARM-AH

Stefani et al. Int J Antimicrob Agents. 2012

S. aureus resistente a meticilina (SARM)

CDC 2013

“Nivel de amenaza seria”

www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013

- Mundo: $2 \cdot 10^9$ infecciones. SARM: 5-53 millones de casos.
- EEUU: 2 millones de infecciones/año y causa más muertes que HIV + H1N1 + *Streptococcus pneumoniae*.

Evolución de clones SARM en América Latina

Rodríguez-Noguera. Int J Inf Diseases. 14(2010): 560-566

Clones SARM
Reportados en Paraguay
en ADULTOS

Hospitalarios (Mayor L,
2007)

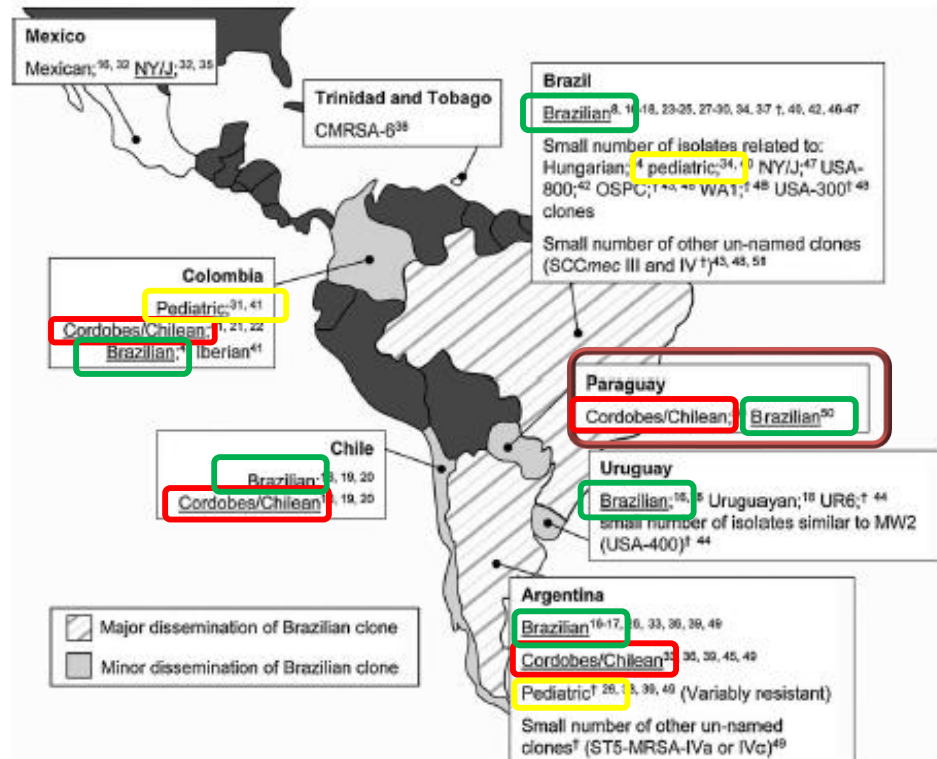
Cordobés-Chileno

CC5, ST5, SCCmec I

Brasileiro

CC8, ST239, SCCmec IIIA

Mayor L, Ortellado J, Menacho C *et al*. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in Asuncion, Paraguay. J Clin Microbiol. 2007; 45(7):2298-300.



Factores de Virulencia

INFORME BREVE

ISSN 0325-7541
Revista Argentina de Microbiología (2011) 43: 33-36

Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay

NATALIE WEILER^{1*}, GERARDO A. LEOTTA^{2,3}, MIRIAN N. ZARATE¹, EDUARDO MANFREDI²,
MERCEDES E. ALVAREZ¹, MARTA RIVAS²



Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 13(1) Abril 2015: 58-66

[http://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013\(01\)58-066](http://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013(01)58-066)

ARTICULO ORIGINAL

Frequency of gens that codify virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from children attending the Niños de Acosta Nú Pediatric General Hospital in 2010

Rodríguez Acosta F^I, Carpinelli L^I, Basualdo W^{II}, Castro H^{II}, Quiñonez B^{II+},
Argüello R^{II}, *Guillén RM^I

Variabilidad Genética

Artículo de Investigación Científica y Tecnológica

Revista Duazary

ISSN: 1794-5992

Vol. 14

No. 2

131 - 140

Julio - Diciembre de 2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.21676/2389783X.1971>

MULTIPLE-LOCUS VARIABLE-NUMBER OF TANDEM REPEAT ANALYSIS STANDARDIZATION FOR COMMUNITY ISOLATES METHICILINE- RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STUDY IN PARAGUAY

Fátima Rodríguez-Acosta¹, Silvina Fernández², Sol Haim³, Marta Mollerach⁴, Wilma Basualdo⁵,
Héctor Castro⁶, Beatriz Quiñónez⁷, Rosa María Guillén-Fretes⁸

Maestría
Rodríguez, F

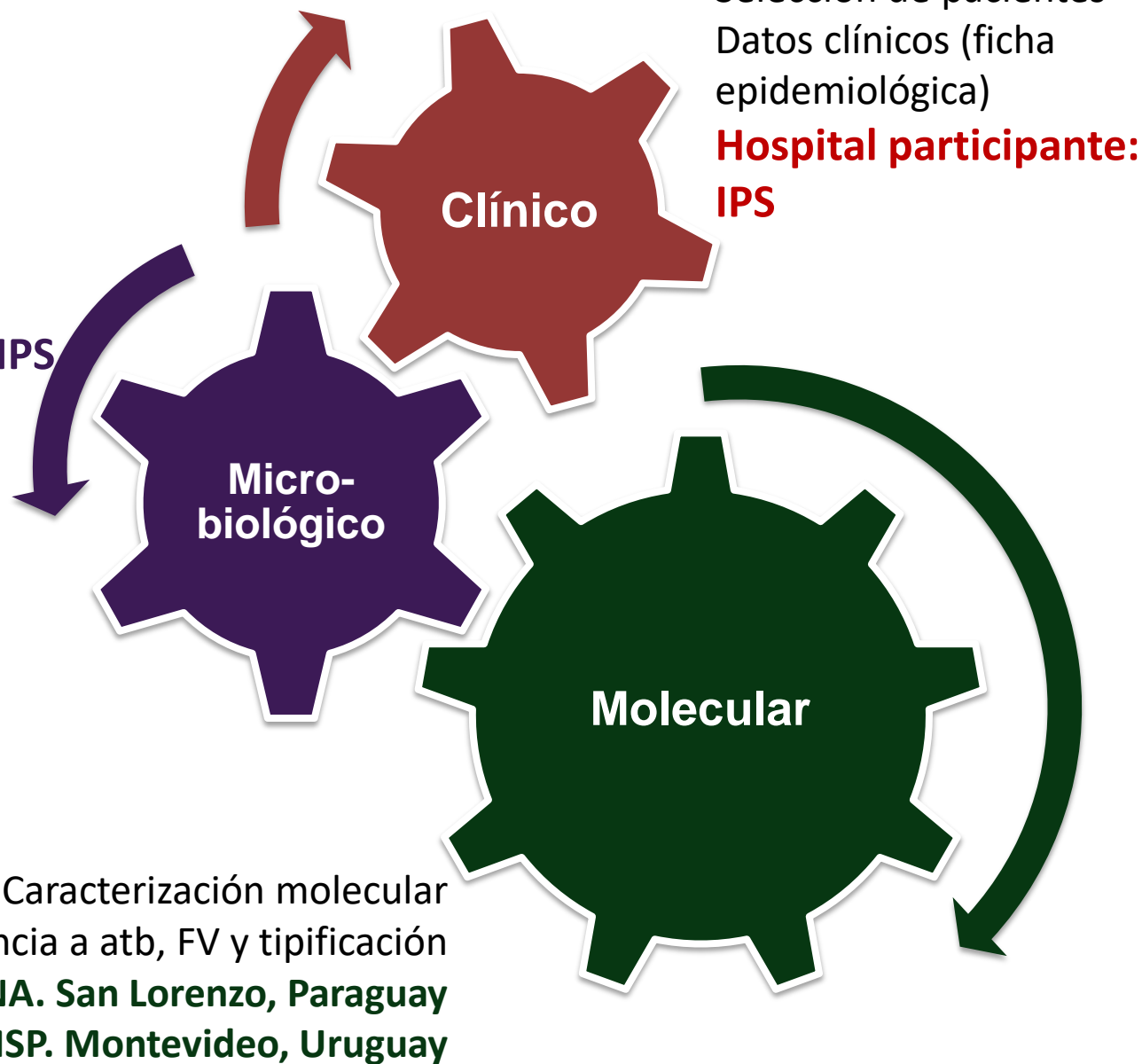
Objetivo General

*Identificar clones de Staphylococcus aureus
paraguayos empleando metodologías moleculares
combinadas*

Objetivos Específicos

1. Realizar un entrenamiento teórico-práctico para la caracterización de aislados de *S. aureus* que causaron infecciones en niños paraguayos hospitalizados, empleando la metodología de electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).
2. Interpretar los resultados arrojados por la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), mediante el uso de softwares.
3. Comparar los resultados obtenidos por PFGE con los datos de MLVA (realizado previamente en Paraguay) de los aislados de *S. aureus* de niños paraguayos.

Aislamiento de *S. aureus*
Antibiograma
Hospital participante: IPS



EJES Y PARTICIPANTES DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Metodología

Diseño Estudio

- Descriptivo de Corte Transverso
- Muestreo No Probabilístico de Casos Consecutivos
- 88 aislados de *S. aureus*

Componente Clínico y Microbiológicos

- Aislados de niños menores de 16 años hospitalizados.
- Sec. Piel, partes blandas y Líq. Corporales
- Fenotipo y Antibiograma: 31 SARM

Componente Molecular

- *mecA* y PVL
- Enterotoxinas, hemolisinas, toxinas exfoliativas
- MLVA, *spa typing*, *cassette SCCmec*

Antecedentes

- 30/88 aislados SARM de niños paraguayos ≤ 16 años hospitalizados.
- Periodo de tiempo: 2013
- Hospital: IPS
- Datos clínicos: tipo de infección (IPPB o Invasiva)
- Datos fenotípicos: identificación y susceptibilidad a atb,
- Datos genotípicos:

Factores de virulencia: genes *luk-PV*, *hla*, *hly*, *seA*, *seB*, *seC*, *seD*, *seH*, *etA*, *etB*

Tipificación: MLVA, *spa* Typing, Cassette SCCmec



Estancia DLSP, Uy

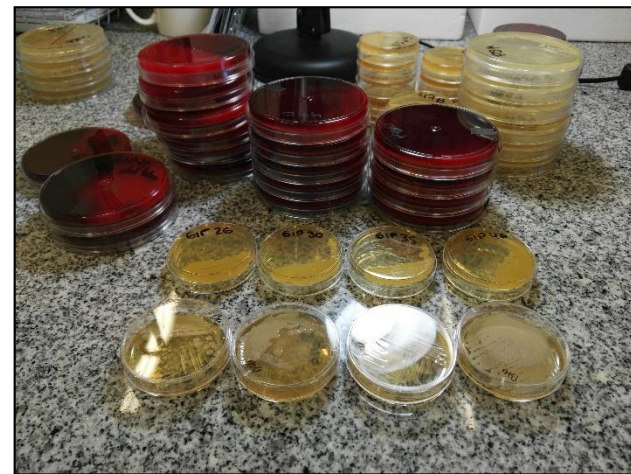
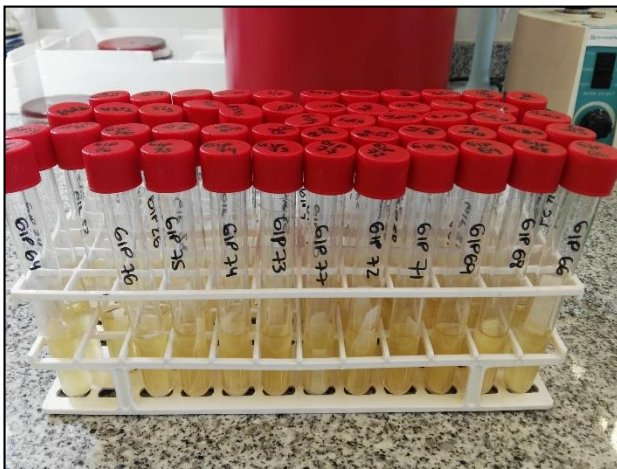
Estancia DLSP - MSP

Unidad de Bacteriología

A cargo de la Dra. Teresa Camou

Entrenamiento teórico-práctico Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).

1. Repique *S. aureus*
2. Preparación de plugs y digestión con la enzima de restricción Sma I
3. Electroforesis en Campo Pulsado
4. Tinción y visualización del gel bajo luz UV y registro fotográfico



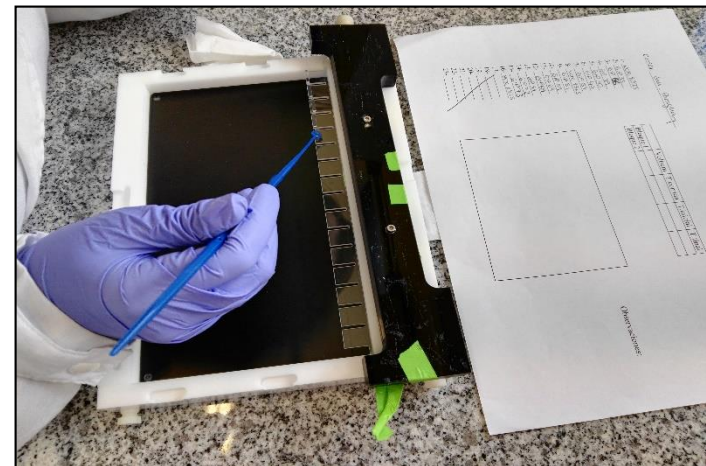
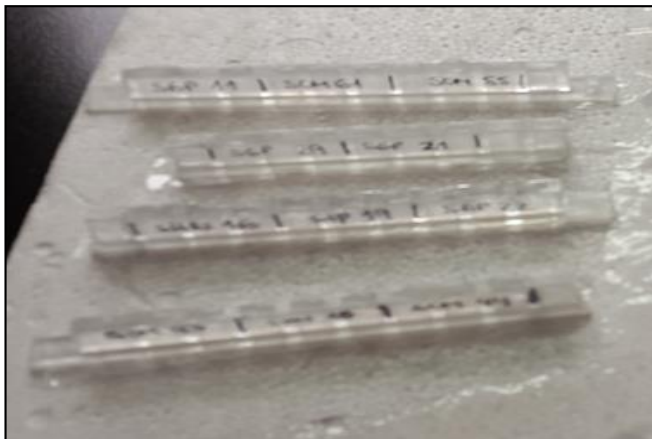
Estancia DLSP - MSP

Unidad de Bacteriología

A cargo de la Dra. Teresa Camou

Entrenamiento teórico-práctico Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).

1. Repique *S. aureus*
2. Preparación de plugs y digestión con la enzima de restricción Sma I
3. Electroforesis en Campo Pulsado
4. Tinción y visualización del gel bajo luz UV y registro fotográfico



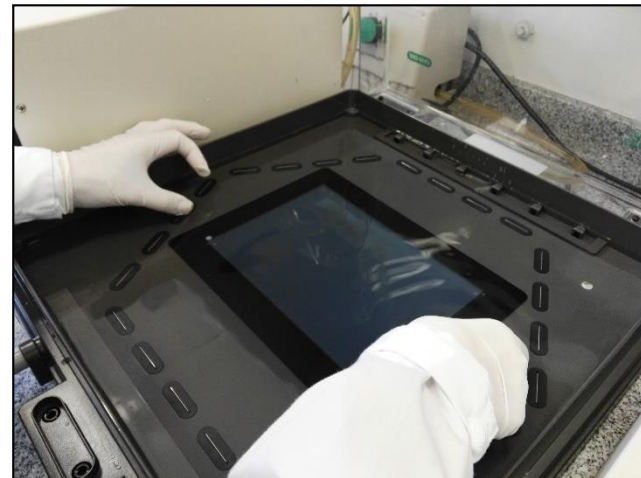
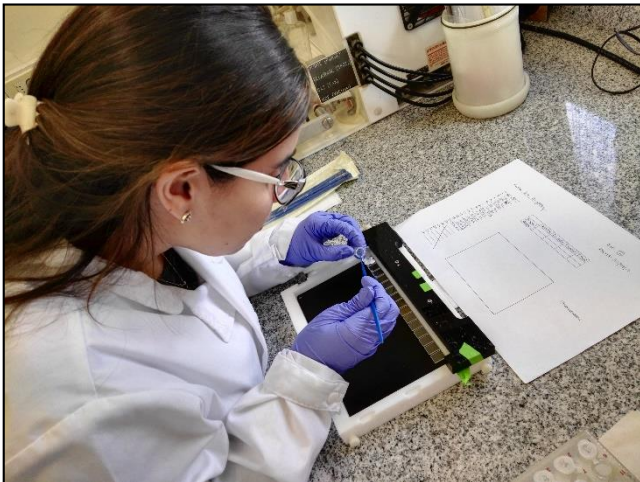
Estancia DLSP - MSP

Unidad de Bacteriología

A cargo de la Dra. Teresa Camou

Entrenamiento teórico-práctico Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).

1. Repique *S. aureus*
2. Preparación de plugs y digestión con la enzima de restricción Sma I
3. **Electroforesis en Campo Pulsado**
4. Tinción y visualización del gel bajo luz UV y registro fotográfico



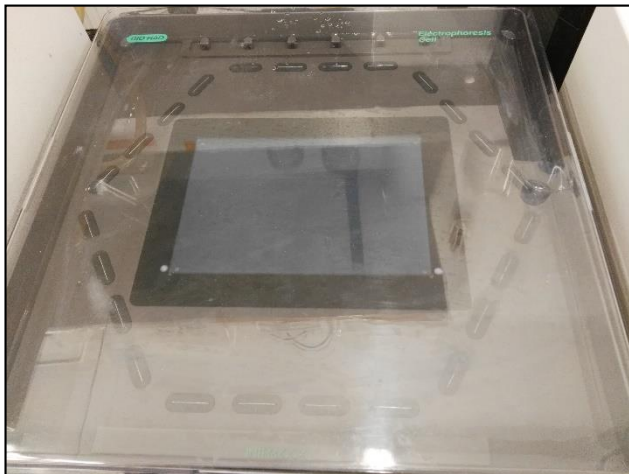
Estancia DLSP - MSP

Unidad de Bacteriología

A cargo de la Dra. Teresa Camou

Entrenamiento teórico-práctico Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).

1. Repique *S. aureus*
2. Preparación de plugs y digestión con la enzima de restricción Sma I
3. **Electroforesis en Campo Pulsado (CHEF DR III – Biorad)**
4. Tinción y visualización del gel bajo luz UV y registro fotográfico



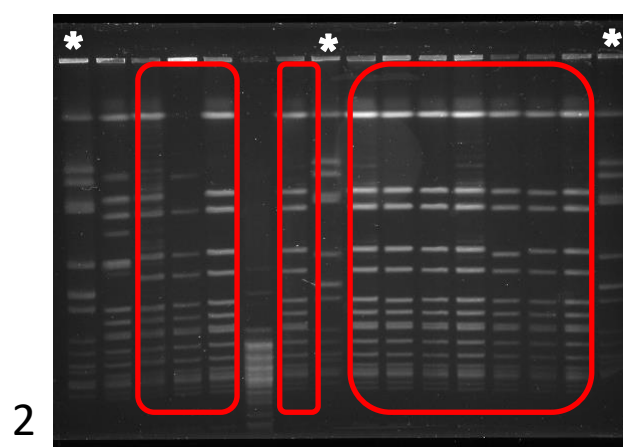
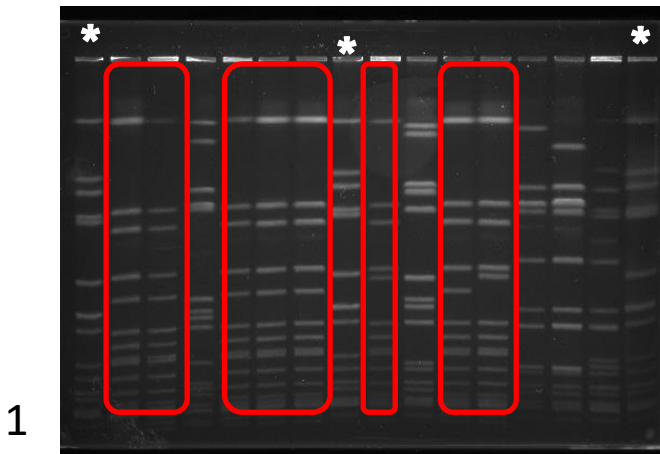
Estancia DLSP - MSP

Unidad de Bacteriología

A cargo de la Dra. Teresa Camou

Entrenamiento teórico-práctico Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).

1. Repique *S. aureus*
2. Preparación de plugs y digestión con la enzima de restricción Sma I
3. Electroforesis en Campo Pulsado
4. Tinción y visualización del gel bajo luz UV. Registro fotográfico e interpretación (Tenover, 1995).



76% (19/25)
PC-ST30-t019

12% (3/25)
PA-ST5-t311

CONCLUSIONES

La PFGE permitió validar resultados obtenidos por MLVA (~95% concordancia) agrupaciones que incluían a aislados con mismas características fenotípicas y genotípicas.

ALTO PODER DISCRIMINATORIO MLVA

25/30 aislados SARM analizados por PFGE durante la estancia (83%):

- 4/30 no cabían en los 2 geles realizados y los tiempos no fueron suficientes para un tercer gel.
- 1/30 se degradó en el proceso de PFGE.

CONCLUSIONES

76% (19/25) SARM PC-ST30-t019-IV-PVL+, correspondiente al aislado más frecuente en ambiente comunitario en nuestro país.



ENDÉMICO

12% (3/25) SARM PA-ST5-t311-IV-PVL+, aislado asociado a infecciones graves en la comunidad. En esta ocasión: Sepsis y cerebral.

RELEVANCIA

La importancia otorgada a las cepas SARM debido a mayor patrón de resistencia a otros antibióticos y facilidad de transmisión.

Necesidad de conocer los clones circulantes a nivel país, con el fin de dar el tratamiento oportuno, tomar medidas de control como aislamiento del paciente y otras medidas de higiene para evitar su propagación.

AGRADECIMIENTOS

Unidad de Bacteriología, Dpto. de Laboratorios de Salud Pública,
MSP. Montevideo, Uruguay:

Dra. Teresa Camou

Dra. Gabriela García

Dra. Mariana López



AGRADECIMIENTOS

CONACYT

Estancia financiada por el Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos del CONACYT. Convocatoria 2017.

