

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE DOS CLONES DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA DE GENOTIPO COMUNITARIO (SARM-GC) DE CIRCULACIÓN EN COLOMBIA**

**Presentado por:**

James A. Anchico Godoy  
Mario A. Laurens Hernandez

*Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar por el título de:*

**Bacteriólogo y laboratorista clínico**

**Asesor Externo:**

**Betsy Esperanza Castro Cardozo PhD (c) MSc**

Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana- Universidad El Bosque

**Asesor Interno:**

**Liliana Constanza Muñoz MSc**

Docente investigadora- Laboratorio de Biotecnología, UCMC

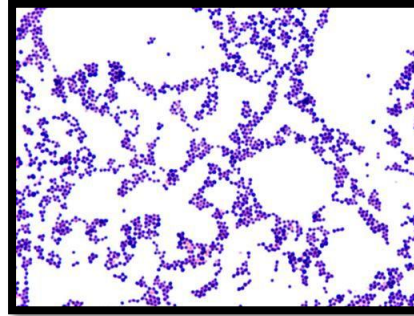


# INTRODUCCION

*Staphylococcus aureus*



Según El **GREBO**



- Bacteria Gram positiva.
- Inmóviles.
- Anaerobios facultativos.
- Las infecciones por *S. aureus* son de alto impacto a nivel intrahospitalario.

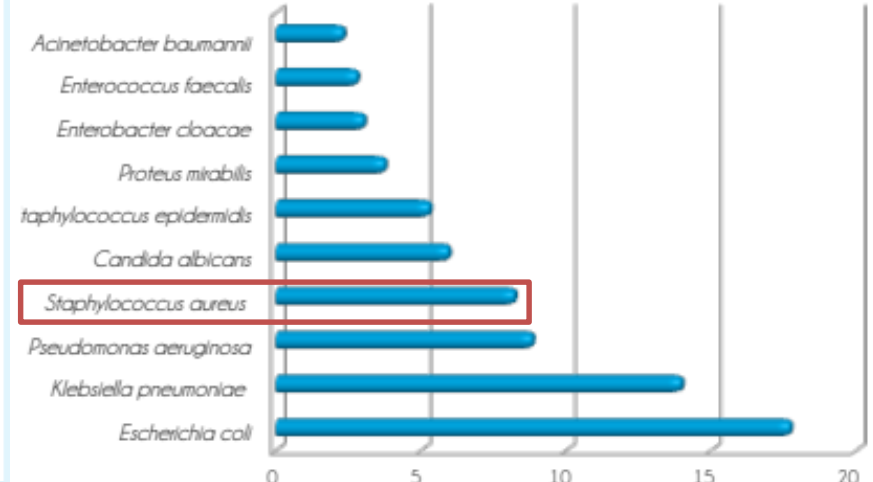
Boletín epidemiológico  
2014-2015

# Frecuencia de *Staphylococcus aureus* en la población adulta y pediátrica en los servicios de UCI y Hospitalización- GREBO, Año 2015.

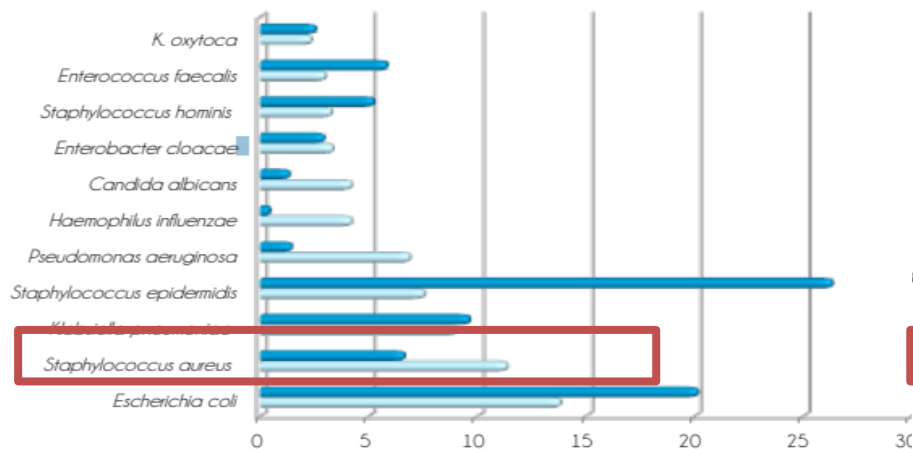
## Frecuencia de microorganismos en Hospitalización adultos. Año 2015



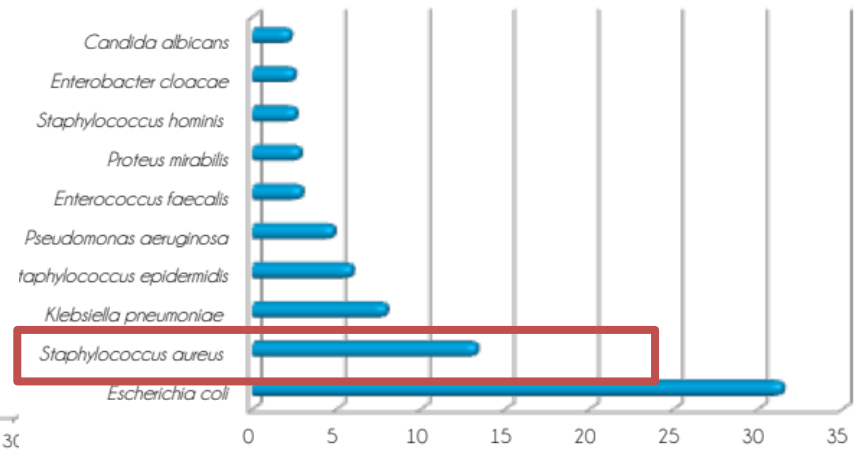
## Frecuencia de microorganismos en UCI adultos. Año 2015

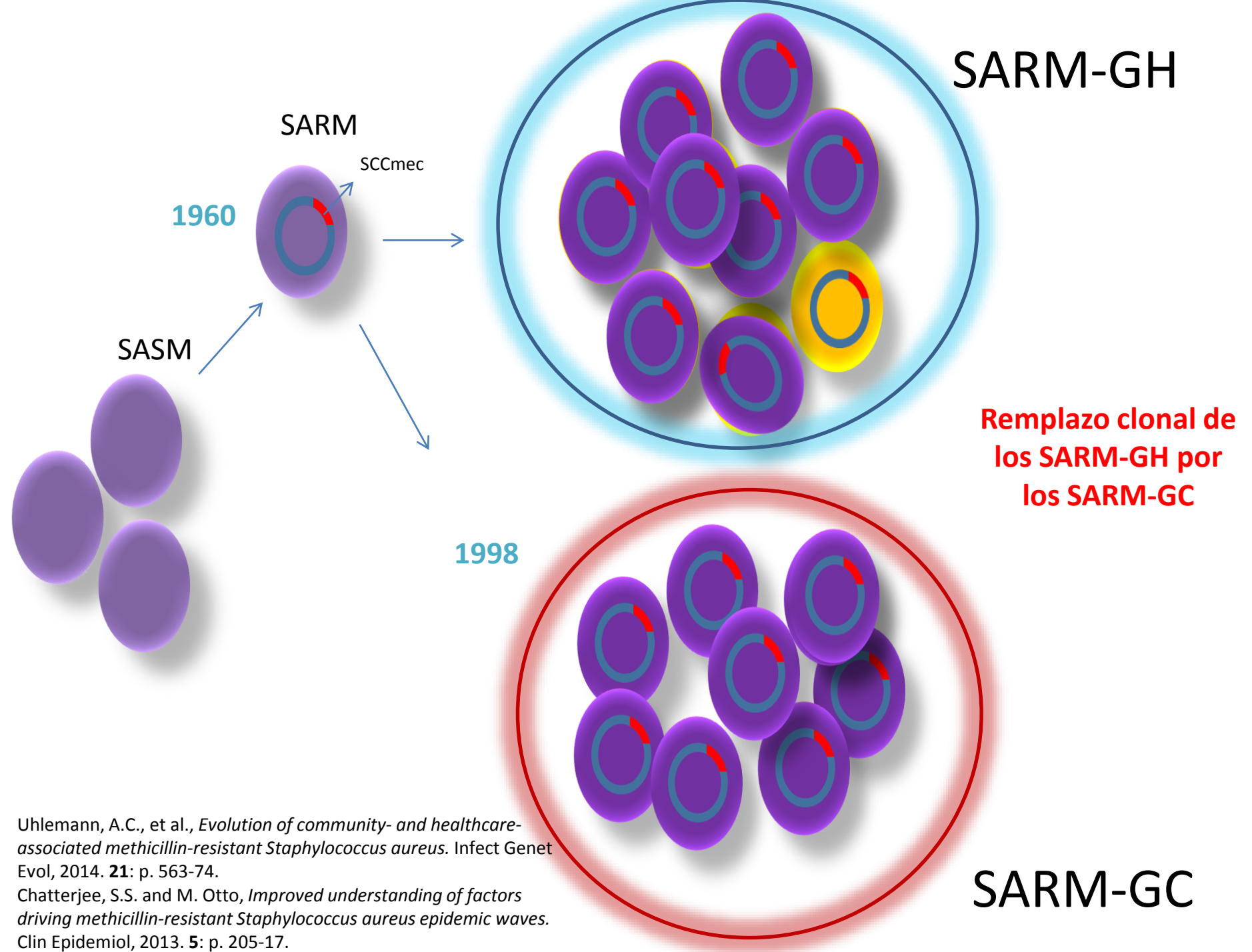


## Frecuencia microorganismos UCI pediátrica y neonatal. Año 2015



## Frecuencia de microorganismos en Hospitalización pediátrica. Año 2015

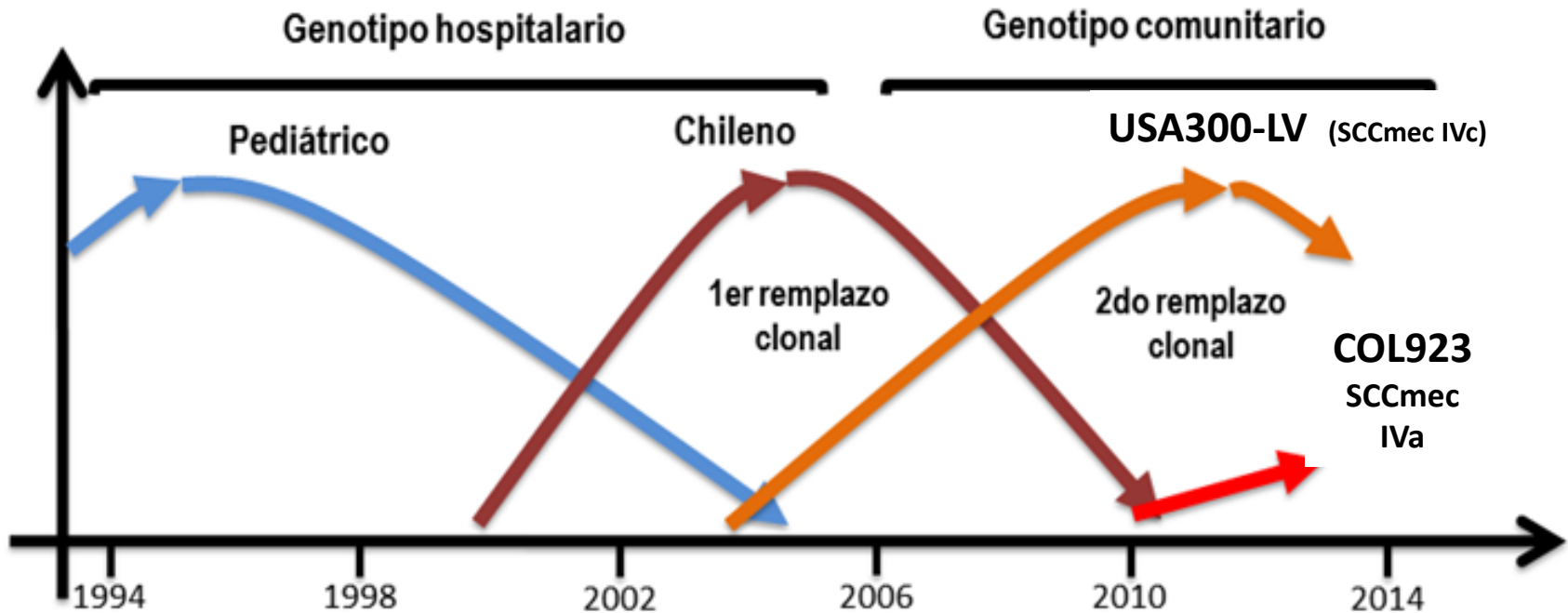




Uhlemann, A.C., et al., *Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 563-74.

Chatterjee, S.S. and M. Otto, *Improved understanding of factors driving methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic waves*. Clin Epidemiol, 2013. **5**: p. 205-17.

# Epidemiología de SARM en Colombia



Pulsotipo PFGE	Clon	SCCmec	ST	spa	LukF/S-PV
	<b>COL923</b>	IVa	923	t1635	+
	<b>USA300-LV</b>	IVc	8	t008	+
	<b>Chileno</b>	I	5	t149	-
	<b>Pedriático</b>	IV	5	t311	-

Alvarez, C.A., et al., *Community-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Colombia*. Emerging Infectious Diseases, 2006. **12**(12): p. 2000-2001.  
 Marquez-Ortiz, R.A., et al., *USA300-related methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone is the predominant cause of community and hospital MRSA infections in Colombian children*. Int J Infect Dis, 2014. **25**: p. 88-93. Escobar-Perez, J., et al., *Emergence and spread of a new community-genotype methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone in Colombia*. BMC Infect Dis. 2017. **17**(1): p. 108

# Relación genómica de los clones de SARM-GC de circulación en Colombia y el clon USA300.

**USA300-LV**



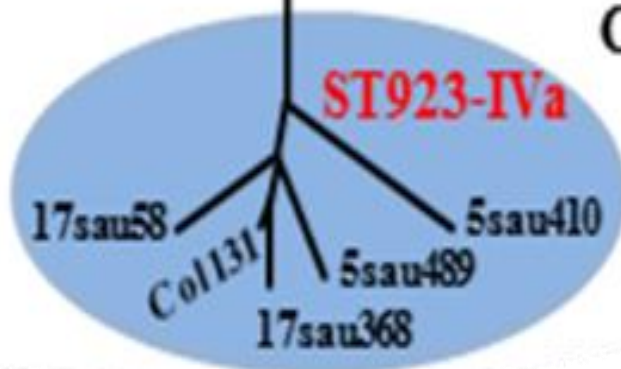
Existen diferencias genéticas entre los clones de SARM-GC que circulan en Colombia

USA300

Clon pandémico de distribución mundial

NCTC8325

**COL923**



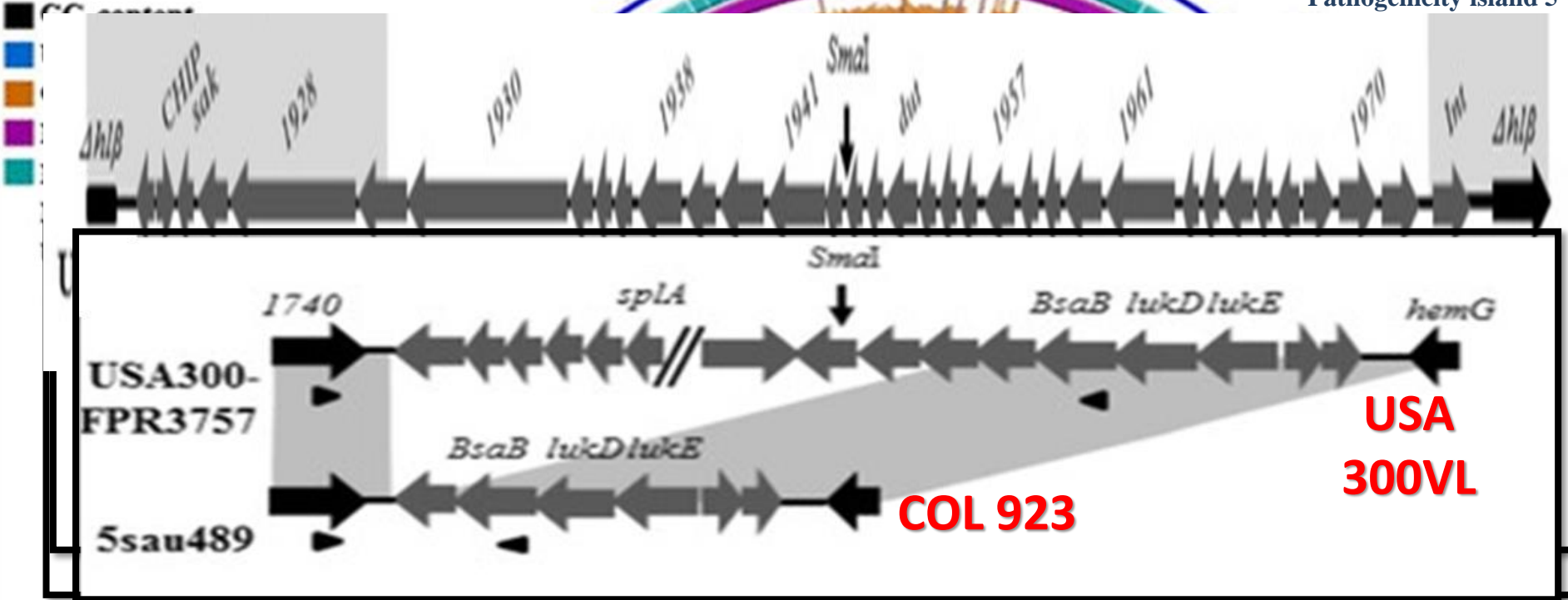
Clade 2

— 2.0E-5

# Relación genómica de los clones de SARM-GC de circulación en Colombia y el clon USA300.

SCCmec (mecA) → ACME (Operon arc, opp)

Pathogenicity island 5



Genomic islan β (vSAβ) (Operon *BsaB*)

Prophage 2 (lukF/S-PV)

# Pregunta Problema

¿Los principales clones de SARM-GC como USA300-VL y COL923 de circulación en Colombia presentan diferencias genéticas que permiten su clasificación por medio PCR?





# Objetivos

## General:

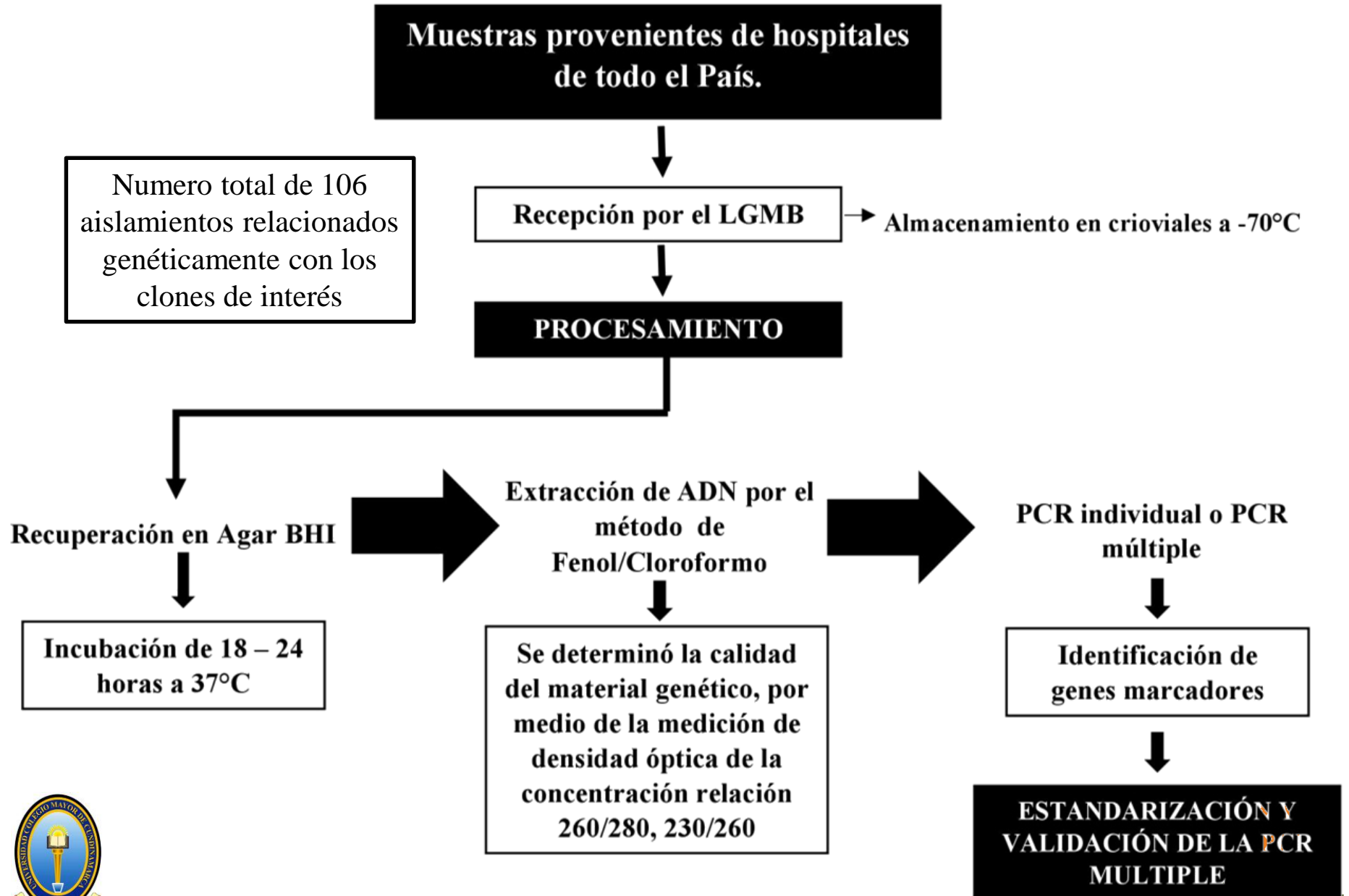
Estandarizar una herramienta molecular que permita la rápida identificación y diferenciación de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina de Genotipo Comunitario (SARM-GC) pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL de circulación en Colombia.

## Específicos:

- Determinar las condiciones óptimas de amplificación de los genes marcadores para cada los clones COL923 y USA300-VL de circulación en Colombia por medio de una PCR múltiple.
- Comparar frecuencia de los Elementos Genéticos Móviles presentes en aislamientos clínicos de SARM-GC pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL, por PCR múltiple y amplificación individual.



# Metodología



# Metodología

## ESTANDARIZACIÓN

Concentración de ADN de las muestras

Se trabajó con una concentración inicial de ADN estándar de 100 ng/uL, tomando 1 uL para obtener una concentración final de 0,5 ng/uL en una reacción final de 20 uL

Condiciones de los Iniciadores

Temperatura de anillamiento

Para obtener la TM óptima, los iniciadores se sometieron a tres temperaturas de anillamiento diferentes (50, 55 y 65°C)

Concentración al final de la reacción de PCR

Los iniciadores se sometieron de manera individual a concentraciones finales de 0,8µM – 0,6µM - 0,4µM – 0,2µM; hallando la concentración óptima de cada iniciador.

Digestión del gen *yqiL*

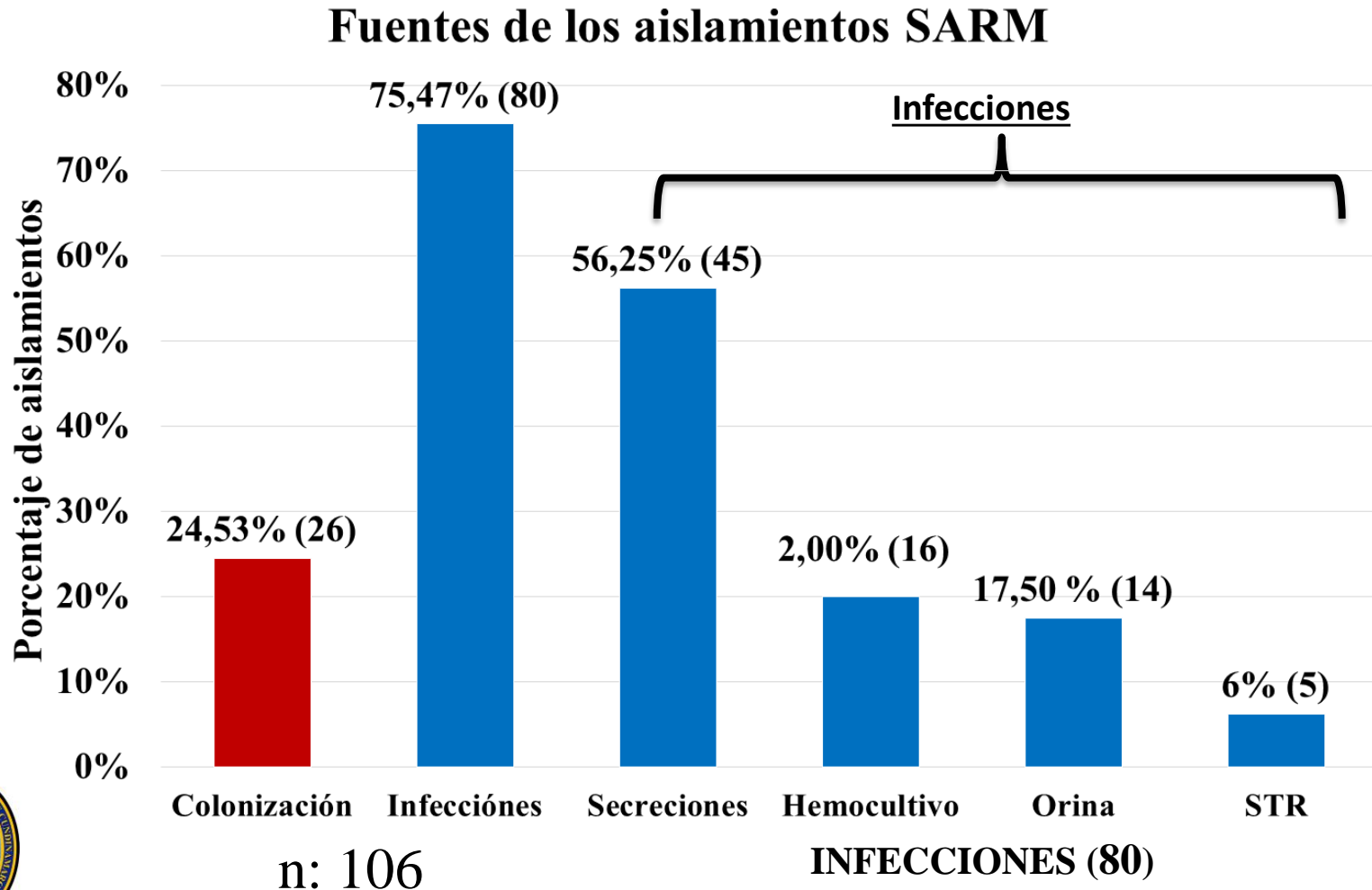
Se evaluaron las cantidades de enzima *NdeI* necesarias para la Digestión expresado en Unidades de enzima (5U, 10U, 15U) a diferentes tiempos de incubación (2, 6 y 12 horas)

Amplificación de 6 genes



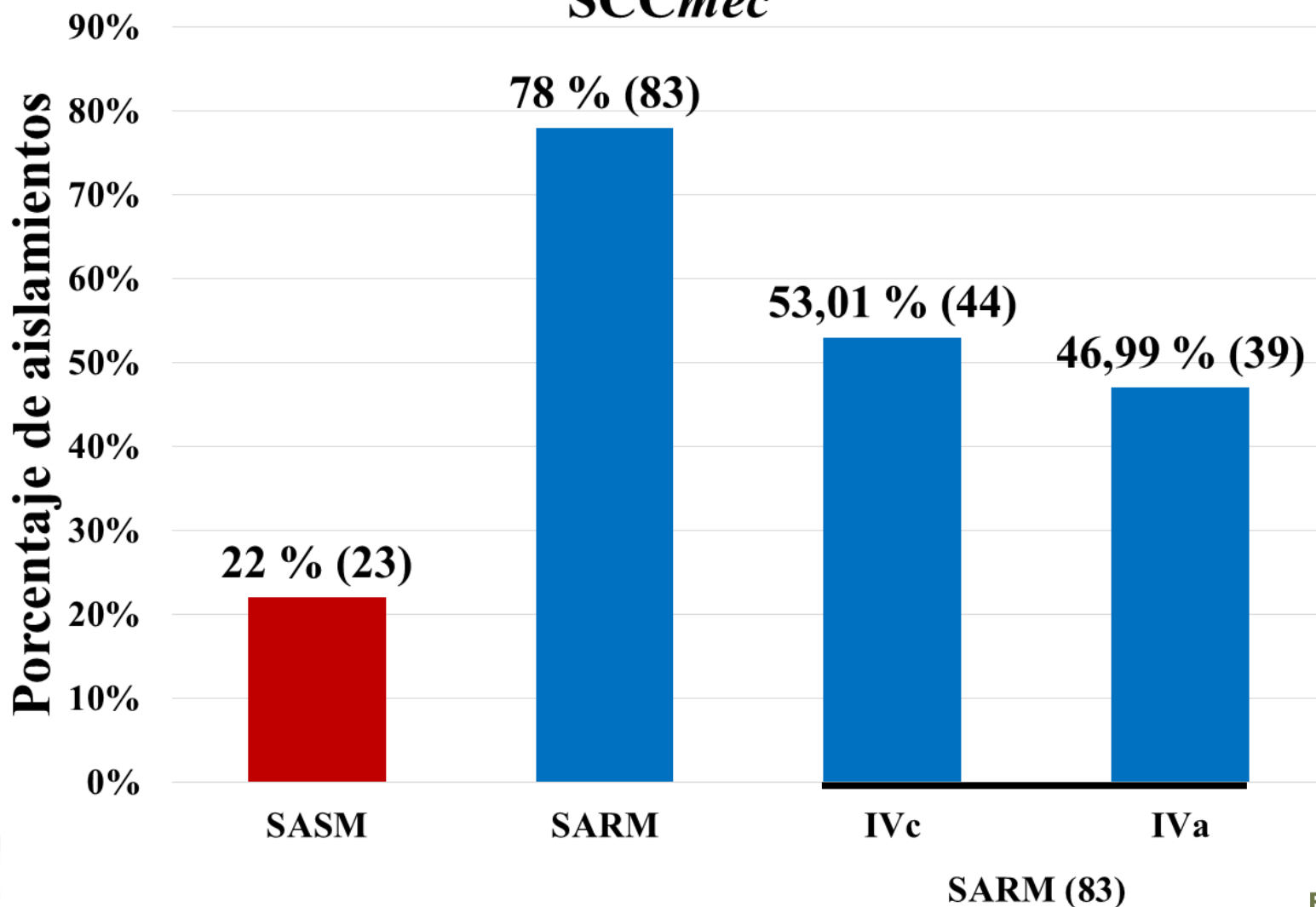
# Resultados: Caracterización de los aislamientos

Fuentes de infección de los aislamientos evaluados:



# Resultados: Caracterización de los aislamientos

## Clasificación de los aislamientos por el *SCCmec*



# RESULTADOS

1. Determinar las condiciones óptimas de amplificación de los genes marcadores para cada los clones COL923 y USA300-VL de circulación en Colombia por medio de una PCR múltiple.



# Resultados: Estandarización PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia.

**Determinación de la concentración adecuada de cada uno de los iniciadores de la PCR múltiple.**

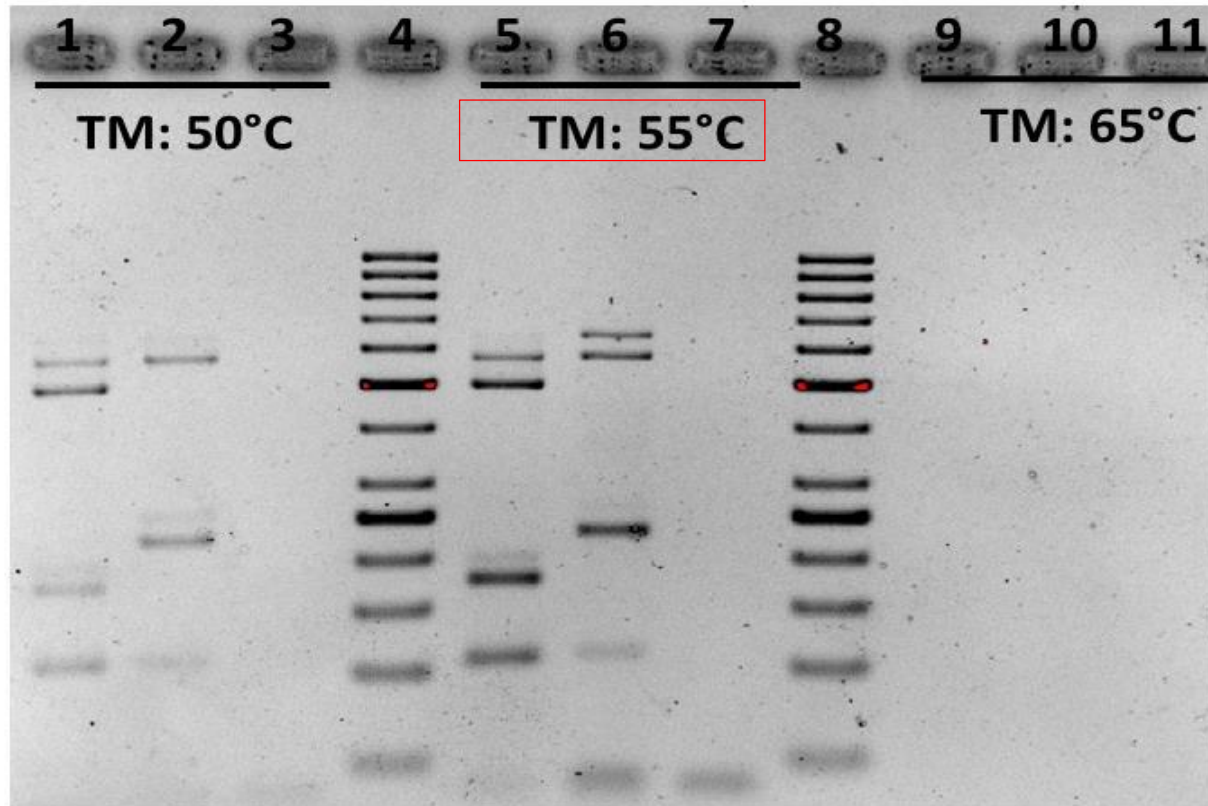
Primer	Gen	Pb	0,8 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	CN
GP 433	<i>B- Island</i>	631					
GP 529							
GP 534	<i>yqiL</i>	549					
GP 535							
GP 532	<i>Prophage 3 (Vlc)</i>	490					
GP 533							
GP 530	<i>Prophage 3 (ST923)</i>	350					
GP 531							
GP 429	<i>SAPI 5</i>	225					
GP 430		174					
GP 193	<i>ccrB (Control Interno)</i>	105					
GP 536							

**Determinación de la concentración adecuada de cada uno de los iniciadores de la PCR múltiple.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para el análisis y determinación de la concentración en la reacción de PCR de cada uno de los iniciadores.



**Resultados:** Estandarización PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia.

**Determinación de la temperatura de anillamiento de los iniciadores usados en la PCR múltiple**

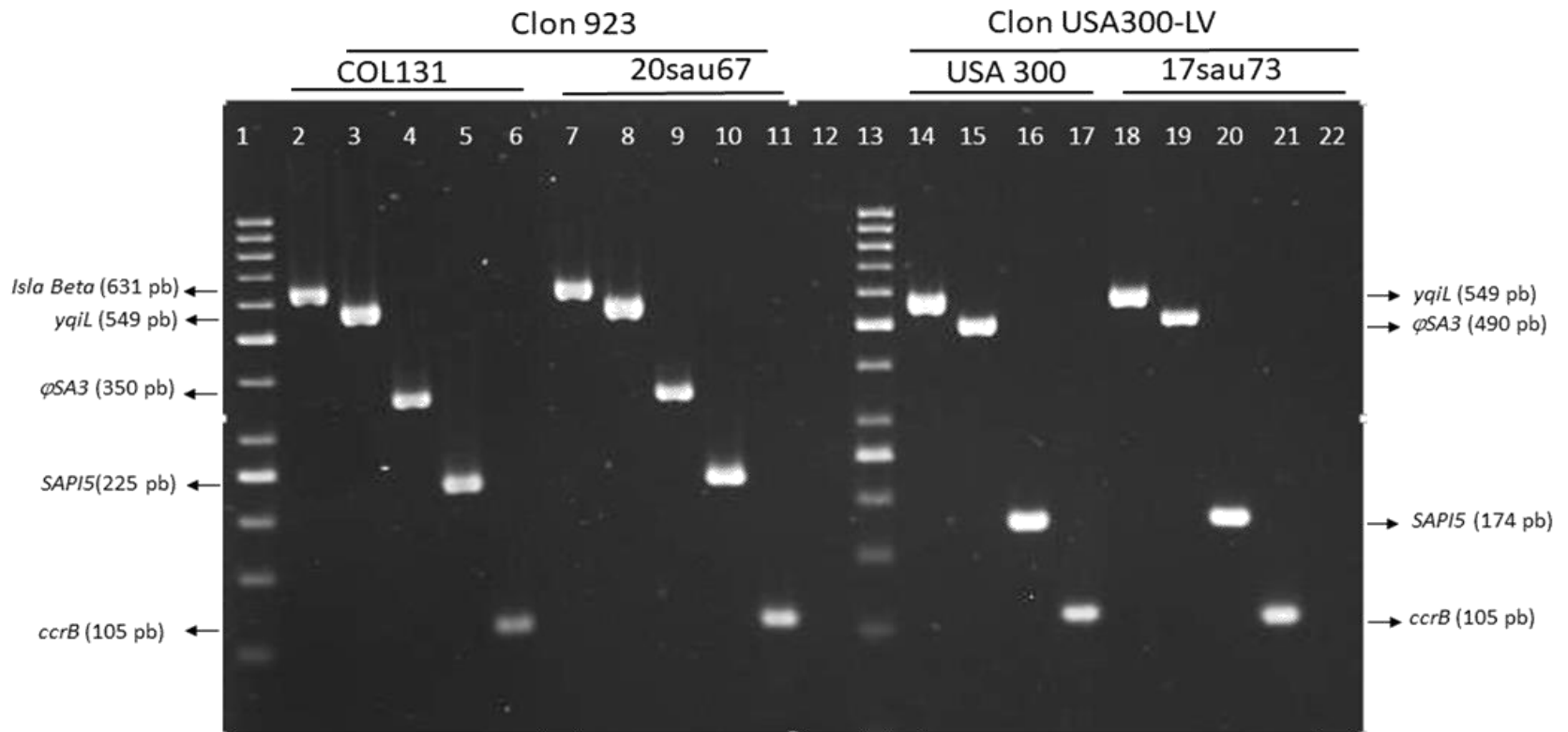


**Determinación de la temperatura de anillamiento de los iniciadores usados en la PCR múltiple.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, para evaluar la temperatura de anillamiento adecuada en la amplificación conjunta de los genes; usando los controles para cada uno de los clones.



# Resultados: Estandarización PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia.

Elementos Genéticos de los Clones 923 y USA300-VL a concentraciones de iniciadores previamente establecidas de manera individual.



Elementos Genéticos de los Clones 923 y USA300-VL a concentraciones de iniciadores previamente establecidas de manera individual. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio para la evidenciar los genes evaluados en la PCR múltiple



**Resultados:** Estandarización PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia.

**Concentraciones de reacción, concentraciones iniciales, volúmenes a tomar en cada uno de los reactivos.**

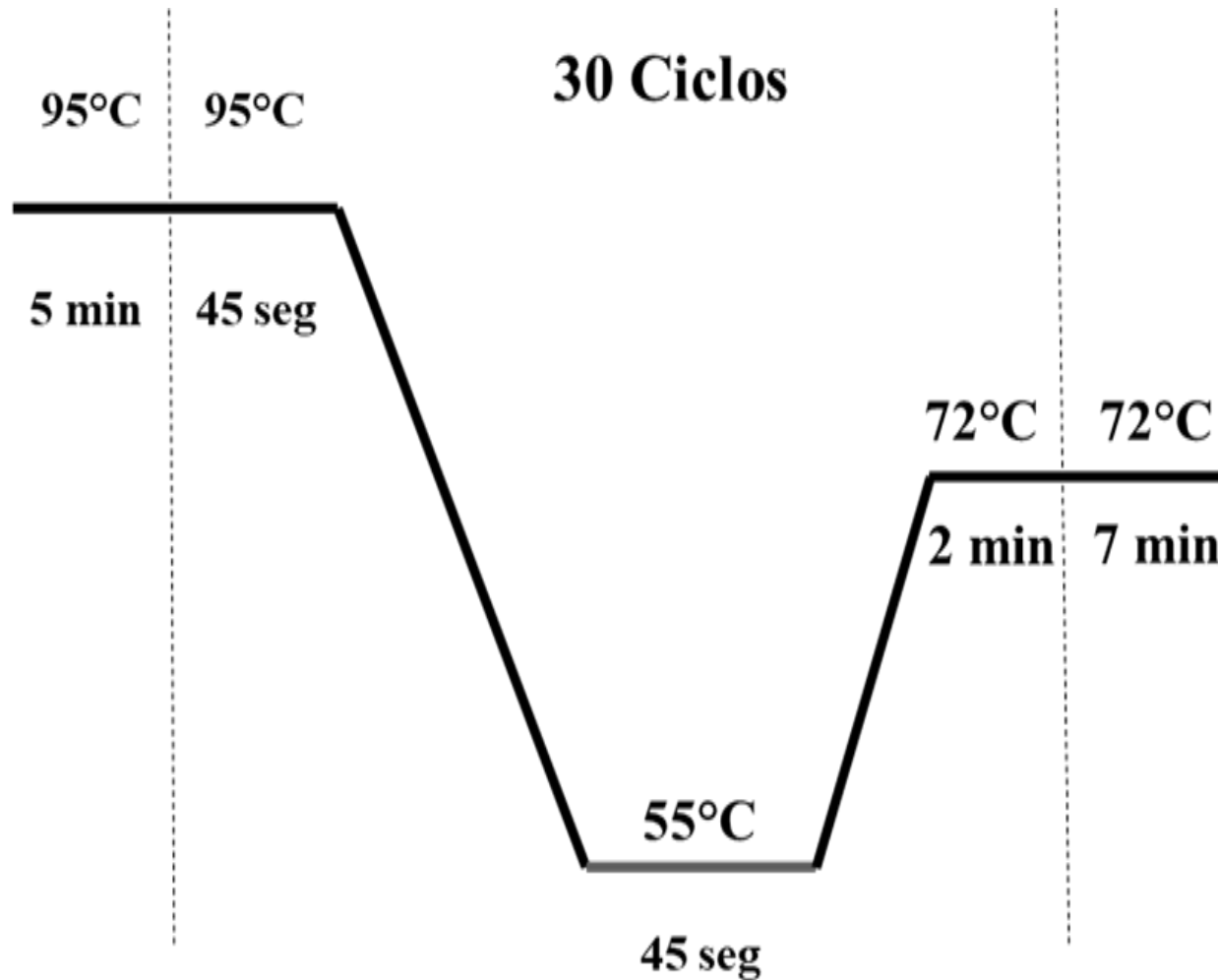
REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN DE LA REACCIÓN	VOLUMEN PARA UNA REACCIÓN
Dream Taq Buffer	10 X	1 X	4 µL
DNTP's	20 µM	0,5 µM	0,4 µL
Dream Taq ADN Polimerasa	5000 U	5 U	0,2 µL
MgCl <sub>2</sub>	20 µM	2 µM	2,4 µL
GP 193 GP 536	16 µM	0,6 µM	0,7 µL
GP 530 GP 531	4 µM	0,2 µM	0,7 µL
GP 429 GP 430	16 µM	0,4 µM	0.5 µL
GP 433 GP 529	8 µM	0,2 µM	0.5 µL
GP 532 GP 533	8 µM	0,4 µM	0.5 µL
GP 534 GP 535	8 µM	0,4 µM	0.5 µL
ADN	100 ng/µL	0,5 ng/µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	-	-	8,6 µL
<b>TOTAL</b>			20 µL

**Concentraciones de reacción, concentraciones iniciales y volúmenes a tomar en cada uno de los reactivos.**



**Resultados:** Estandarización PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia.

## Protocolo de amplificación definido durante la estandarización de la PCR múltiple

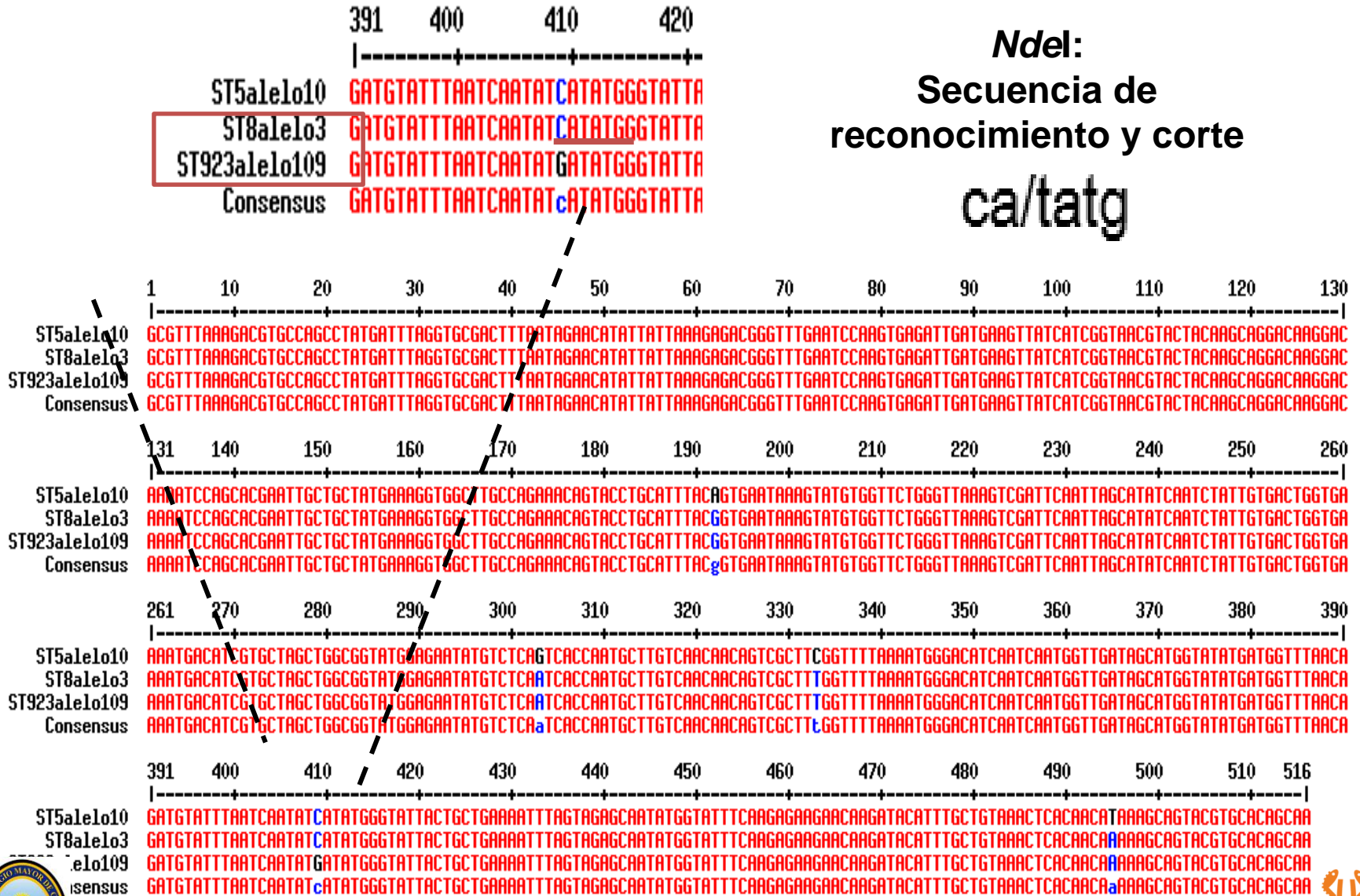


**Ciclo definido de la PCR múltiple**



# Digestión del gen *yqiL* con la enzima NdeI

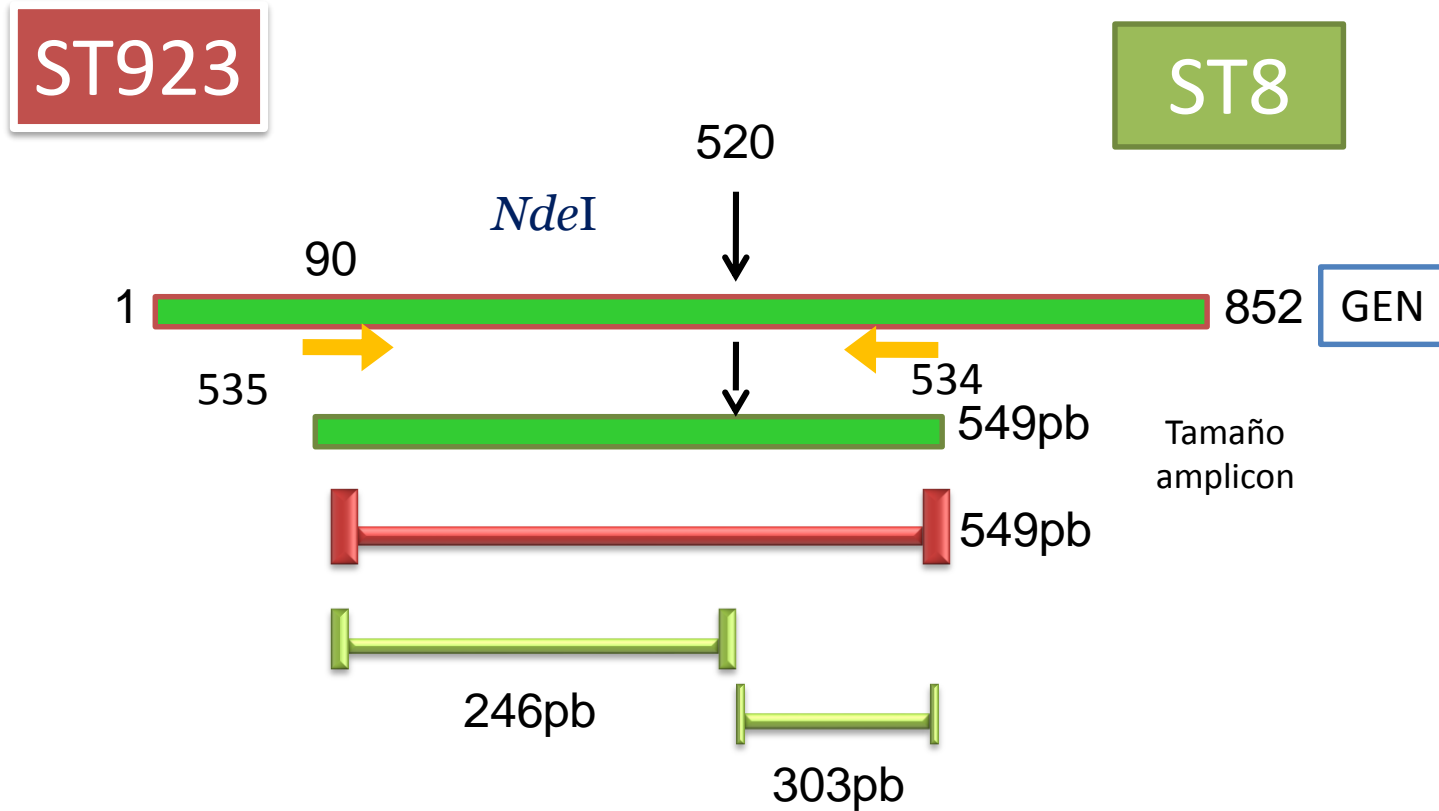
**NdeI:**  
**Secuencia de**  
**reconocimiento y corte**  
**ca/tatg**



Elaborado por Zayda Lorena Corredor Rozo. LGMB- Universidad El Bosque.



# Perfil de digestión para el gen *yqil*:



Elaborado por Zayda Lorena Corredor Rozo. LGMB- Universidad El Bosque.



# Resultados: Estandarización PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia.

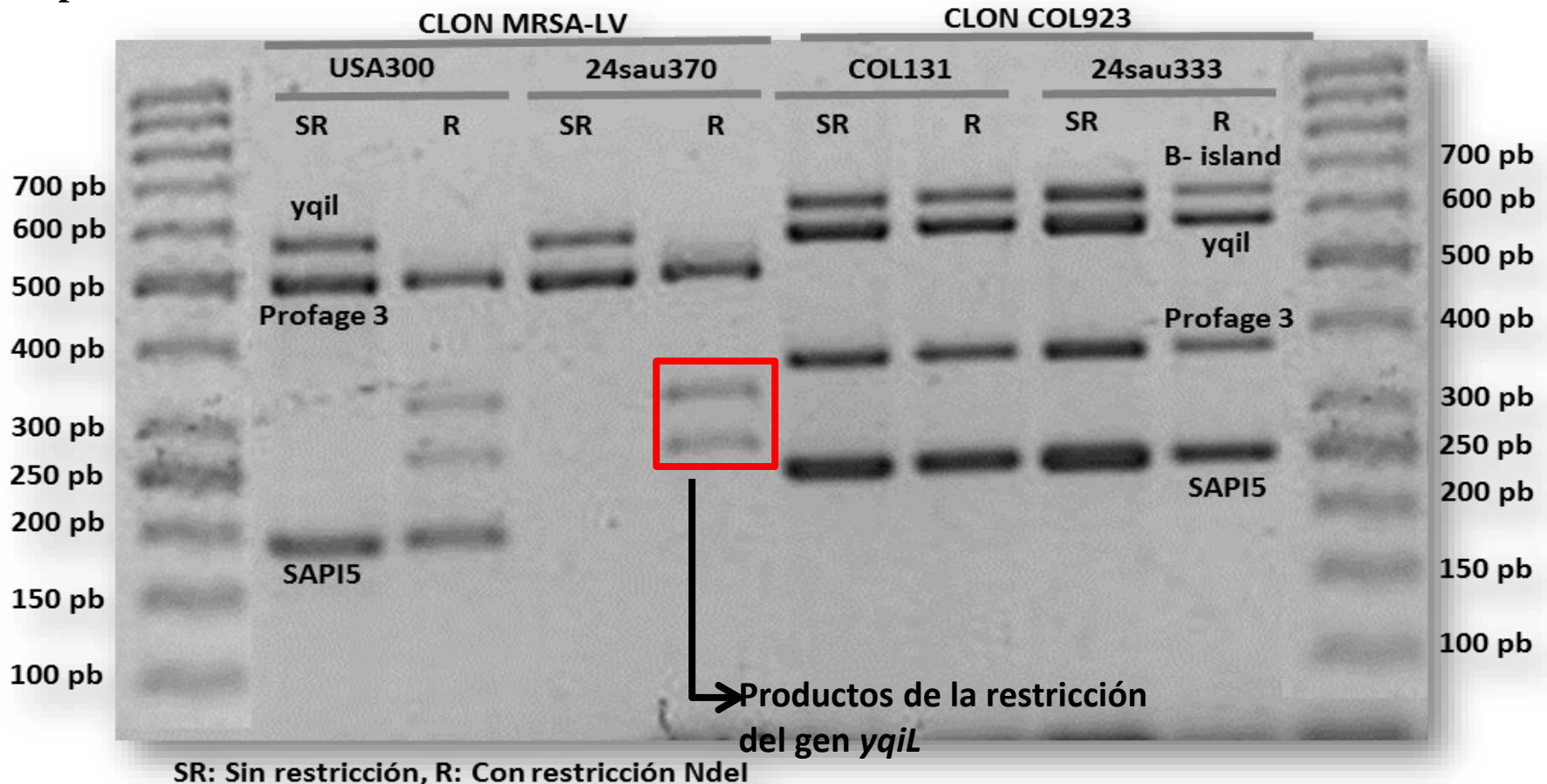
## Estandarización de la Digestión del gen *yqiL* con enzima *NedI*



**Estandarización de la digestión del gen *yqiL* con enzima *NedI*.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio para evidenciar las condiciones establecidas para la restricción. **Del carril 1-3:** concentraciones de enzima (5U-10U-15U) sometidas a 2 horas de incubación. **Carril 4:** MPM 50 pb. **Carril 5-7:** concentraciones de enzima (5U-10U-15U) sometidas a 6 horas de incubación. **Carril 8:** MPM 50 pb. **Carril 9-11:** concentraciones de enzima (5U-10U-15U) sometidas a 12 horas de incubación.

**Resultados:** Estandarización PCR múltiple para la identificación de SARM-GC de circulación en Colombia.

**Aplicación de las condiciones establecidas para la digestión del gen *yqiL* en controles pertenecientes a cada clon.**



**PCR múltiple para la identificación clon COL923 y USA300-VL.** SaPI5: Isla de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*,  $\phi$ SA: Profago 3 de *S. aureus*, vSa $\beta$ : Isla genómica beta *S. aureus* *yqiL*. Acetyl coenzyme A acetyltransferase.



# PROTOCOLO PARA LA DIGESTION DEL GEN *yqiL*



Producto de PCR, obtenido del termociclador



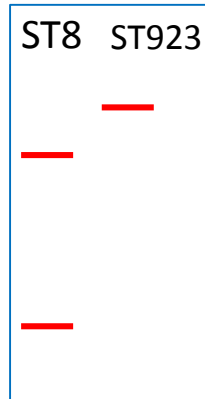
2,5 de *NdeI*  
4 de Buffer  
3,5 H<sub>2</sub>O

Vortex



*NdeI*

Se incubo a 37°C de 6-12 horas





# RESULTADOS

2. Comparar frecuencia de los EGM presentes en aislamientos clínicos de SARM-GC pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL, por PCR múltiple y amplificación individual.

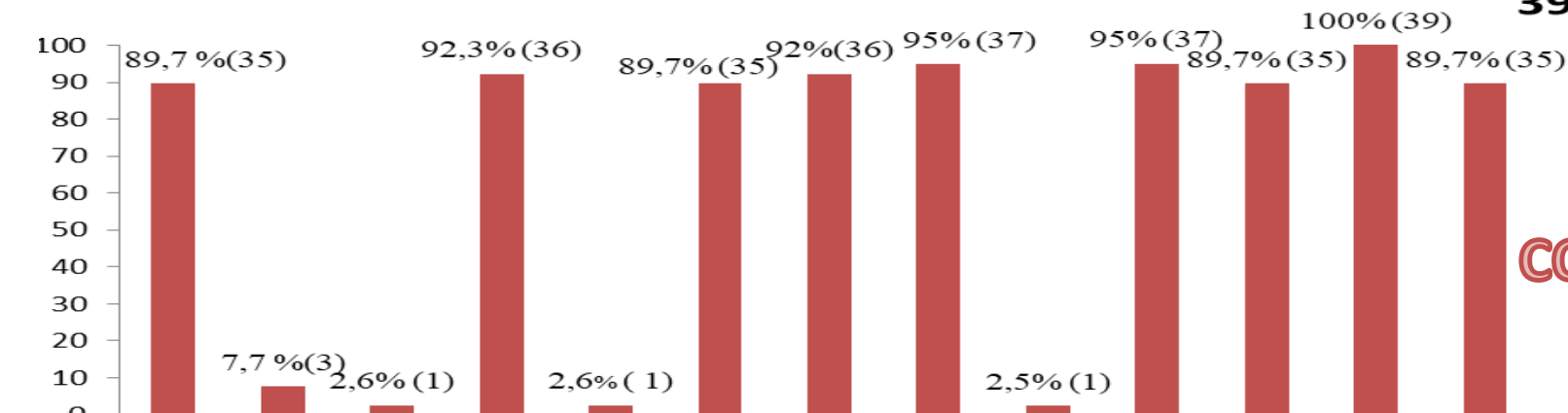


## Frecuencia de los EGM evaluados en los aislamientos relacionados los Clones de SARM-GC

IVa:  
39

COL 923

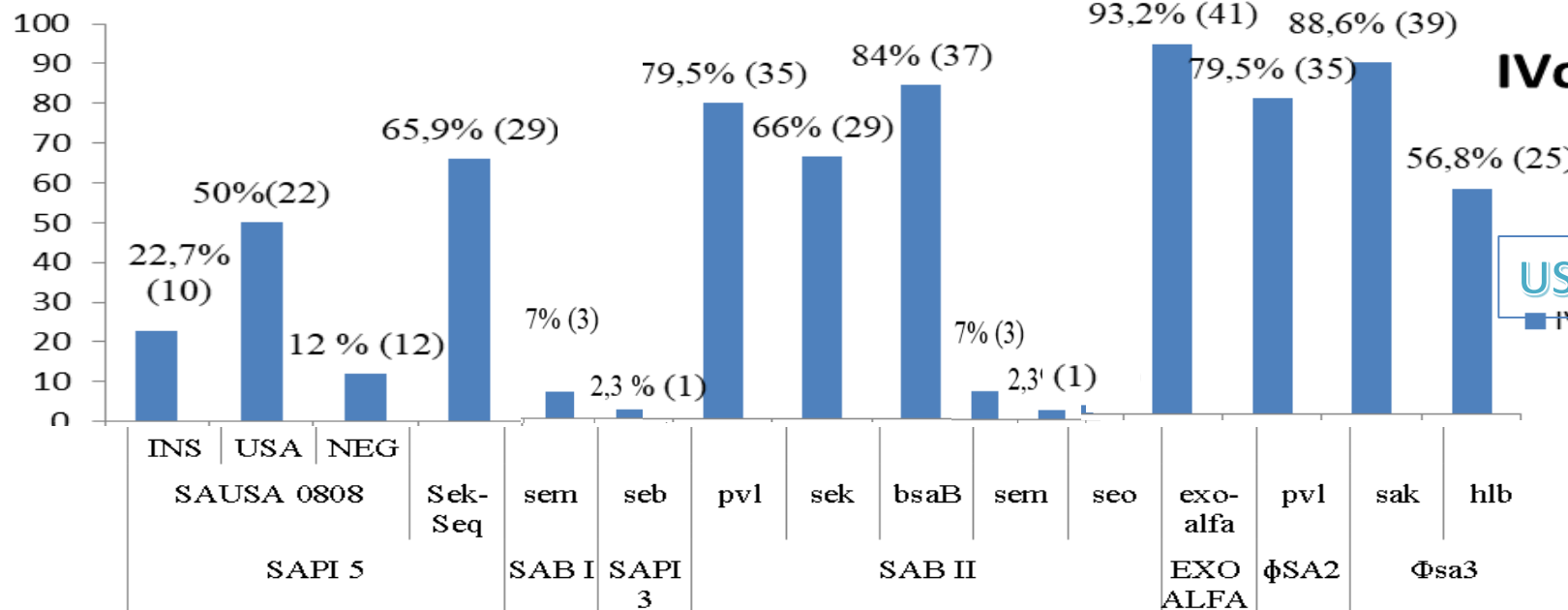
■ IVa



IVc:44

USA 300VL

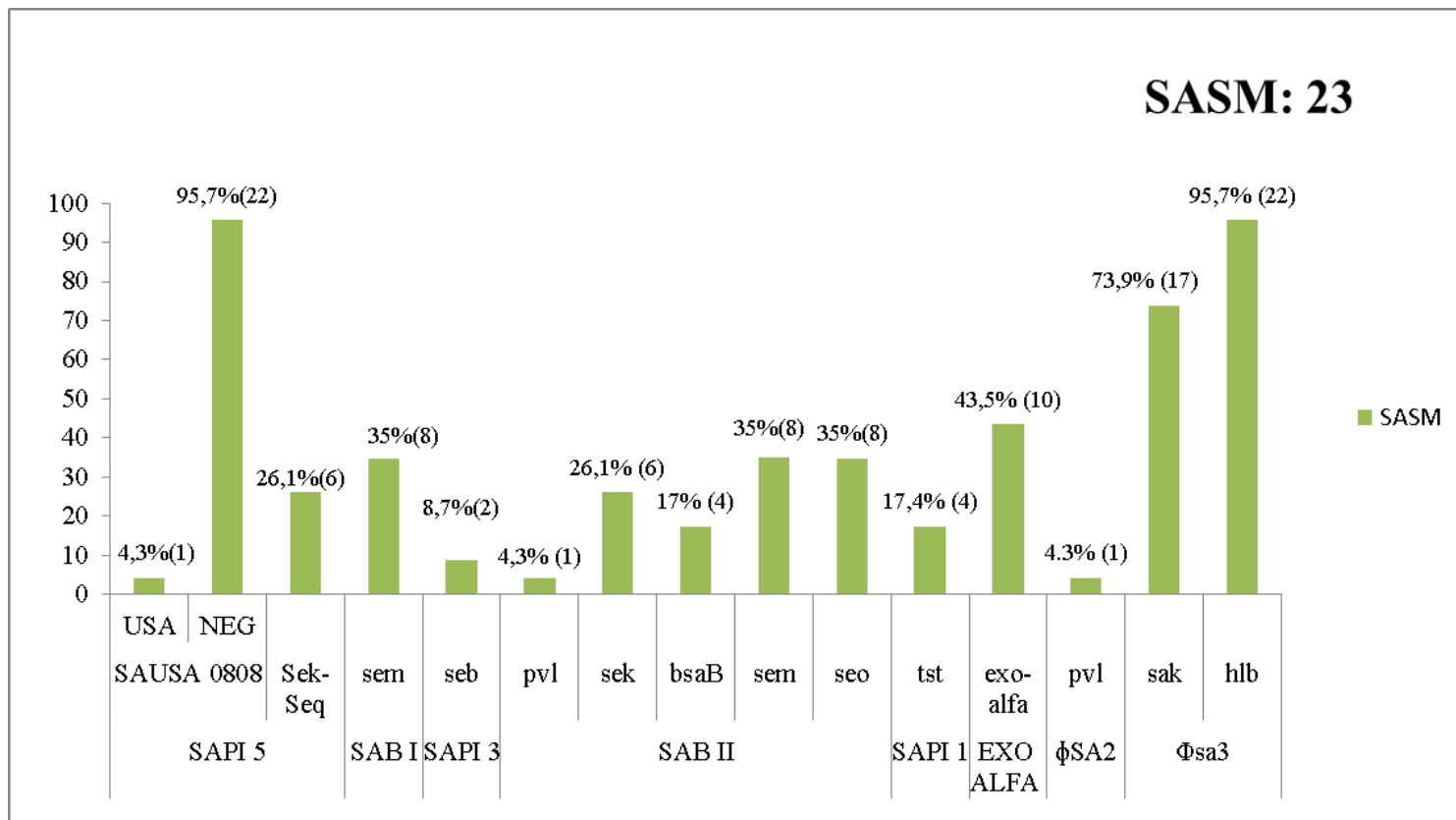
■ IVc



**Elementos Genéticos Móviles.** Se observan todos los elementos genéticos móviles evaluados en las tres poblaciones pertenecientes al estudio; con diferencias significativas en SAPI 5 y  $\phi$ 3 en los aislamientos resistentes a meticilina VIa y VIc; en cuanto a su frecuencia y características genéticas



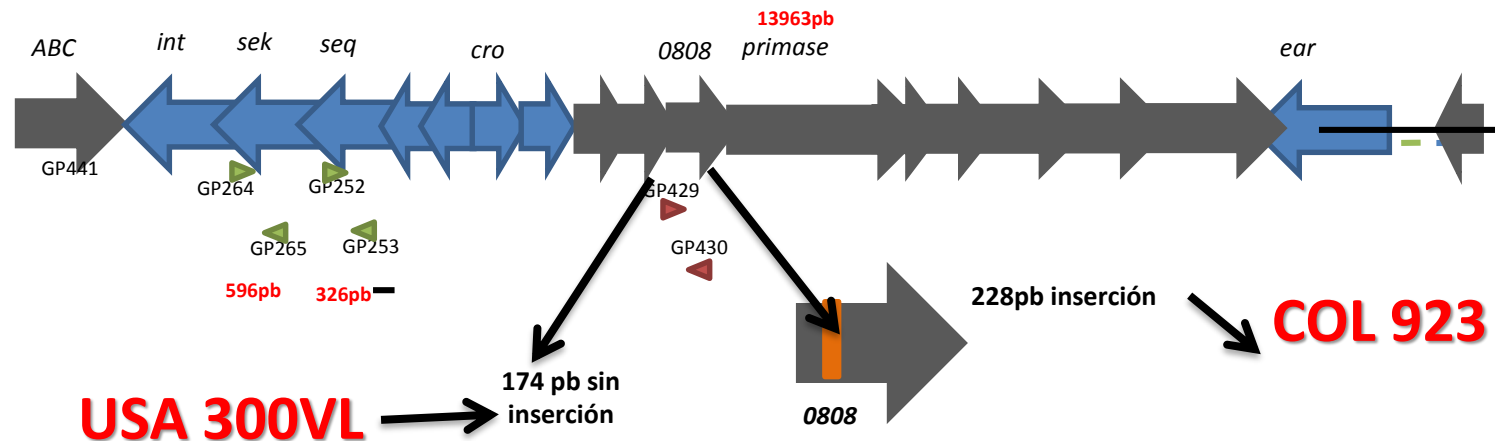
## Frecuencia de los EGM evaluados en los aislamientos sensibles a meticilina



**Elementos Genéticos Móviles.** Se observan todos los elementos genéticos móviles evaluados en las tres poblaciones pertenecientes al estudio; con diferencias significativas en SAPI 5 y  $\phi$ 3 en los aislamientos sensibles a meticilina en cuanto a su frecuencia y características genéticas



**Resultados:** Comparación de la frecuencia de **SaPI5** presentes en aislamientos clínicos de SARM-GC pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL, por PCR múltiple y amplificación individual.



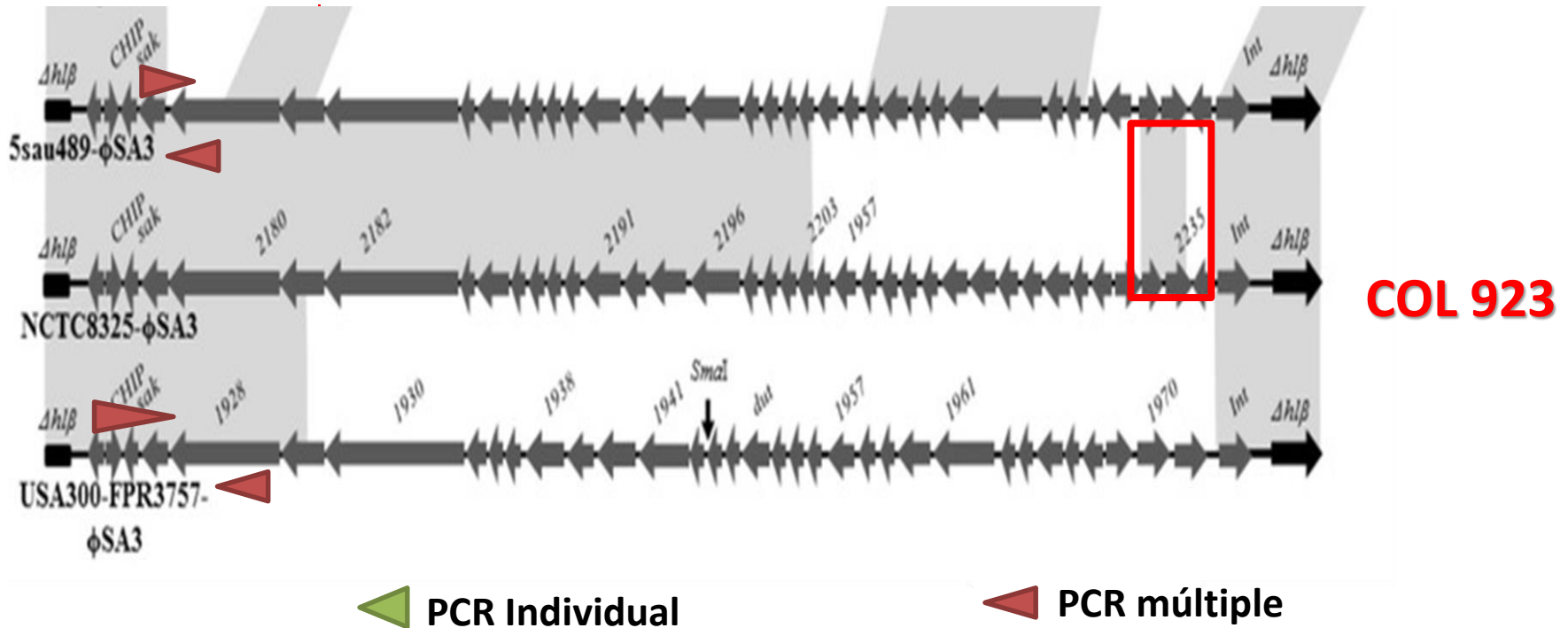
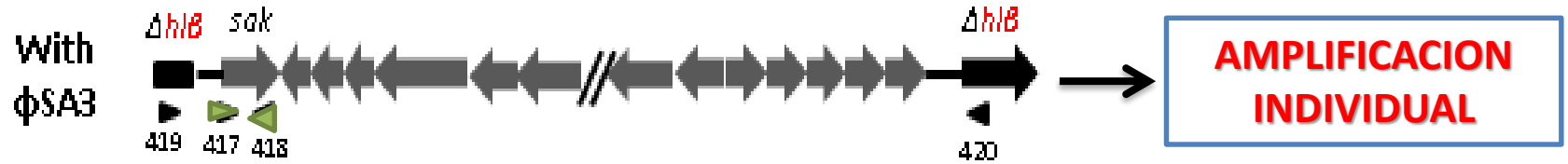
▶ PCR Individual

◀ PCR múltiple



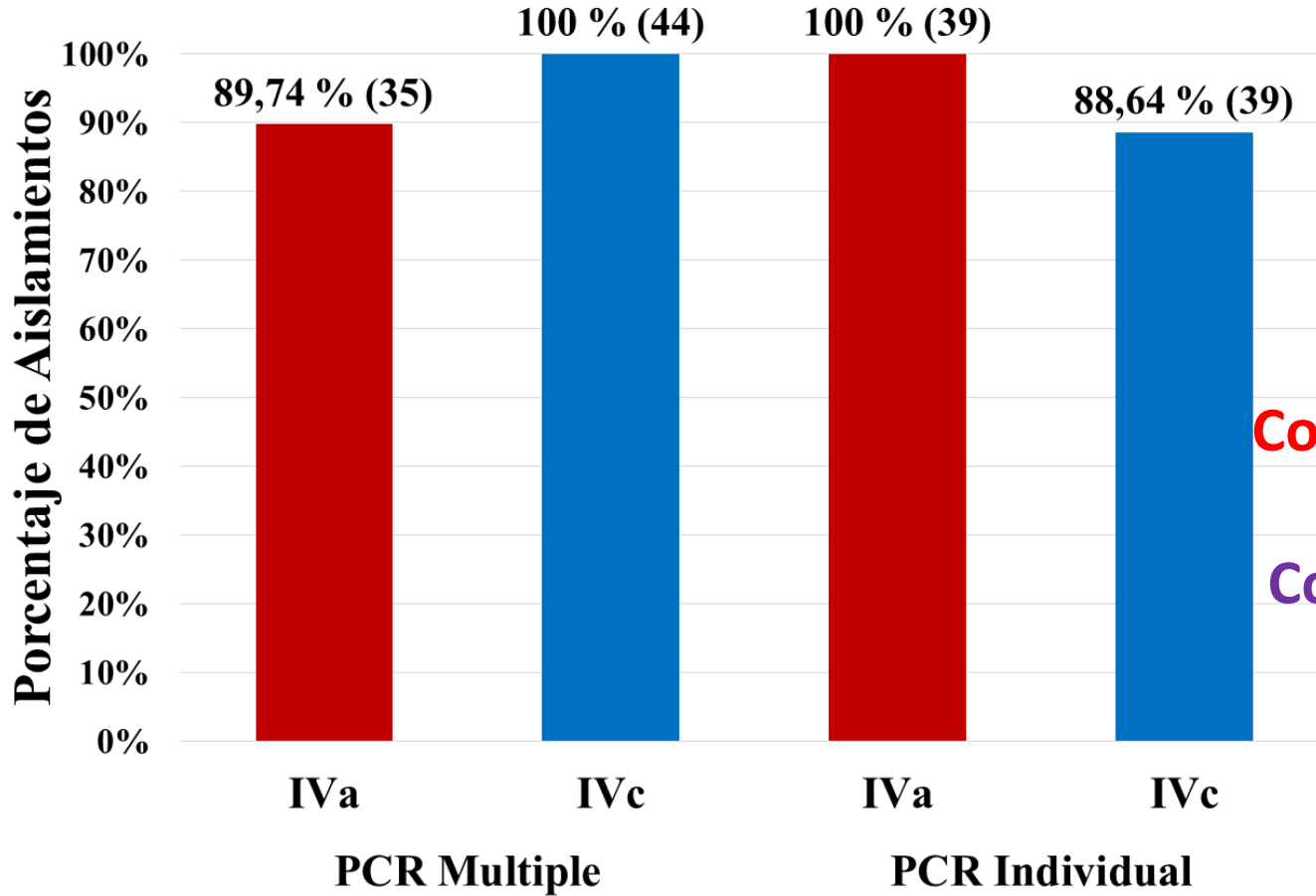


**Resultados:** Comparación de la frecuencia de  $\phi 3$  presentes en aislamientos clínicos de SARM-GC pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL, por PCR múltiple y amplificación individual.



**Resultados:** Comparación de la frecuencia de  $\phi 3$  presentes en aislamientos clínicos de SARM-GC pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL, por PCR múltiple y amplificación individual.

Comparación de la presencia de  $\Phi sa3$  en las dos técnicas de PCR  
IVa: 39  
IVc: 44



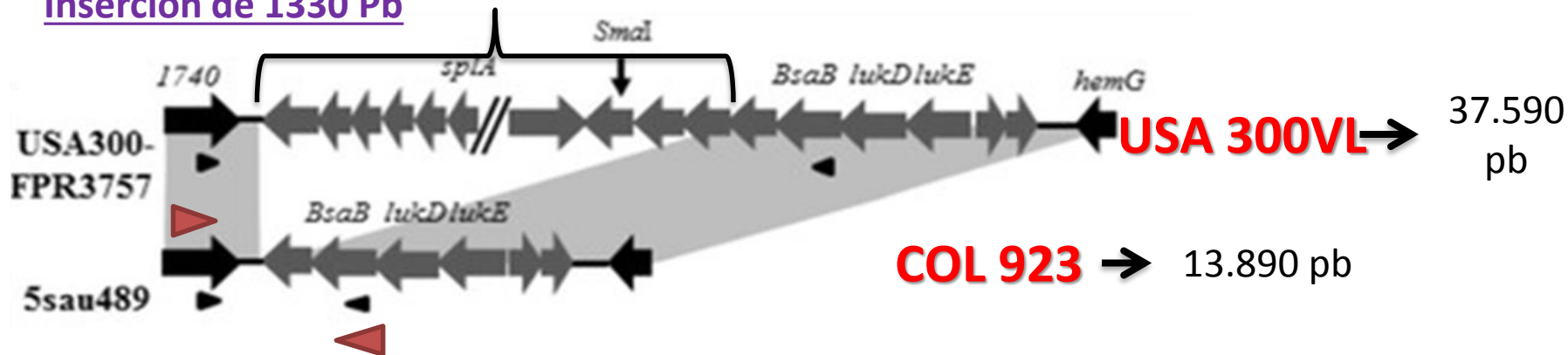
Concordancia  
0,75  
Considerable

Comparación de la presencia de  $\phi sa3$  por amplificación individual y amplificación múltiple



**Resultados:** Comparación frecuencia de vSaB presentes en aislamientos clínicos de SARM-GC pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL, por PCR múltiple y amplificación individual.

Inserción de 1330 Pb



**AMPLIFICACION INDIVIDUAL**

◀ PCR Individual

◀ PCR múltiple

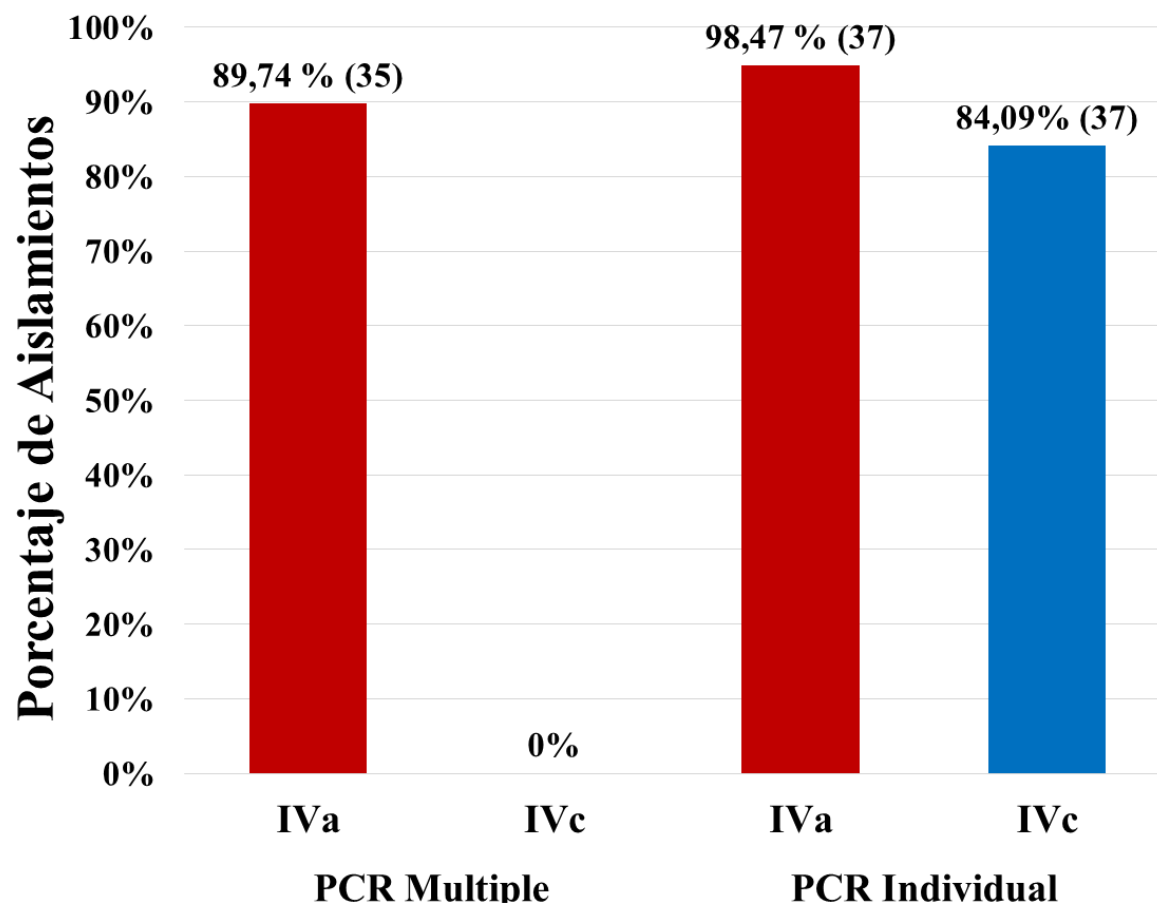


**Resultados:** Comparación frecuencia de vSaB presentes en aislamientos clínicos de SARM-GC pertenecientes a los clones COL923 y USA300-VL, por PCR múltiple y amplificación individual.

**Comparación de la presencia de B- Island en las dos técnicas de PCR**

**IVa: 39**

**IVc: 44**



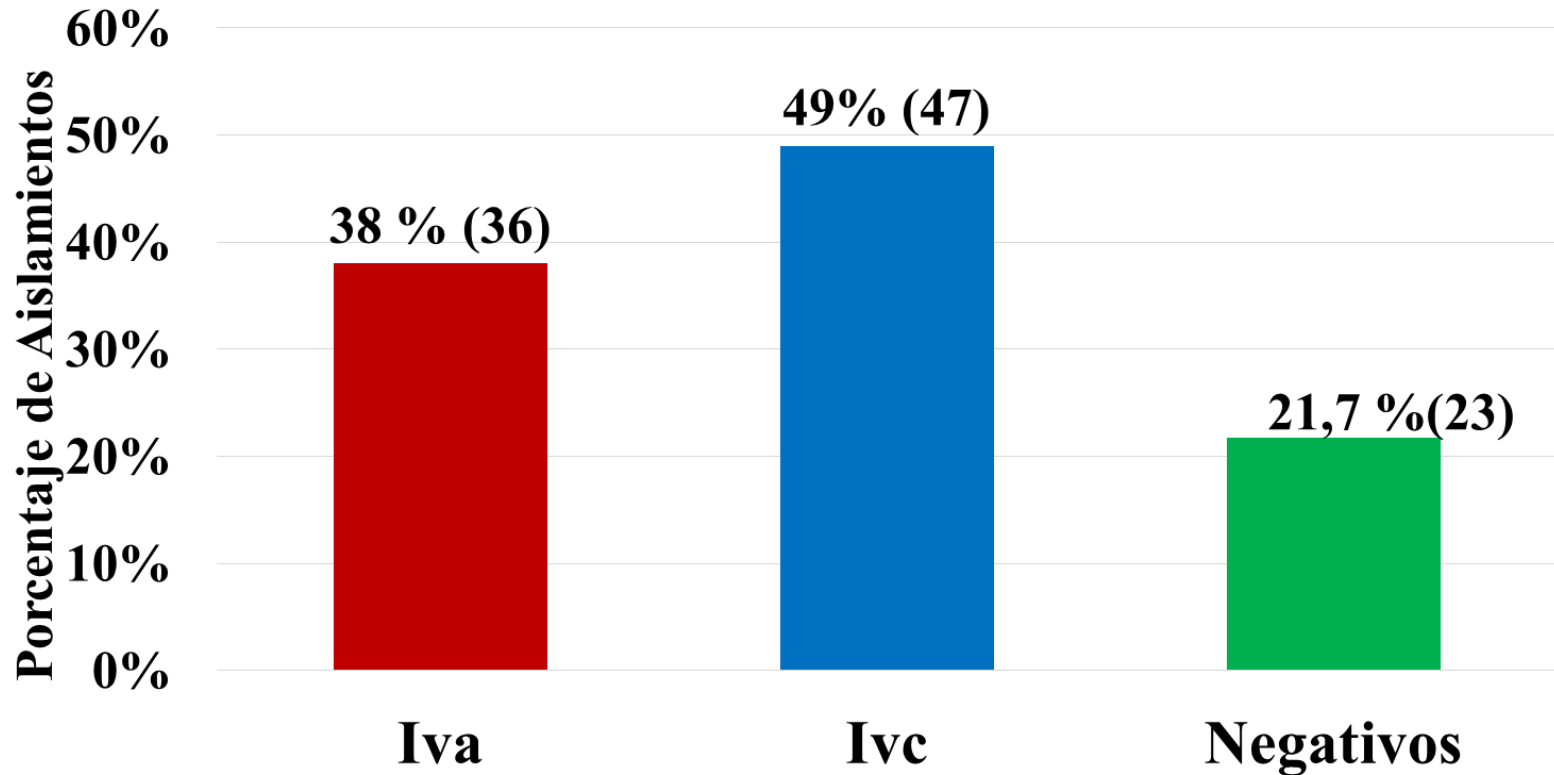
**Concordancia**  
**0,87**  
**Casi Perfecta**

**Comparación de la presencia de B-island en las dos técnicas de PCR.**  
La amplificación de la región conservada de los IVa se dio en el 89,74% del total de los aislamientos



# Resultados: Caracterización de los aislamientos

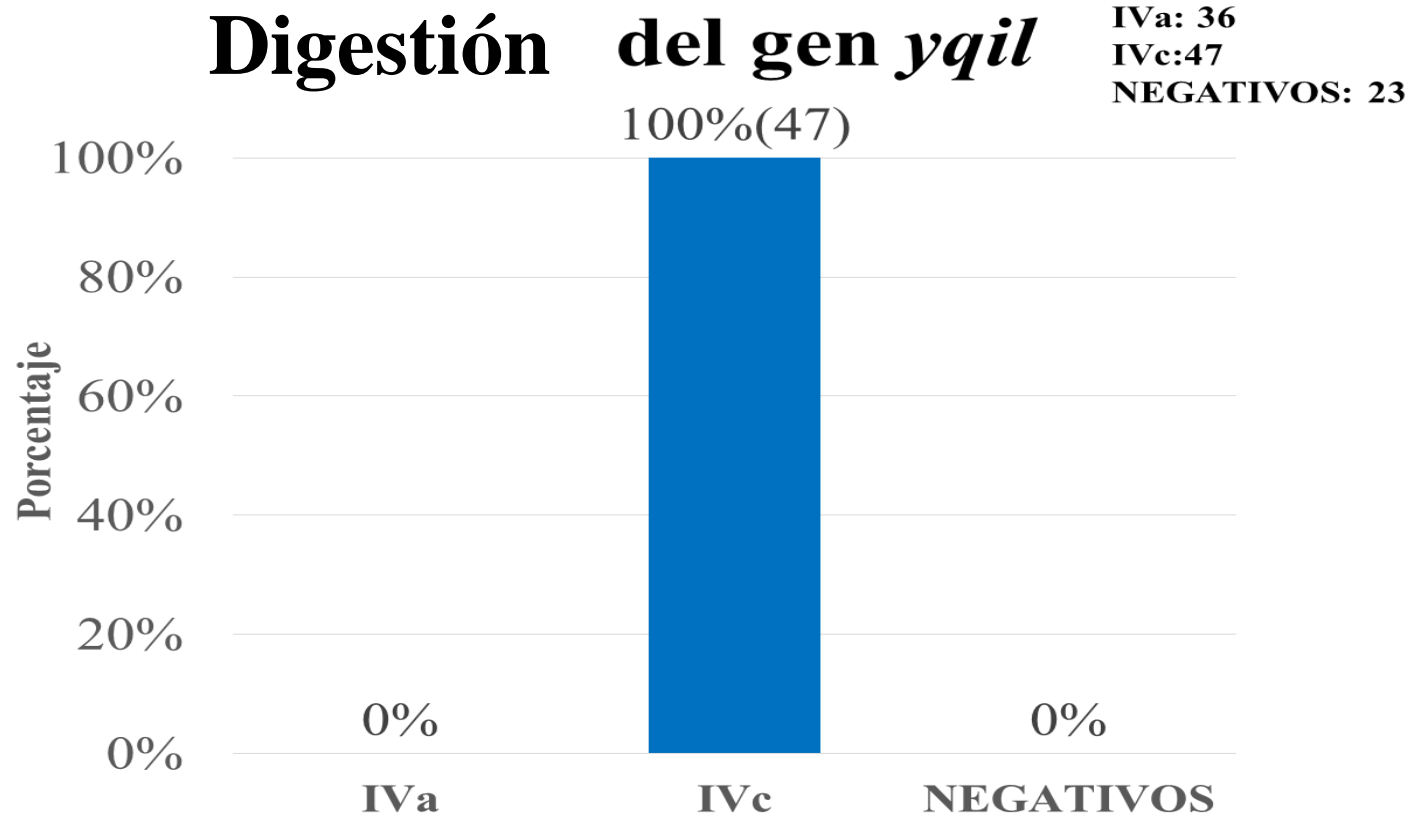
## Aislamientos identificados con la PCR Múltiple



TECNICA	IVa	IVc	Negativos	TOTAL	Kappa de C.
Convencionales	39	44	23	106	0.95
PCR Múltiple	36	47	23	106	



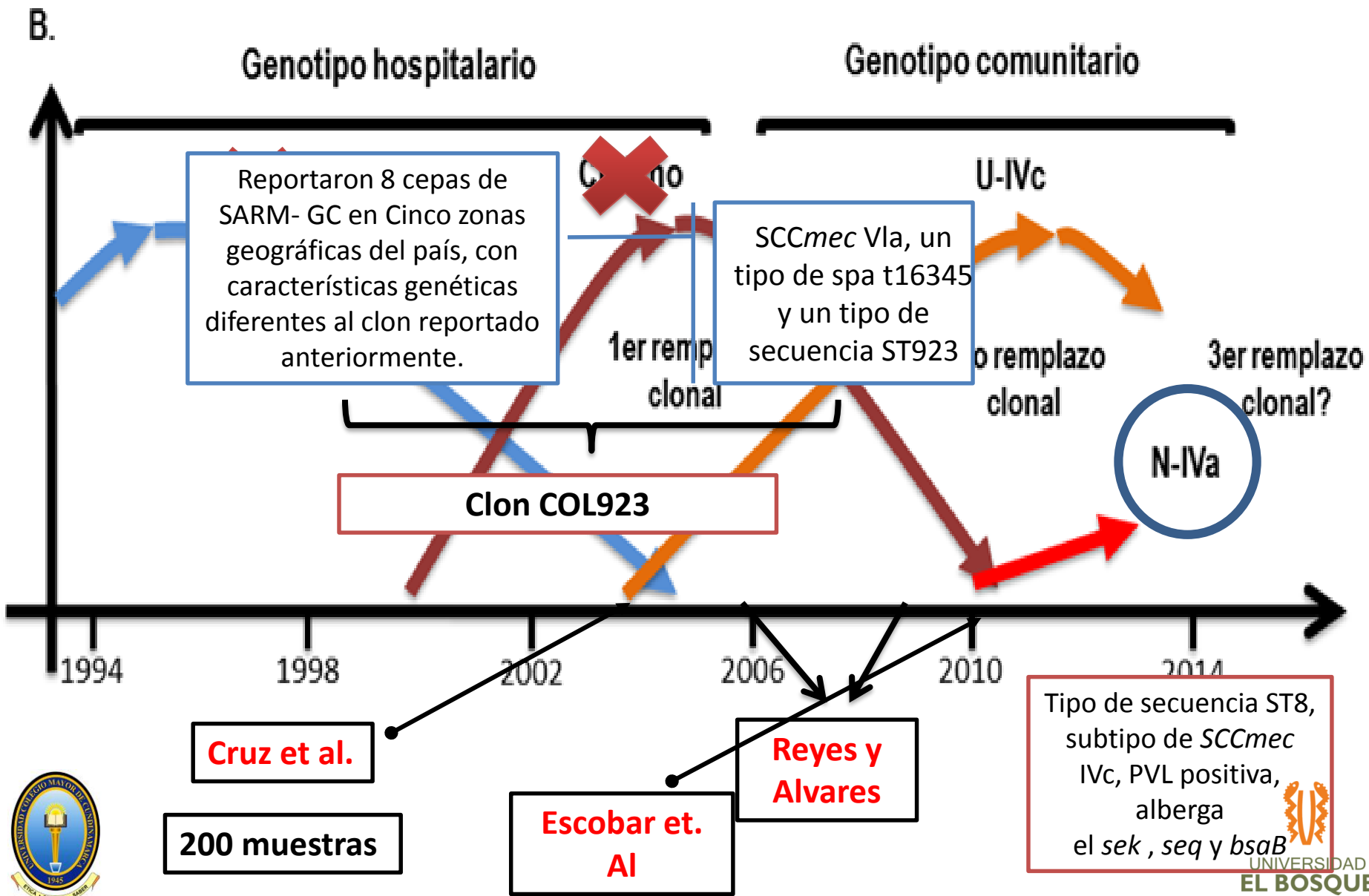
# Resultados: Caracterización de los aislamientos



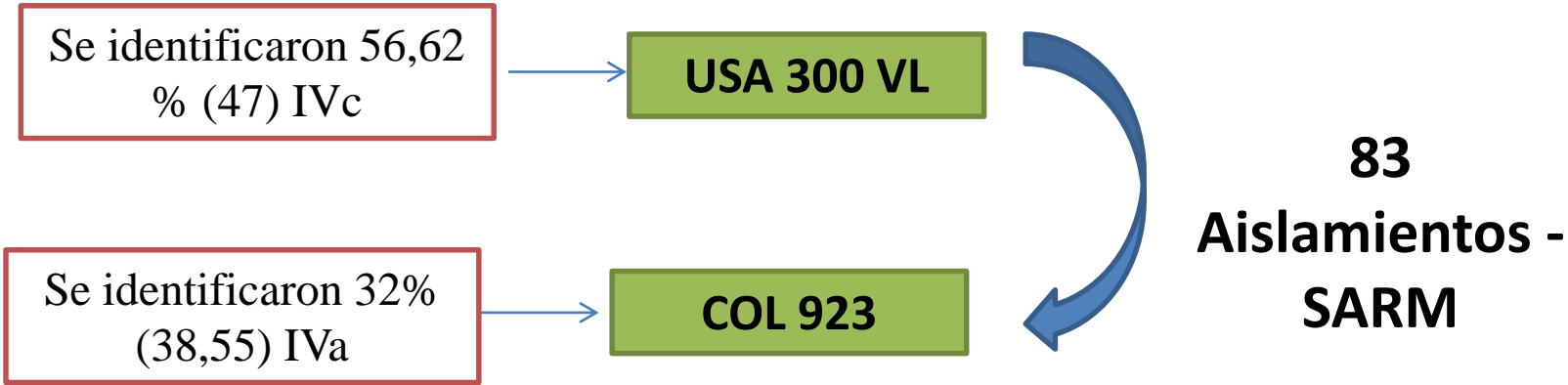
**Digestión del gen *yqiL* en los aislamientos estudiados.** Se obtuvo una restricción del gen en todos los aislamientos SARM de subtipo de SCC*mec* IVc. No se obtuvo restricción en ninguno de los demás grupos de estudio.



# Discusión



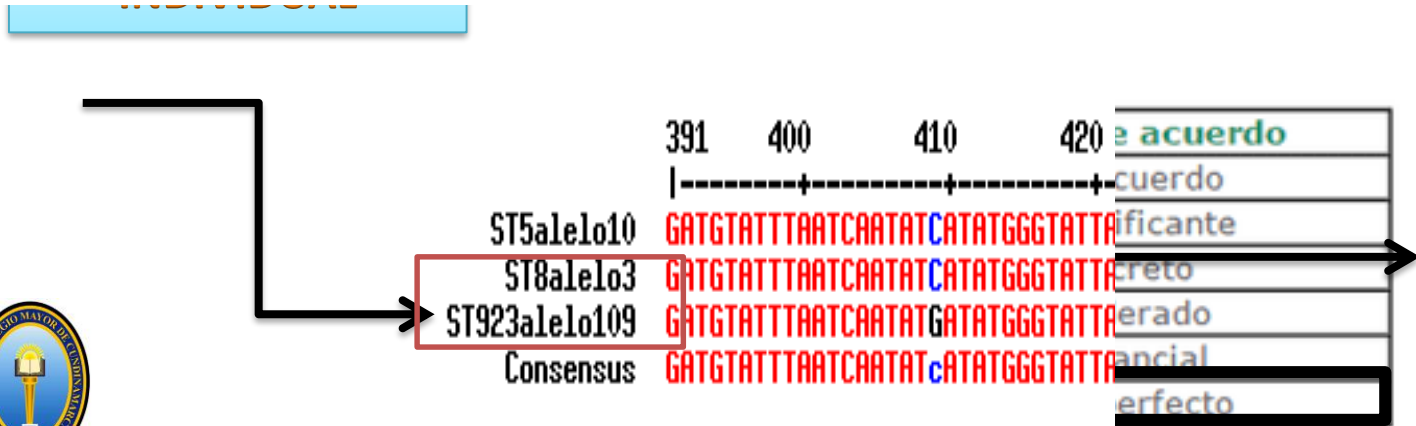
# Discusión



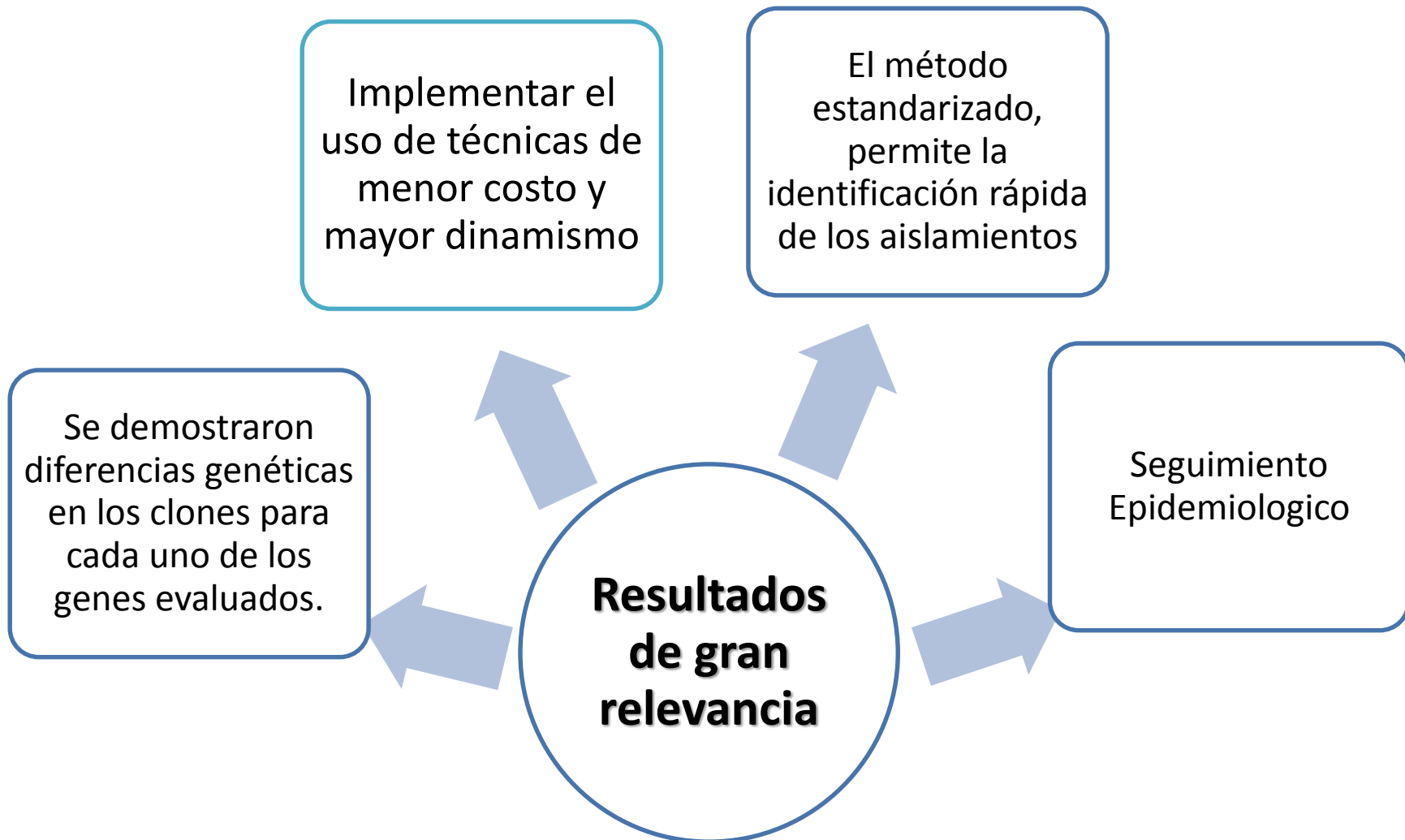
Design of two molecular methodologies for the rapid identification of Colombian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates

Genes del MLST

Gen *yqiL*



# Discusión



# Conclusiones

- Es posible diferenciar los dos los principales clones de SARM.GC de circulación en Colombia (COL923 y USA30-VL) por medio de una herramienta molecular como la PCR múltiple, la cual permite identificar la presencia de cambios puntuales en elementos genéticos móviles que se encuentran altamente conservados en estos aislamientos.
- Los cambios estructurales identificados en los elementos genéticos móviles como la isla de patogenicidad beta, SAPI5 y profago 3 son realmente específicos y conservados en los aislamientos de SARM-GC de circulación local lo cual permite su identificación y diferenciación.
- Se evidencio que existe una buena correlación en los resultados obtenidos con la caracterización tradicional en la cual se realizan diferentes PCR de forma individual y la PCR múltiple permitiendo reducir considerablemente el costo y el tiempo de la clasificación de estos aislamientos, proporcionando información muy útil en el seguimiento epidemiológico de este patógeno.



# Agradecimientos

- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, nuestra alma mater, por todos los conocimientos compartidos para poder culminar con éxito este proyecto.
- Al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana “LGMB” y su equipo de trabajo, de la Universidad El Bosque, y al proyecto de COLCIENCIAS contrato 607-2014 por su financiamiento y préstamo de sus instalaciones para la realización de todos los ensayos.
- A nuestras asesoras, la Docente investigadora PhD (c) MSc Betsy Esperanza Castro Cardozo, y MSc Liliana Constanza Muñoz por su ayuda imprescindible y asesoramiento constante en la fase experimental y elaboración del documento.

