



CONSEJO NACIONAL
**DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**



PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA



Automatización de una técnica molecular para tipificación de *Staphylococcus aureus* de aislados nosocomiales de población pediátrica

Fátima Rodríguez


Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UNA

PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2015 – PINV 15.101 – Modalidad CTS

S. aureus como amenaza a nivel mundial

- **CDC: NIVEL DE AMENAZA SERIA**
SARM: 5 - 53 millones de casos por año
- 80.000 infecciones Invasivas → **11.000 muertes**


Fuente: CDC.gov. 2013 (Center for Disease Control and Prevention)



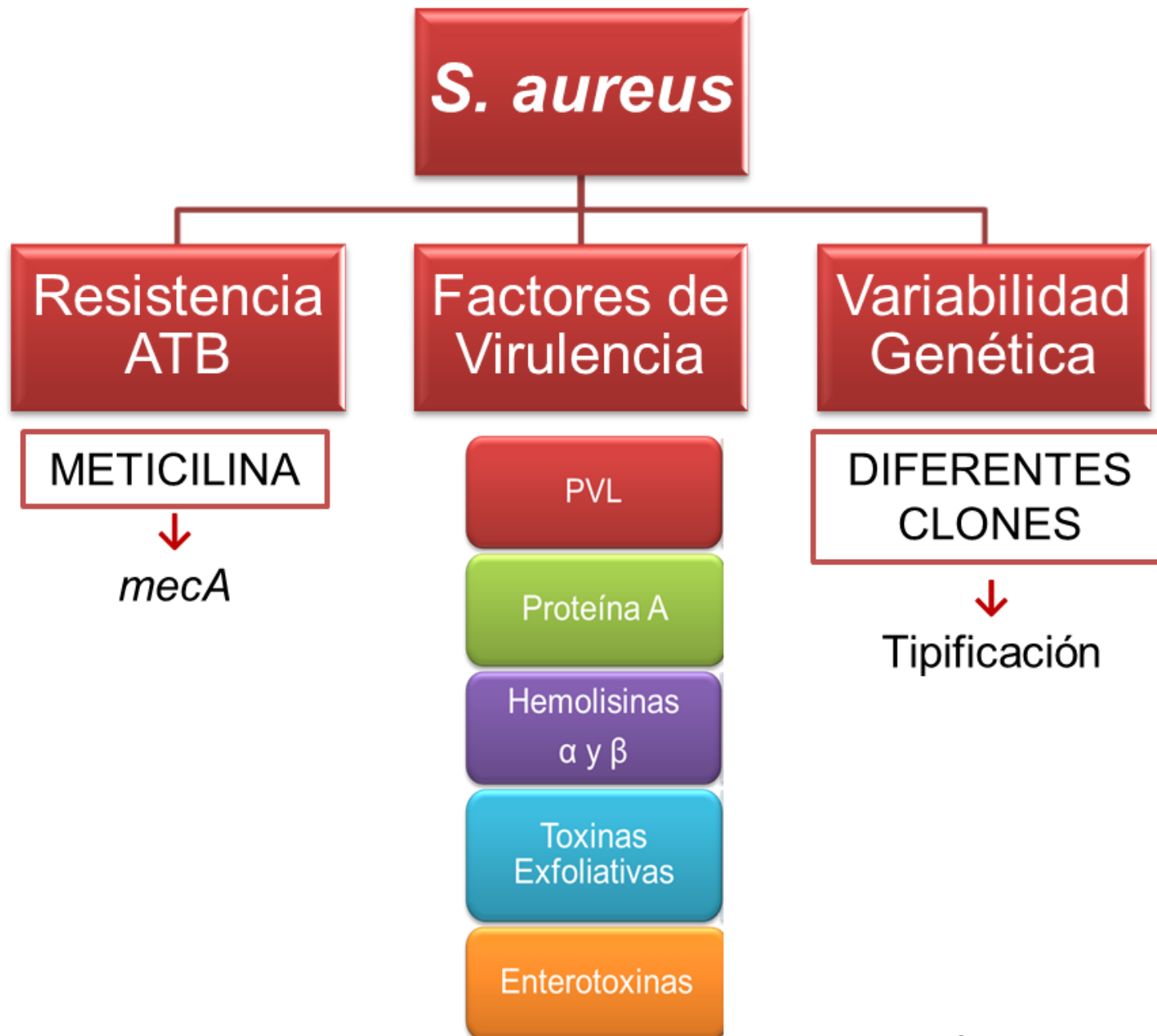
- causa una multitud de infecciones con un amplio rango de severidad



- infecciones cutáneas leves
- intoxicaciones alimentarias



- neumonía necrotizante, síndrome del shock tóxico, meningitis, endocarditis, osteomielitis y septicemia.



Tipificación de *S. aureus*

Identificación de clones

- Detectar existencia de un brote y su expansión
- Método o el origen de transmisión del clon
- Establecer medidas de control (prevenir o frenar la propagación)

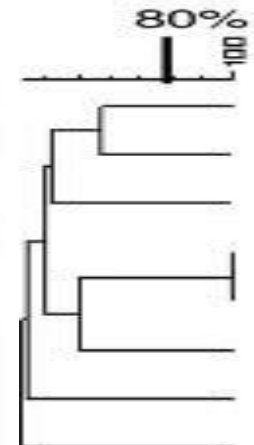
MLVA

- Análisis de múltiples loci VNTR
- Perfil electroforético de bandas → Código de barras

Herramientas Moleculares

- MLST
- *spA typing*
- PFGE
- **MLVA**

MLVA



ANTECEDENTES A NIVEL PAÍS

- **2009:** Brote grave causado por *S. aureus*; intoxicación por consumo de leche ultrapasteurizada contaminada. Resultaron intoxicadas 400 personas,
60 requirieron hospitalización, 1 óbito lactante menor. Weiler y col 2011
- **2013:** Estudios epidemiológicos reportan incrementos en las infecciones causadas por SARM-AC Guillén y col 2016
- **2015:** Implementación exitosa de MLVA manual con resultados comparativos al PGFE, analizando aislamientos SARM-AC Rodríguez y col 2017

Factibilidad MLVA manual: Buen rendimiento, **nº limitado de aislados**

OBJETIVOS

- **General**
 - Automatización de una técnica molecular para tipificación de *Staphylococcus aureus* de aislados nosocomiales de población pediátrica
- **Específicos**
 - Automatizar la metodología para tipificación de *S. aureus*, empleando cepas de referencia.
 - Aplicar la metodología de tipificación automatizada para análisis de variabilidad genética de aislados de *S. aureus* obtenidos de población pediátrica nosocomial.

AUTOMATIZACIÓN MLVA

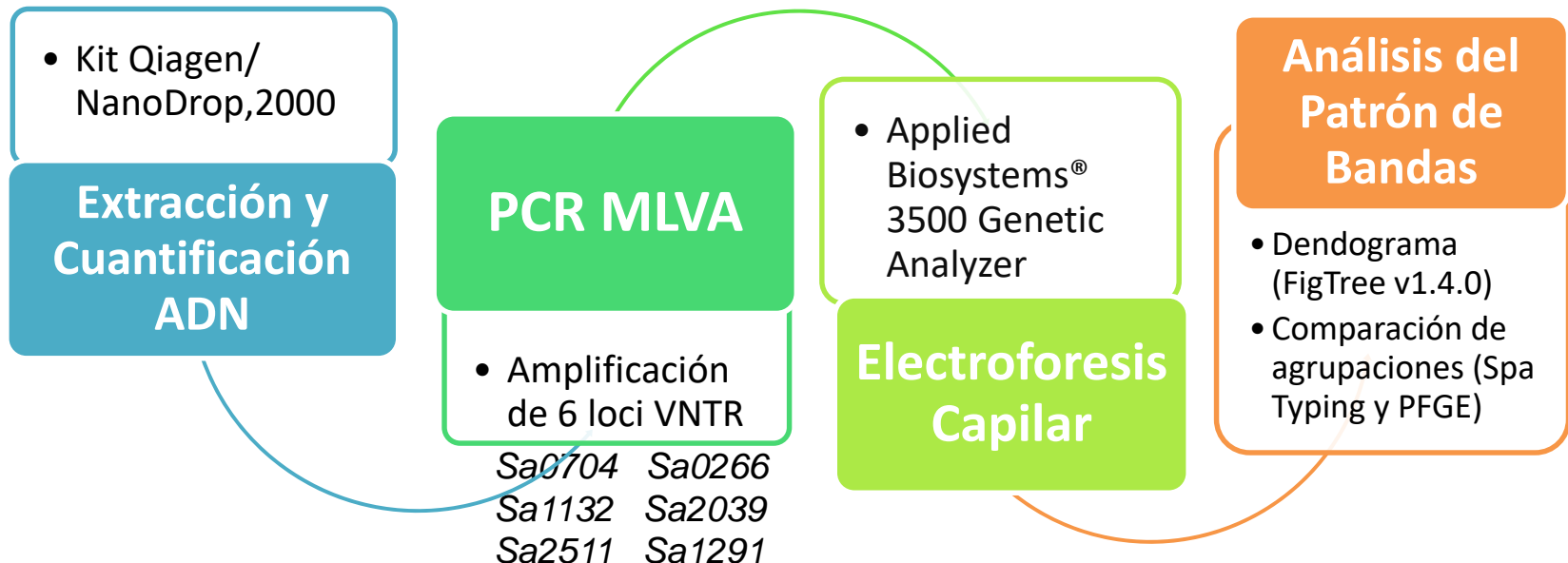
Diseño: Observacional descriptivo de corte transverso

Aprobación de comité científico y de ética IICS (P15/2015)

13 aislamientos *S. aureus*
→ infecciones de niños hospitalizados en el **2013**

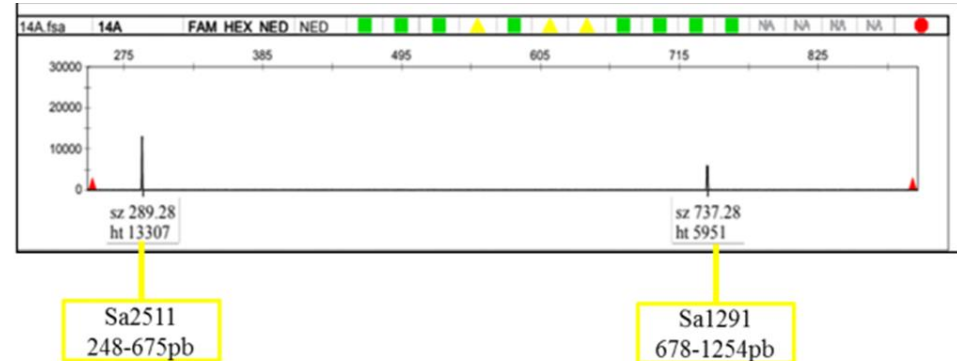
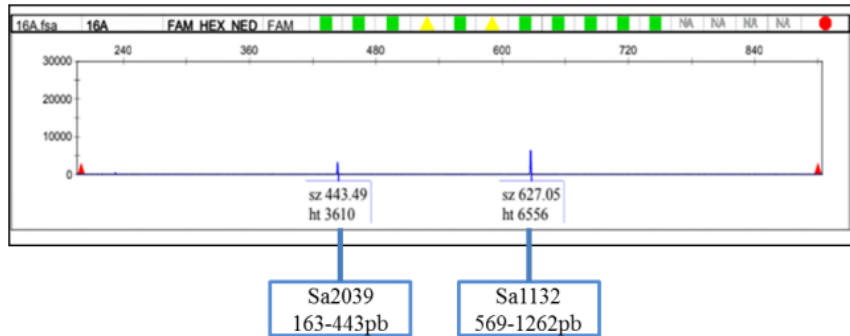
→ BIOBANCO del IICS →

Niños 0 y 18 años con ficha médica y antibiograma (VITEK)

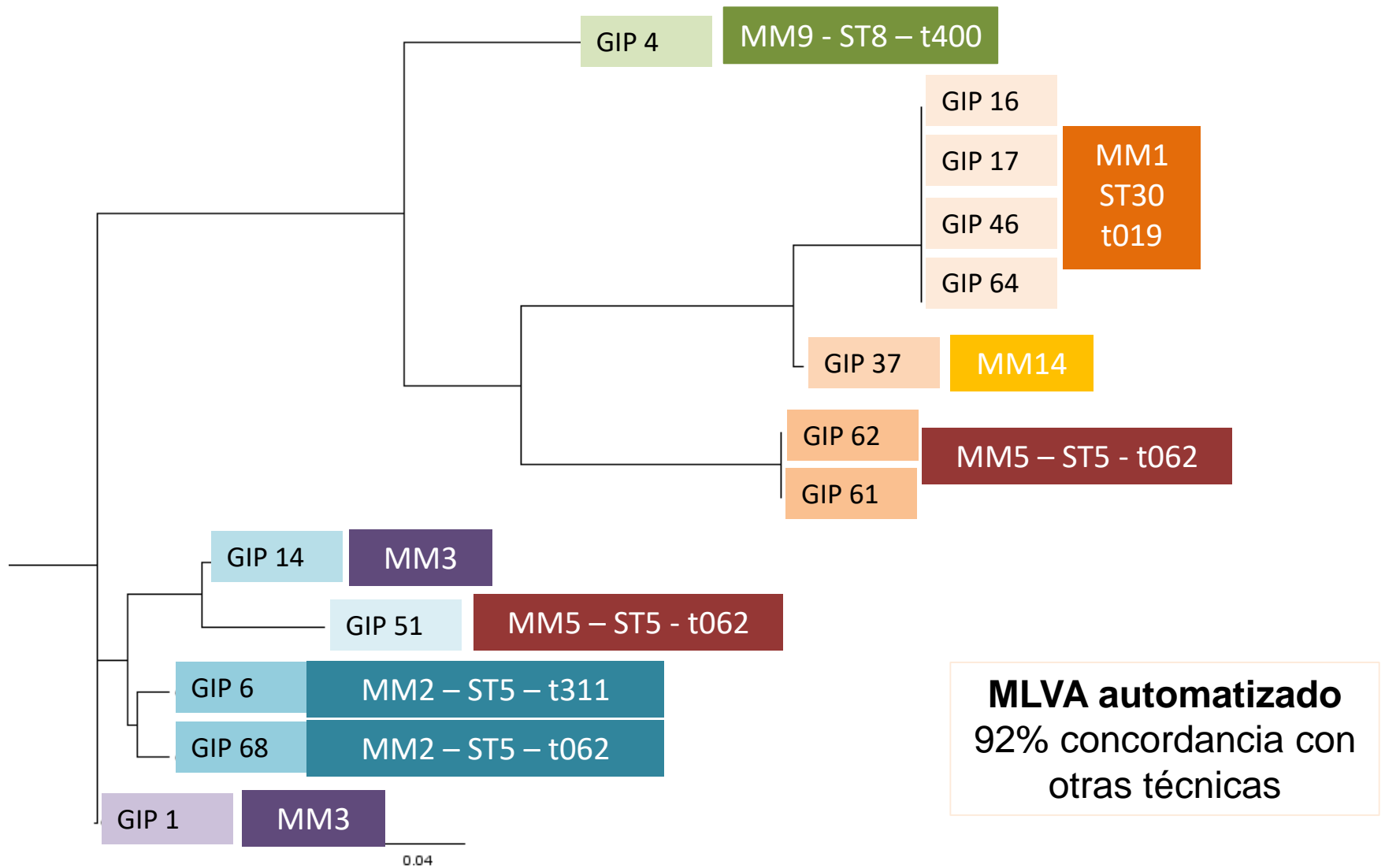


AUTOMATIZACIÓN MLVA

Análisis automatizado de fragmentos



- Se logró de manera óptima en el 100% (n=13) de los *S. aureus*, la determinación de perfiles alélicos por MLVA automatizado de forma concordante con otros estudios de tipificación MLVA convencional , *Spa typing* y PFGE
- El tiempo para la obtención de los patrones de bandas fue mucho menor que en el formato manual , ↑↑ la eficiencia en el tiempo de respuesta.



↑↑ Variabilidad genética de clones circulantes, caracterización específica en un futuro próximo

ST30-t019

en varios países de la región



susceptible a
no β -lactámicos

Causa frecuente
de abscesos
severos

- En Uruguay se reportó un 92% de aislamientos SARM pertenecientes a este clon (2014)
- En Argentina dicho clon fue reportado en el 45% de aislamientos SARM (2011)

En Sudamérica es considerado como un clon pandémico → evaluación molecular de distribución de clones en hospitales de América Latina, realizado en el 2001 detectaron este aislado en Chile, Argentina, Colombia y actualmente en **Paraguay**

RESULTADOS DEL PROYECTO 15-101

FASE AUTOMATIZACIÓN (5 CEPAS REFERENCIA, Mín 4)

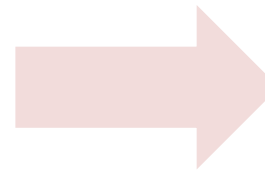
- ✓ Productos de PCR para los 6 (seis) locus MLVA autom
- ✓ Patrones MLVA autom reproducibles
- ✓ Determinación de niveles de concordancia existentes entre el MLVA automatizado, el MLVA convencional, la PFGE, la tipificación del locus Spa y el MLST

FASE ANÁLISIS (13 AISLADOS *S. aureus* NOSOCOMIALES, Mín 10)

- ✓ Aplicación de la metodología MLVA automatizada al análisis de variabilidad genética
- ✓ Análisis de perfiles MLVA autom con softwares específicos y construcción de dendrograma
- ✓ Interpretación epidemiológica de los resultados

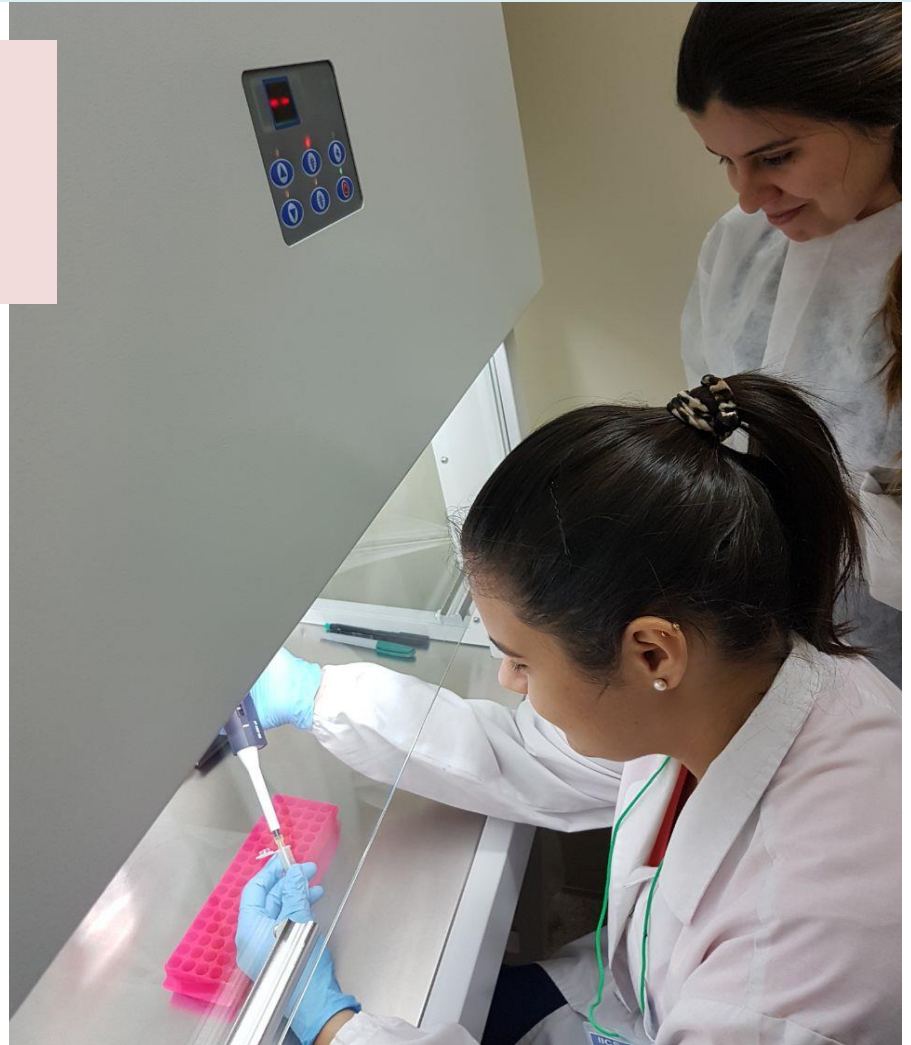
RESULTADOS DEL PROYECTO 15-101

- ✓ 100% Ejecución JULIO 2019 (en plazo y forma)
PINV 15-101 modalidad CTS= 300 millones (CONACYT)
30 millones (IICS)
- ✓ 100% Objetivos logrados
- ✓ Adquisición de
Equipo Termociclador Applied
para la Institución



RESULTADOS DEL PROYECTO 15-101

✓ FORMACIÓN DE JÓVENES INVESTIGADORES



RESULTADOS DEL PROYECTO 15-101

✓ 2 Presentaciones a eventos

-Nacional

Infectología 2019

-Internacional

ALAM 2018



RESULTADOS DEL PROYECTO 15-101

✓ Tesis de Grado culminada
2018 → Melisa Florentín



RESULTADOS DEL PROYECTO 15-101

- ✓ Estancia investigación en la DLSP de Uy 2019



RESULTADOS DEL PROYECTO 15-101

✓ Estancia investigación en la DLSP de Uy 2019



Nexos con investigadores de la región para futuras colaboraciones

CONCLUSIONES

- Técnica estandarizada y disponible para análisis ante sospechas de brotes por *Staphylococcus aureus*
- Actualmente estamos empleando la técnica MLVA automatizada en otros 2 proyectos: Análisis de SARM invasivas y Análisis de SARM-AC
- Ventajas:
 - ✓ Fácil ejecución;
 - ✓ Altamente reproducible y sensible;
 - ✓ Comparable al PFGE

CONCLUSIONES

- Los aislamientos de *S. aureus* relacionado al clon ST30-t019 son el grupo mayoritario causante de infecciones estafilocócicas → instauración exitosa de dicho clon en la comunidad.
- El éxito en la propagación de este clon podría deberse a una ventaja adaptativa que permita desplazar a los demás clones
- La presencia en baja frecuencia de aislamientos presentes en los demás perfiles hace que los mismos sean considerados como esporádicos

AGRADECIMIENTOS

Equipo de Investigación:

Dra. Rosa Guillén,

Bioquímicas: Claudia Salinas, Patricia Acuña y Melisa Florentín

Miembros del "Grupo de estudio de *S. aureus*"

Dra. Ana Campuzano y Dra. Juana Ortellado de Canese del ***Hospital de Clínicas-Facultad de Ciencias Médicas, UNA;***

Dra. Wilma Basualdo†, Dra. Beatriz Quiñónez† y Dra. Noemí Zárate del ***Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, MSP y BS;***

Dr. Héctor Castro, Dra. Mónica Rodríguez, Dra. Gladys Velázquez y Dra. Carmen Espínola del ***Hospital Central del Instituto de Previsión Social.***