

ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR MULTIPLEX A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE GENES RESISTENTES DEL TIPO CARBAPENEMASAS

Oscar Salvioni¹, Celeste Vega¹, José Pereira Brunelli², Miriam Rolon¹, Natalia Ramirez¹, Viviana de Egea¹

¹ Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica, CEDIC.

² Centro de Especialidades Dermatológicas, CED, Programa Nacional de Control de la Lepra, (MSPyBS) - San Lorenzo – Paraguay.

Introducción

La resistencia de las bacterias a los antibióticos representa un problema de salud pública a nivel mundial(1,3). En particular, las infecciones ocasionadas por enterobacterias resistentes a carbapenémicos, constituyen un desafío terapéutico teniendo en cuenta que en algunos casos, las bacterias adquieren resistencia a todos los fármacos disponibles en la actualidad. En este sentido, es de extrema importancia el diagnóstico oportuno de la presencia de resistencia a carbapenémicos en las bacterias que están produciendo infecciones.

Objetivo

Estandarizar una PCR-multiplex en tiempo real capaz de detectar de forma simultánea 4 genes relacionados a mecanismos de resistencia del tipo carbapenemasas

Materiales y métodos

Para la puesta a punto de la PCR-multiplex se extrajo ADN de 4 cepas de referencias productoras de carbapenemasas de los tipos KPC (Clase A), VIM y NDM (Clase B) y Oxa-48 (Clase C) **Figura Nº 1**. La condición ideal del ciclado establecida fue: una desnaturalización inicial a 95°C/10 min, annealing/extensión 60°C/1 min, en 40 ciclos, utilizando el termociclador RotorGen 6000 (QIAGEN).

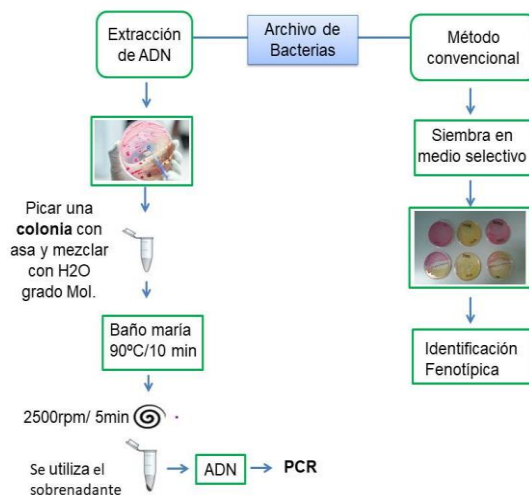


Figura Nº 1: Validación de los resultados en ciego utilizando muestras clínicas.

Resultados

Se estableció una PCR multiplex que permite detectar 4 genes de resistencias de forma simultánea de los tipos KPC, VIM, NDM y Oxa-48 **Figura Nº 2**. La PCR fue validada en ciego utilizando **33** cepas aisladas de muestras clínicas, estas fueron caracterizadas fenotípicamente. Se obtuvo una concordancia total entre los resultados obtenidos por ambos métodos.

Conclusión

Se logró implementar una PCR-multiplex capaz de detectar en forma simultánea 4 tipos de resistencias del tipo carbapenemasas. La utilización de la PCR multiplex en tiempo real es una herramienta eficaz para la rápida y fiables detección de bacterias resistentes a carbapenemasas.

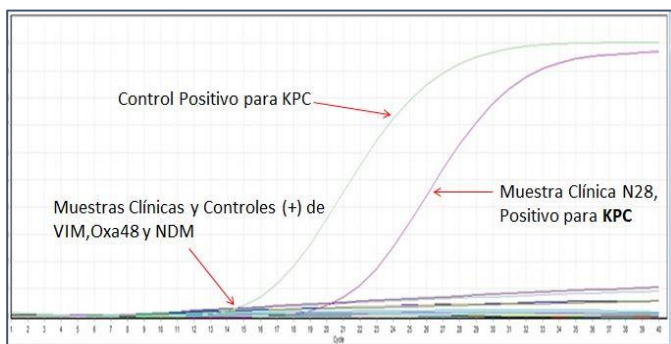


Figura Nº 2: PCR-multiplex en tiempo real de los mecanismos de resistencia tipo KPC, VIM, OXA-48 y NDM validados con muestras clínicas.

REFERENCIAS

- Fluit, A.C., J. Verhoef, and F.J. Schmitz, Antimicrobial resistance in European isolates of Pseudomonas aeruginosa. European SENTRY Participants. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. 19(5): p. 370-4.
- Fluit, A.C., et al., Antimicrobial resistance among urinary tract infection (UTI) isolates in Europe: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000. 77(2): p. 147-52.
- Fluit, A.C., et al., Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. Clin Infect Dis, 2000. 30(3): p. 454-60.