

A detailed 3D rendering of a bacterium, likely a Gram-negative rod, shown in a blue-tinted microscopic view. The bacterium is elongated and covered in numerous thin, hair-like flagella extending from its surface. The background is a dark blue gradient with other smaller, similar bacterial structures scattered around.

**Genomica e Proteomica:  
presente e futuro nelle  
rilevazione e tipizzazione dei  
meccanismi di resistenza**

***Mosè Favarato***

***Azienda Ulss 12 Veneziana - Dipartimento di Patologia Clinica***

***Laboratorio Analisi***

***SS Genetica e Diagnostica Molecolare***

S E A N C O N N E R Y

NEWMCRO

LA LEGGENDA  
DEGLI UOMINI  
STRADORDINARI

# Minaccia Globale

Emergenza e diffusione delle antibiotico resistenze resta un problema globale di salute pubblica, che riflette la straordinaria capacità adattativa dei batteri.

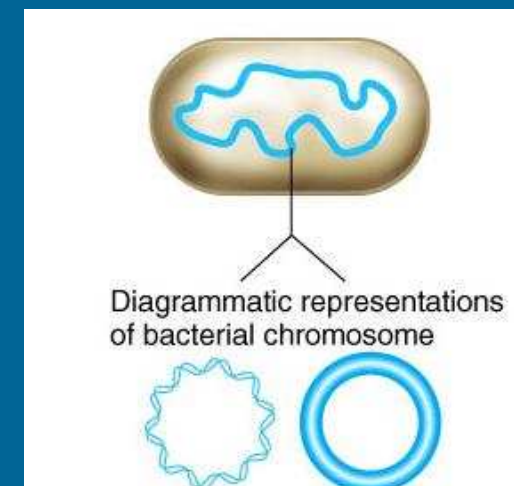
I farmaci utilizzabili hanno solo una “verginità” limitata prima che emerga lo spettro di resistenza.

- 
- North Carolina, 1996
  - New York, 2000
  - Paris, 2005
  - Casi successivi
  - Stati dove nel 2010 è stata confermata la resistenza KPC (37 in totale)

# Cellula Batterica- Genoma

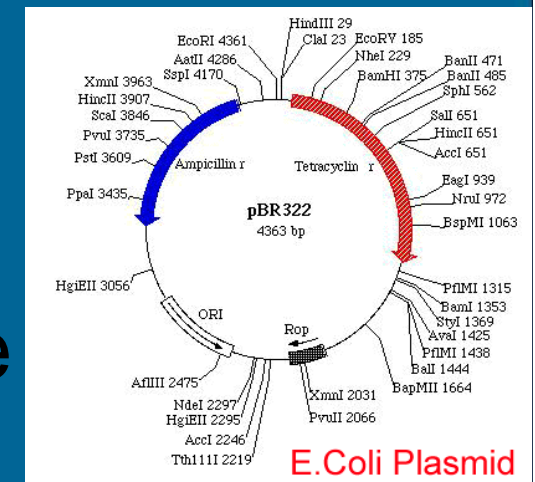
Il genoma batterico è costituito da due componenti:

1. Cromosoma (geni essenziali)
2. Elementi extracromosomici “mobili” (MGEs): non essenziali, responsabili del trasferimento genetico orizzontale o verticale
  - Plasmidi
  - Elementi trasponibili
  - Sequenze di inserzione
  - Elementi invertibili



# Plasmidi

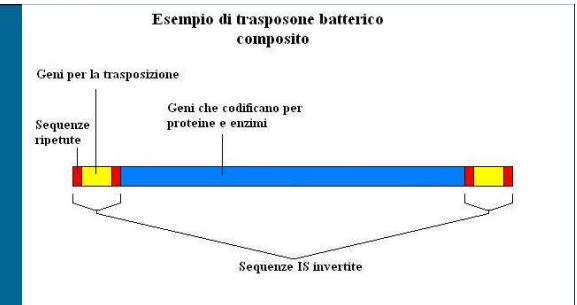
- Elementi genetici extracromosomiali
- Plasmidi possono essere trasmessi in linea verticale (Cellula madre-Cellula figlia) o in linea orizzontale tra cellule diverse
- Replica autonoma
- DNA bicatenario circolare
- PM da  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$
- Due tipi principali : Coniugativi e metabolici



# Principali funzioni dei plasmidi di interesse clinico

- Resistenza antibiotici : Plasmidi R
- Degradazione enzimatica: (*e.g. penicillina*)
- Modificazioni enzimatiche: (*e.g. cloramfenicolo*)
- Alterata permeabilità: (*e.g. tetracicline*)
- Alterazione del Target: (*e.g. streptomicine*)
- Via metabolica alternativa: (*e.g. sulfamidici*)

# Trasposoni



- Segmenti di DNA mobili in grado di traslocare dal cromosoma al plasmide batterico
- Corredati di elementi genici di trasferimento
- Possono alterare l'organizzazione dei geni
- Capacità di inserire un segmento di DNA uguale a se stesso in altro sito
- Duplicazione del Tn associata alla trasposizione
- I siti di inserimento dei Tn non sono casuali
- L'estremità di ogni Tn presenta sequenze IS
- I Tn trasportano geni accessori

# Trasposoni

- In genere veicolano geni che codificano per:
  1. Antibiotico resistenza
  2. Insensibilità ai metalli pesanti
  3. Produzione di endotossine



# Resistenze meccanismi

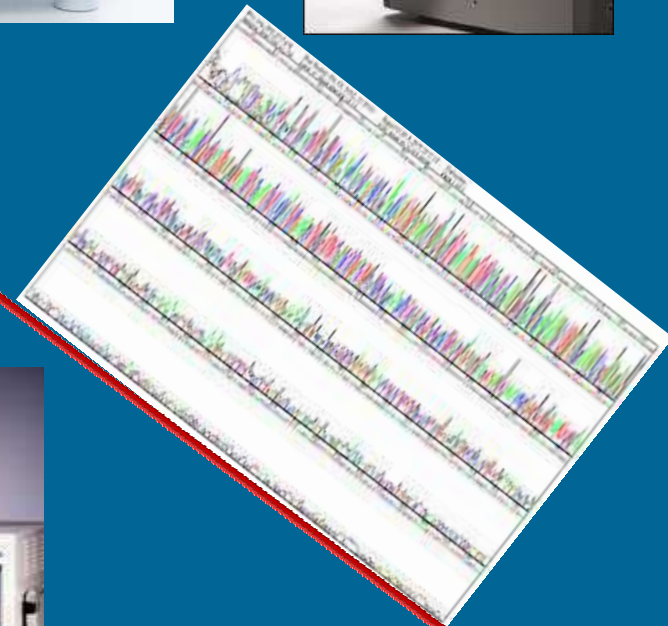
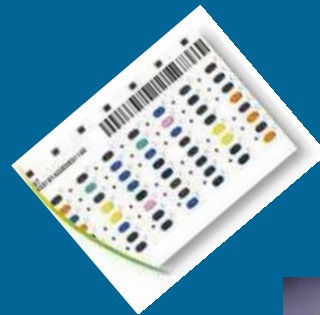
Batteri sono in grado di usare vie alternative per eludere l'azione degli antibiotici:

1. Modifica del target batterico
2. Produzione da parte del batterio di enzimi inattivanti l'antibiotico
3. Ridotta permeabilità all'antibiotico
4. Efflusso attivo che induce l'uscita dell'antibiotico stesso dalla cellula grazie ad un sistema di pompe attive

# Resistenze meccanismi

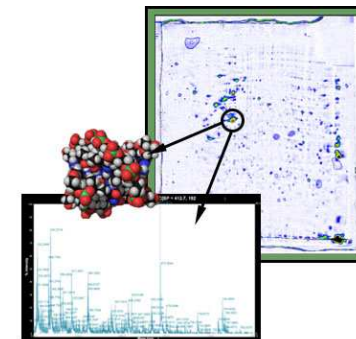
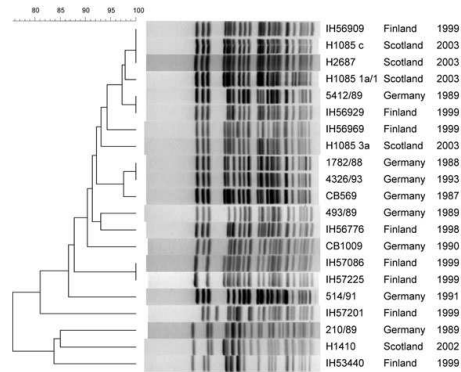
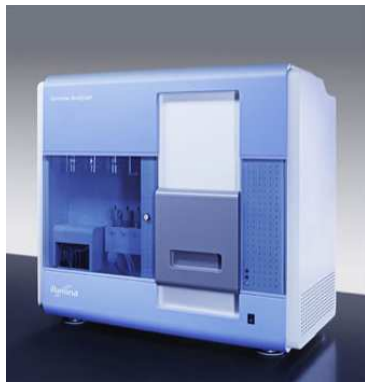
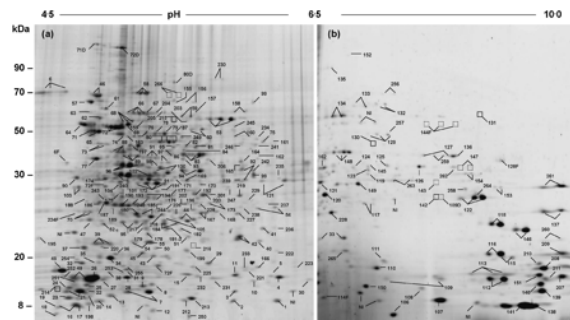
- Resistenza Intrinseca : mancanza del target per il farmaco.....
- Resistenza acquisita: dovuta a mutazioni in *housekeeping genes* o per acquisizione di frammenti di DNA estraneo contenenti specifici geni di resistenza.
- I geni coinvolti sono centinaia (Gram + e Gram -)

# Microbiologia



# Micro

- La circolazione delle resistenze crea, in ambito ospedaliero, la necessità di controllo delle infezioni
- Si utilizzano metodi automatici di valutazione dell'espressione fenotipica
- Ottimi sistemi per situazioni standard
- Complessa interpretazione nei casi di più meccanismi coinvolti o in urgenza



# Approcci Molecolari di indagine

- **Analisi diagnostica molecolare**

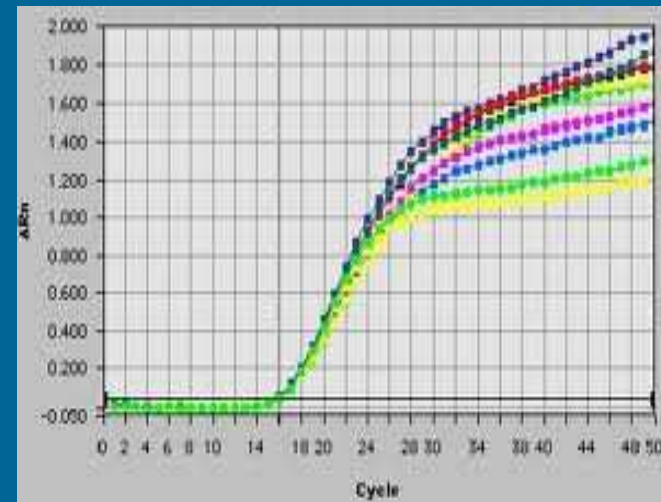
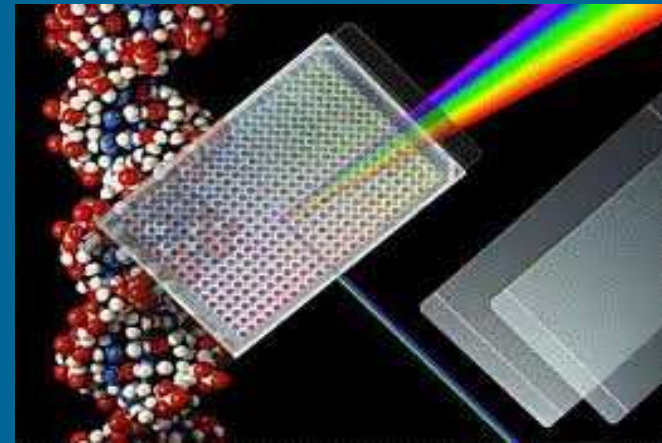
- PFGE: analisi del cromosoma batterico
- *Southern Blot*: cromosoma batterico con ibridazione
- Analisi plasmidica: frammenti di restrizione
- PCR:
  - *Nested PCR*: maggiore sensibilità
  - *PCR Reverse dot blot -lineararray*
  - *PCR multiplex* :disegno dei primer secondo database
  - *AP-PCR: arbitrary primed PCR con random primer*
  - *AFLP: amplified fragment length polymorphism* – endonucleasi e PCR
  - ***Real time PCR – Multiplex real time PCR***
  - *VNTR: variabile number tandem repeats – repPCR*
- *Multiplex PCR - MicroArray*

# Approcci Molecolari di indagine

- Sequenziamento genomico (Sanger)
- SLST: *Single-locus sequence typing* – analisi SNP in regioni geniche polimorfiche
- MLST: *Multilocus enzyme electrophoresis* – sequenze più grandi- identificazioni di regioni di ipervirulenza tra ceppi
- NGS: Next-generation sequencing
  - Massivo
  - Parallelo
- Spettrometria di massa
- dHPLC

# RT-PCR

- Kit Commerciali
  - MRSA
  - VanR
  - ESBL
  - CRE
- Metodi *homemade*
  - Sequenze su GenBank database
  - Molto flessibile
  - Da standardizzare



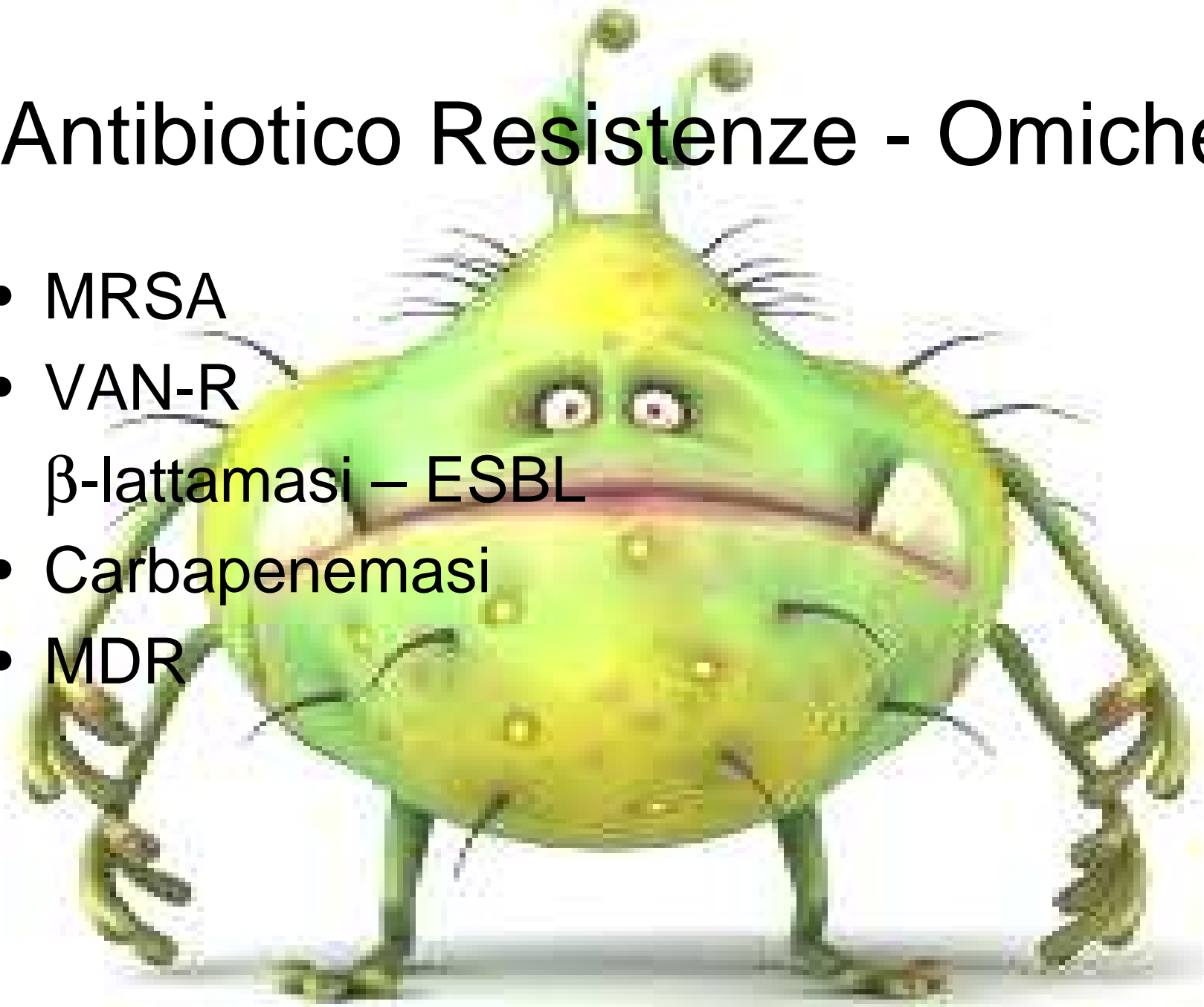


# RT-PCR

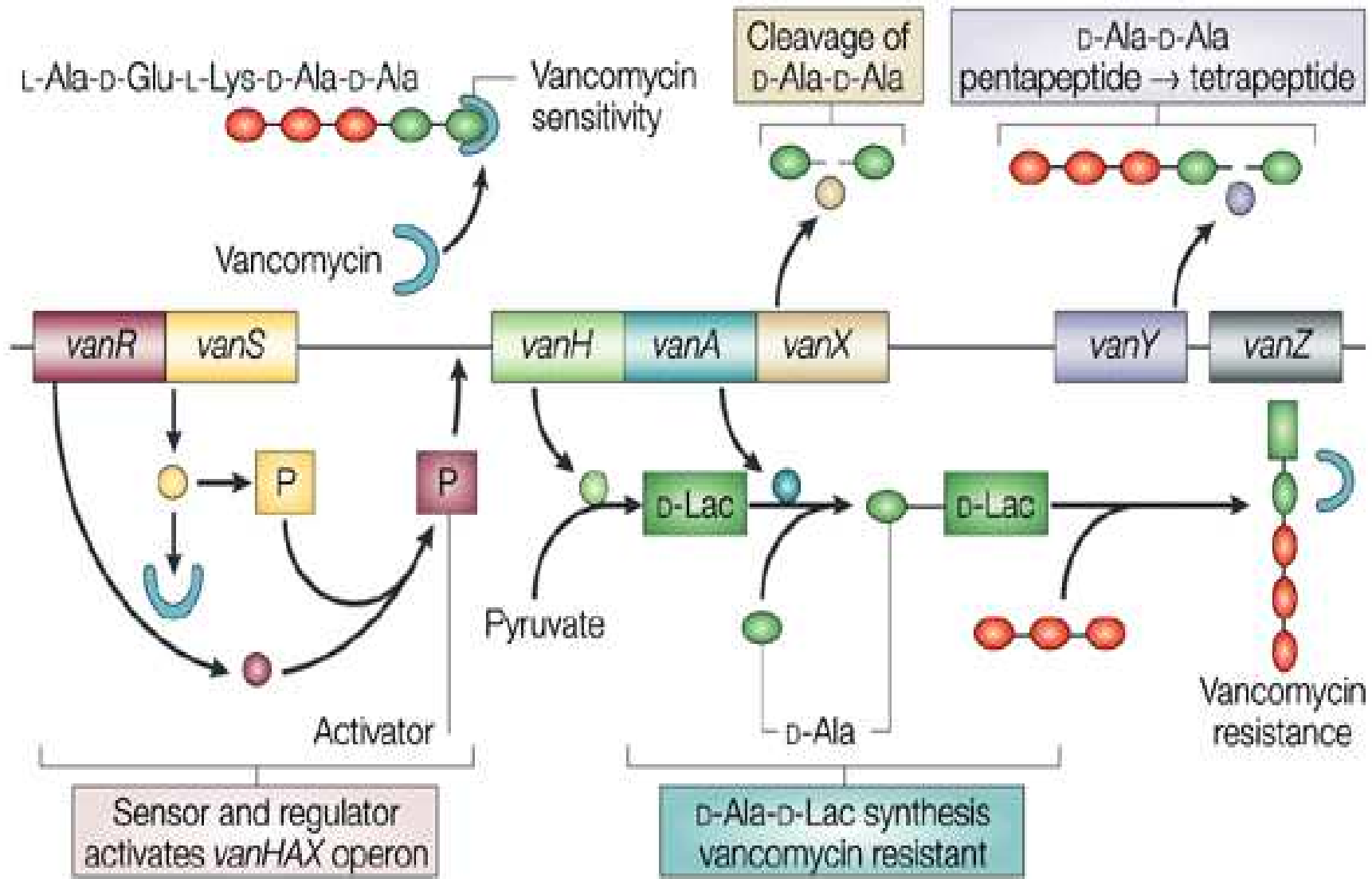
- PCR rileva solo sequenze già caratterizzate
- Può essere vanificata da varianti alleliche o siti polimorfici
- Preferibile approccio in multiplex PCR
- Progettazione e target in relazione alla prevalenza e epidemiologia molecolare per la zona di applicazione.

# Antibiotico Resistenze - Omiche

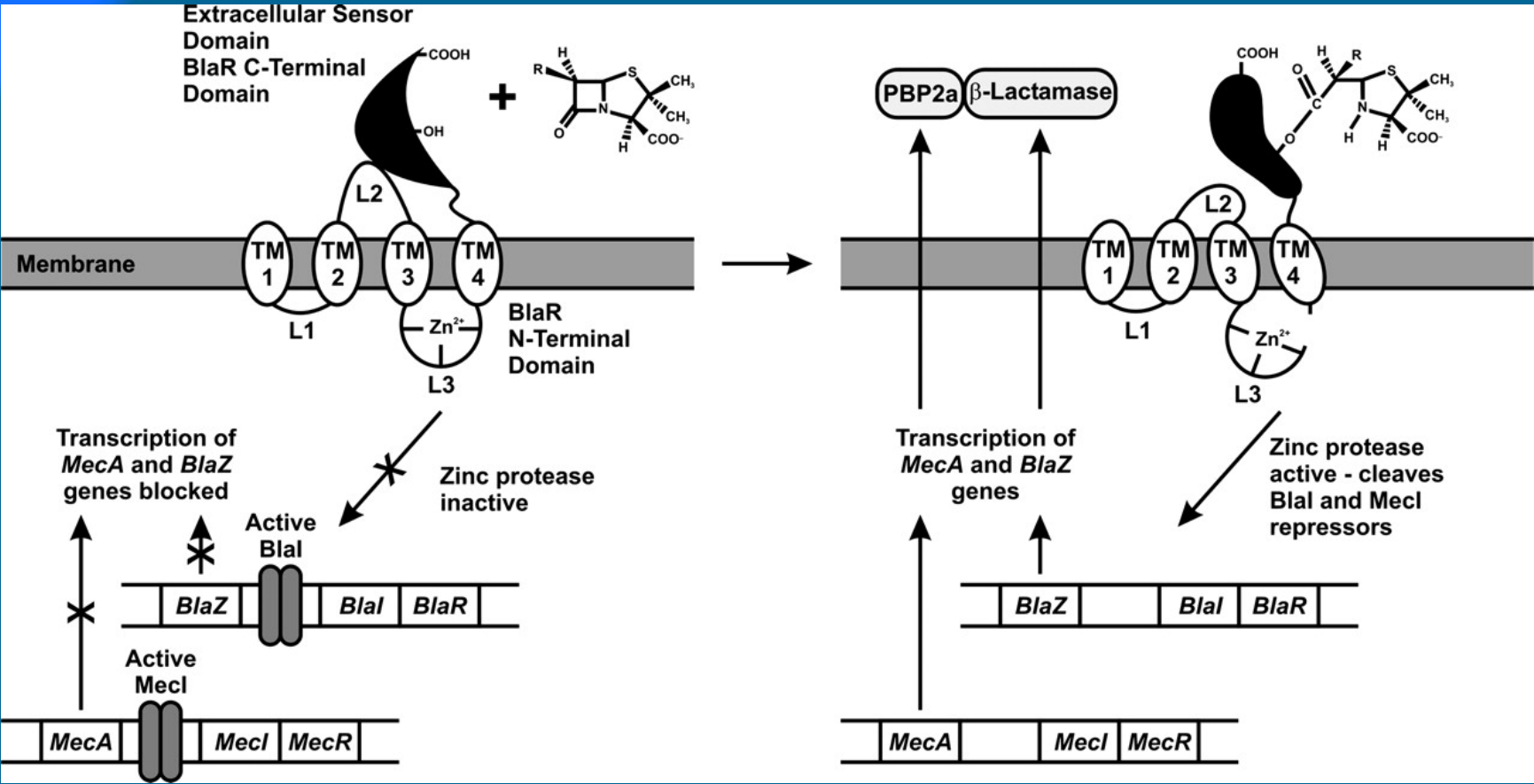
- MRSA
- VAN-R
- $\beta$ -lattamasi – ESBL
- Carbapenemasi
- MDR



# Vancomicina resistenza

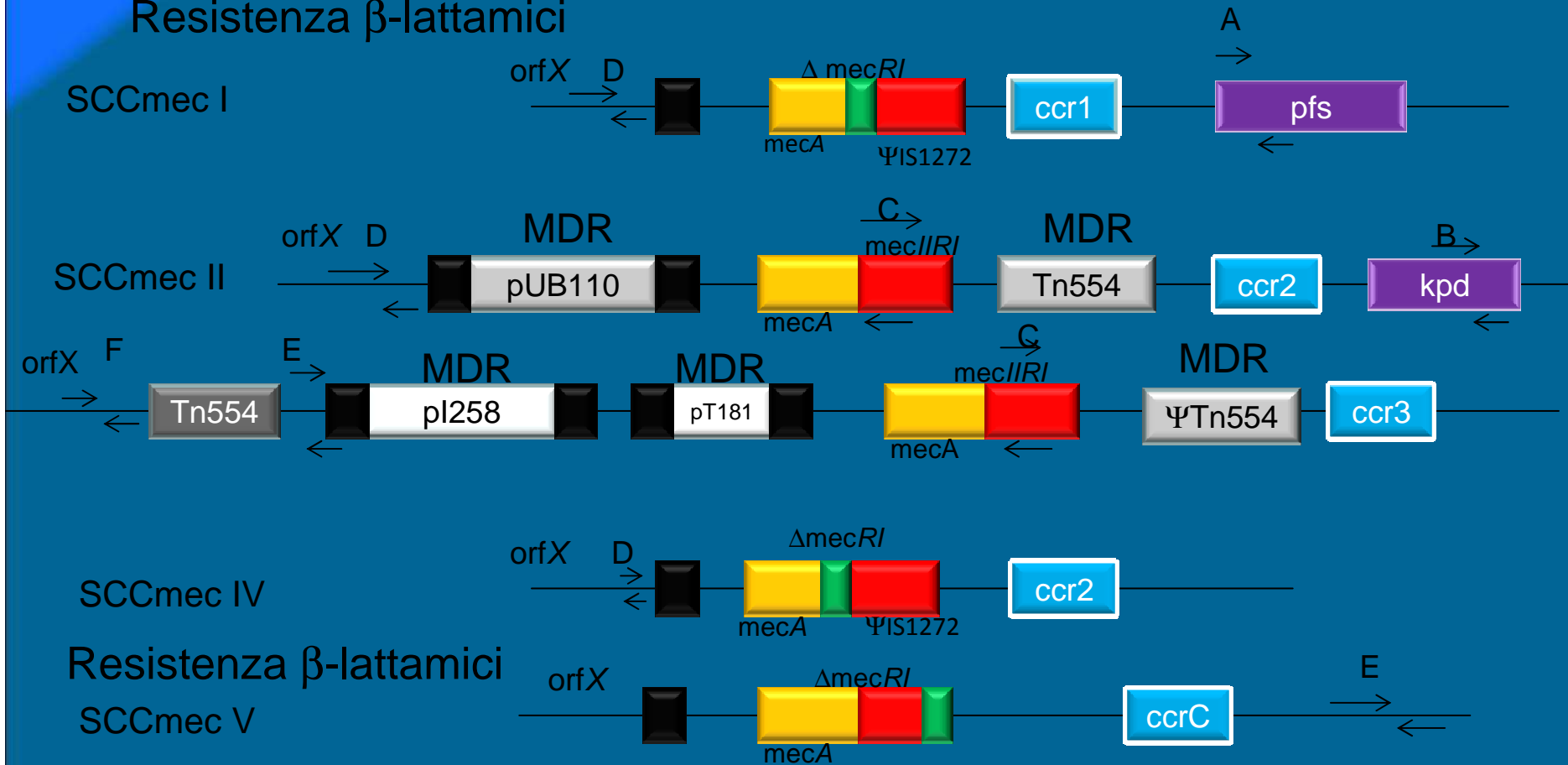


# MRSA



# SCCmec type I-V

Resistenza  $\beta$ -lattamici



# SCC*mecA*

Classe	Struttura	SCC <i>mec</i>	Specie
A	<i>mecI-mecRI-mecA-IS431</i>	II,III	S. aureus
B	<i>IS1272-ΔmecRI-mecA-IS431</i>	I,IV	S.aureus
C	<i>IS431-DmecRI-mecA-IS431</i>	V	S.aureus
D	<i>ΔmecRI-mecA-IS431</i>		S.caprae
E	<i>ΔmecRI-mecA-IS431</i> con delezione di 976pb rispetto a D <i>mec</i>		S.aureus

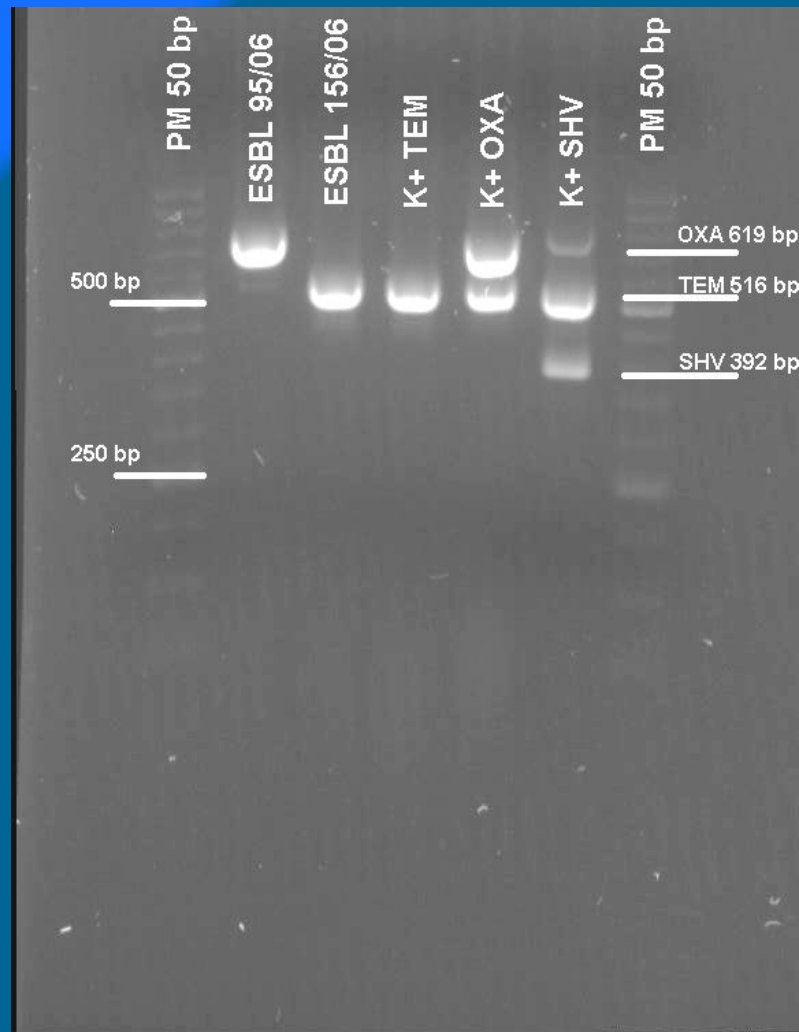
# Meccanismo di resistenza agli antibiotici di *S. aureus*

Antibiotico	Gene-Resistenza	Prodotto geneico	Meccanismo di resistenza	Localizzazione
$\beta$ -lattamici	<b>blaZ</b>	$\beta$ -lattamici	Idrolisi enzimatica del nucleo $\beta$ -lattamico.	PI:Tn
	<b>mecA</b>	PBP2a	Ridotta affinità PBP	C:SCC mec
Glicopeptidi	<b>VISA</b>	Peptidoglican o alterato	Intrappolamento Vancomicina parete cell	C:
	<b>VRSA</b>	D-ala-D-lac	Dipeptide con ridotta affinità vancomicina	PI:Tn
Chinoloni	<b>parC</b>	parC componente della topoisomerasi IV	Mutazioni della regione QRDR-riduzione affinita complesso enzima-DNA –Chinoloni	C:
	<b>gyrA o gyrB</b>	Componenti giarsi		C:

# Geni resistenza codificanti $\beta$ -lattamasi carbapenemasi

- Geni plasmidici  $bla_{TEM1-161}$ : ampicillina, penicilline, cefalosporine. Le varianti del gene bla sono la conseguenza di mutazioni puntiformi a livello nucleotidico che causano la sostituzione di singoli aminoacidi e quindi variazione dell'enzima
- Geni plasmidici  $bla_{SHV}$ : Sulphydryl variabile
- Geni plasmidici  $bla_{OXA}$ : Ampicillina Cefalotine
- Geni plasmidici  $bla_{CTX-M}$  e  $bla_{VEB}$ :
- Geni plasmidici  $bla_{KPC}$ :
- Geni plasmidici  $bla_{NDM1}$ :
- Geni cromosomici/plasmidici AmpC: gruppo eterogeno di geni





Gel d'agarosio 1,5% degli amplicon ottenuti con PCR Multiplex.

Linee: DNA molecular weight marker XIII  
 ESBL 95/06, *E. coli* positivo per *bla*; ESBL 156/06,

*P. mirabilis* positivo per *bla*TEM OXA

K+ TEM, *E. coli* (D9)

controllo positivo *bla*

K+ OXA, *S. typhimurium* (D8) controllo positivo per

*bla*

OXA

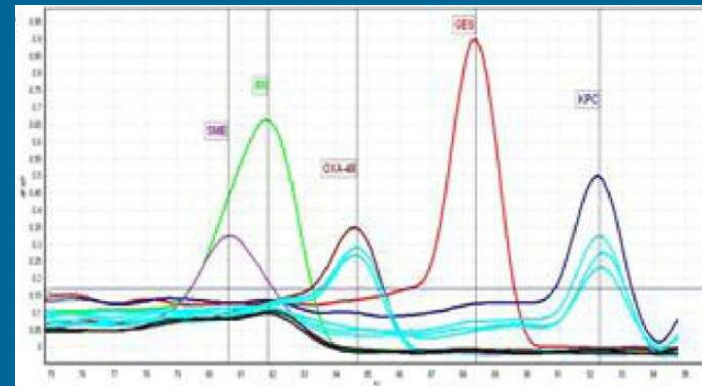
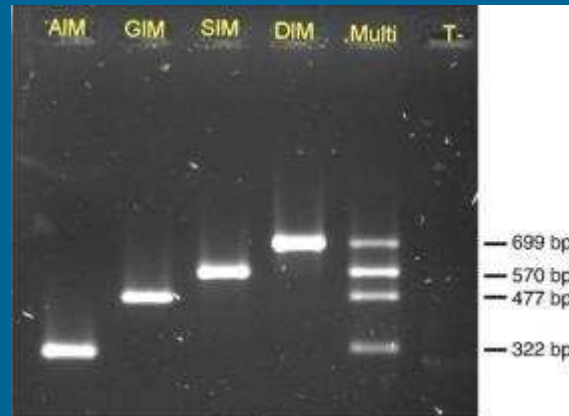
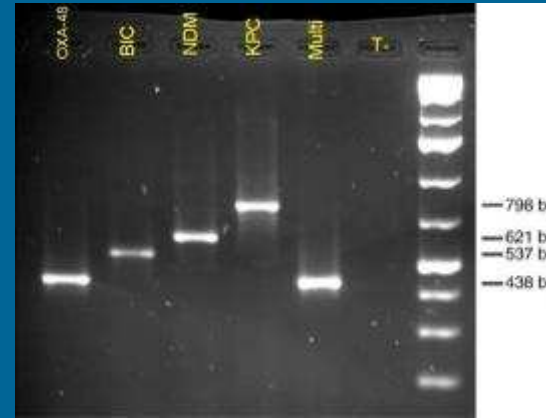
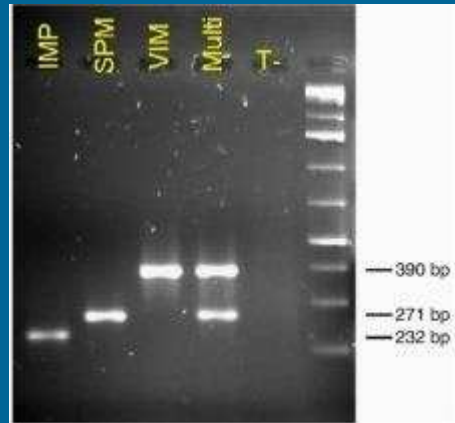
TEM

K+ SHV, *K. pneumoniae* controllo positivo per

*bla*

SHV

.



# Approccio Molecolare alle resistenze



- Però attenzione a cosa si compra .....
- Processi analitici realizzati secondo standard stringenti (ISO 15189).....

## High Proportion of Wrongly Identified Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriers by Use of a Rapid Commercial PCR Assay Due to Presence of Staphylococcal Cassette Chromosome Element Lacking the *mecA* Gene<sup>∇</sup>

Dominique S. Blanc,<sup>1\*</sup> Patrick Basset,<sup>1</sup> Immaculée Nahimana-Tessema,<sup>1</sup> Katia Jaton,<sup>2</sup> Gilbert Greub,<sup>2</sup> and Giorgio Zanetti<sup>1</sup>

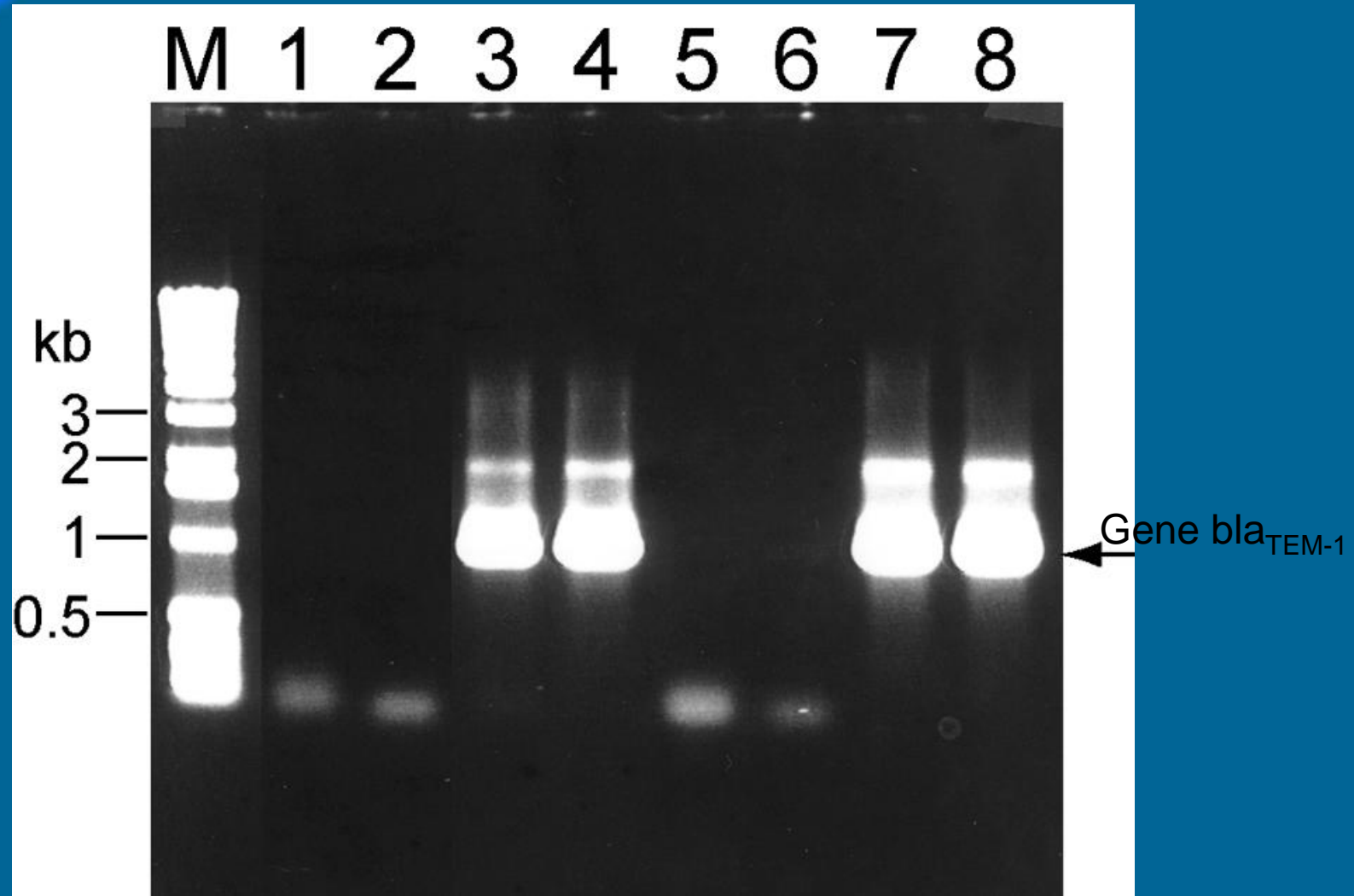
Hospital Preventive Medicine Service<sup>1</sup> and Institute of Microbiology,<sup>2</sup> Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

Received 1 October 2010/Returned for modification 5 November 2010/Accepted 7 December 2010

During a 9-month period, 217 patients were newly diagnosed as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers by using [redacted]. However, no MRSA was recovered by culturing the second swab in 61 of these patients. Further analyses showed that 28 (12.9%) of the patients harbored *S. aureus* isolates with a staphylococcal cassette chromosome element lacking the *mecA* gene and were thus incorrectly determined to be MRSA carriers.

In conclusion, we identified here a high proportion (12.9%) of patients wrongly determined to be MRSA carriers using  test for MRSA screening. This was due to the presence of *S. aureus* with an SCC element lacking the *mecA* gene. These false-positive results led to inappropriate patient care (unnecessary decolonization treatment, additional precautions measures, and possibly the unjustified use of glycopeptides). In the future, more insight is needed on the performance of these molecular tests and, ideally, new generation tests should circumvent the current limitations.

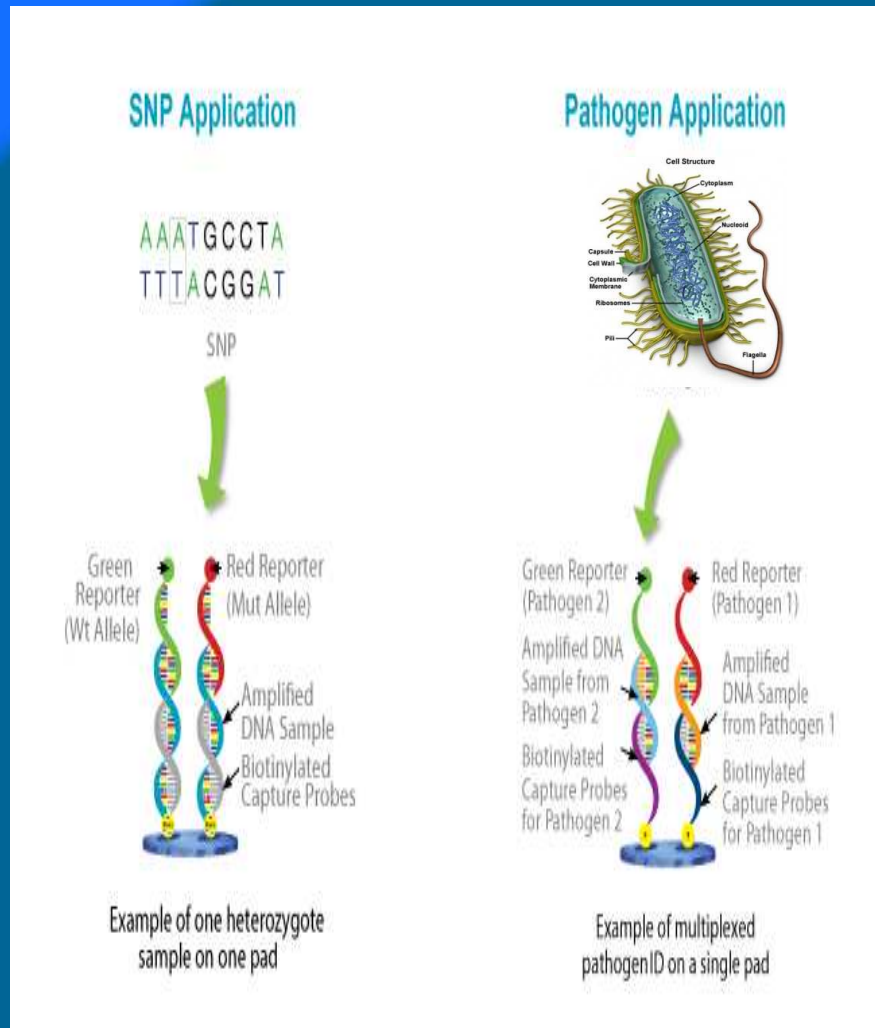
# Controllo del processo ISO.....



# Futuro prossimo

- Possibilità di tecnologie ad elevato throughput
- Basso costo
- Possibilità di individuare e caratterizzare ogni singolo organismo e relative alterazioni
- Tempi di analisi <12 h

# Microarray



- MRSA: (*S.aureus*, *MecA*; *SCCmec*)
- VRE; (*VanA/B*; *E.faecium*; *E.faecalis*)
- KPC: (*Pho<sub>A</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*)



# Next generation sequencing

Artemis File Entries Select View Goto Edit Create Run Graph Display  
Artemis Entry Edit: SRR292770.fasta

Entry:  SRR292770.fasta  
Nothing selected

>>  
<<

NOVE\_52\_length 38919\_cov 21.618105  
800 1600 2400 3200 4000 4800 5600 6400 7200 8000

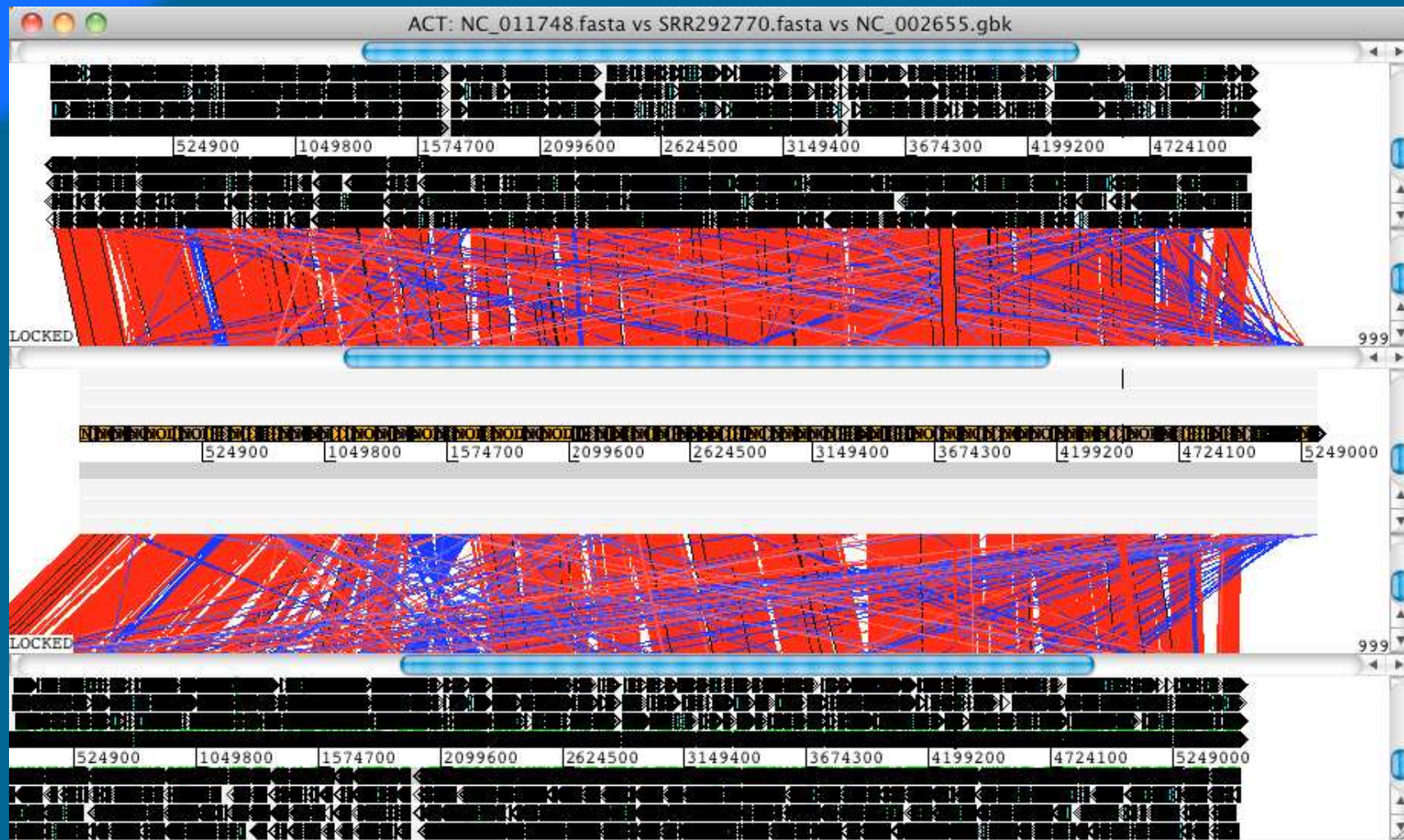
<<

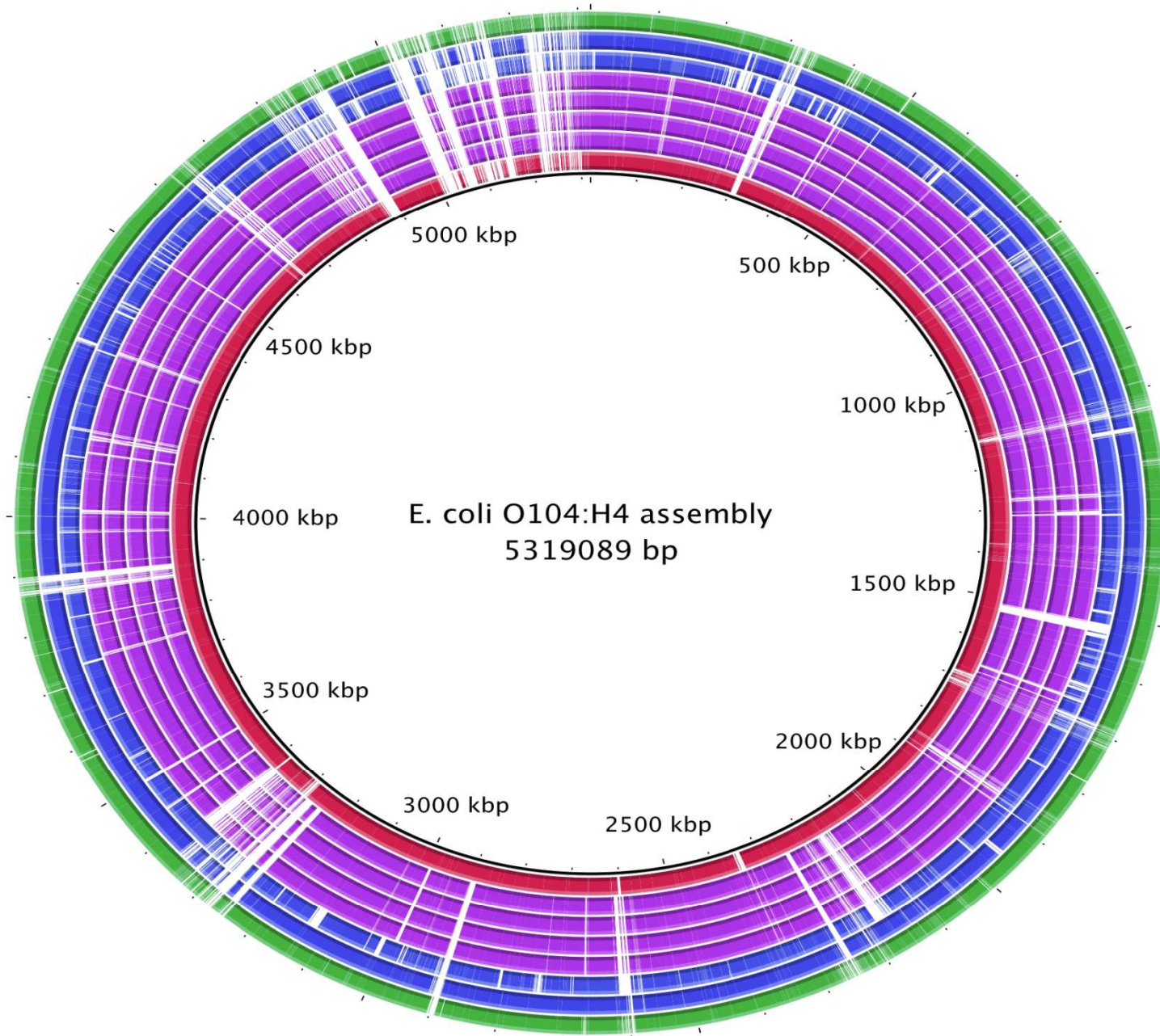
L F S L P A P P L R R \* Y R \* R S G R Q S S P Y A A S L L S S P \* P Y G Q # E A L Y M  
F S R Y Q R R H Y G G D T D D D Q G D N H R L M L L H C S L L L D L T V S K R H S T  
. F L V T S A A T T A V I Q M T I R A T I I A L C C F I A L F S L T L R S V R G T L H  
TTTTCTCGTTACCAGCGCGCCACTACGGCGGTGATACAGATGACGATCAGGGCGACAATCATCGCCTPATGCTGCTTCATGCTCTCTCTCCCTGACCTTACGGTCAAGAGGCCACTCTACAT  
20 40 60 80 100 120  
GAAAAGAGCAATGGTCGGCGCGGTGATGCCGCCACTATGCTACTGCTAGTCCCGCTGTAGTAGCGGAATACGACGAAGTAACGAGAGAAGAGGAAGTGAATGCCAGTCATTCTCCGTGAGATGTA  
. K E N G A G G S R R H Y L H R D P R C D D G # A A E N S E E G Q G # P \* Y S A S + M  
K E R # W R R W + P P S V S S S \* P S L \* R R I S S \* Q E R R R S R V T L L L C E V H  
K R T V L A A V V A T I C I V I L A V I M A K H Q K M A R K E K V K R D I L F V R C

<<

fasta_record	1	38953	NOVE_52_length 38919_cov 21.618105
fasta_record	38954	66750	NOVE_94_length 27763_cov 21.344091
fasta_record	66751	130952	NOVE_35_length 64168_cov 23.424620
fasta_record	130953	190769	NOVE_68_length 59783_cov 22.685629
fasta_record	190770	208643	NOVE_136_length 17840_cov 21.971748
fasta_record	208644	280113	NOVE_898_length 71436_cov 20.053307
fasta_record	280114	280385	NOVE_342_length 238_cov 39.205883
fasta_record	280386	280838	NOVE_340_length 419_cov 30.718376
fasta_record	280839	400035	NOVE_106_length 119163_cov 21.431620

# Next generation sequencing





**Ec55989**

- 100% identity
- 70% identity
- 50% identity

**EHEC str 1**

- 100% identity
- 70% identity
- 50% identity

**EHEC str 2**

- 100% identity
- 70% identity
- 50% identity

**EHEC str 3**

- 100% identity
- 70% identity
- 50% identity

**EHEC str 4**

- 100% identity
- 70% identity
- 50% identity

**EPEC str 1**

- 100% identity
- 70% identity
- 50% identity

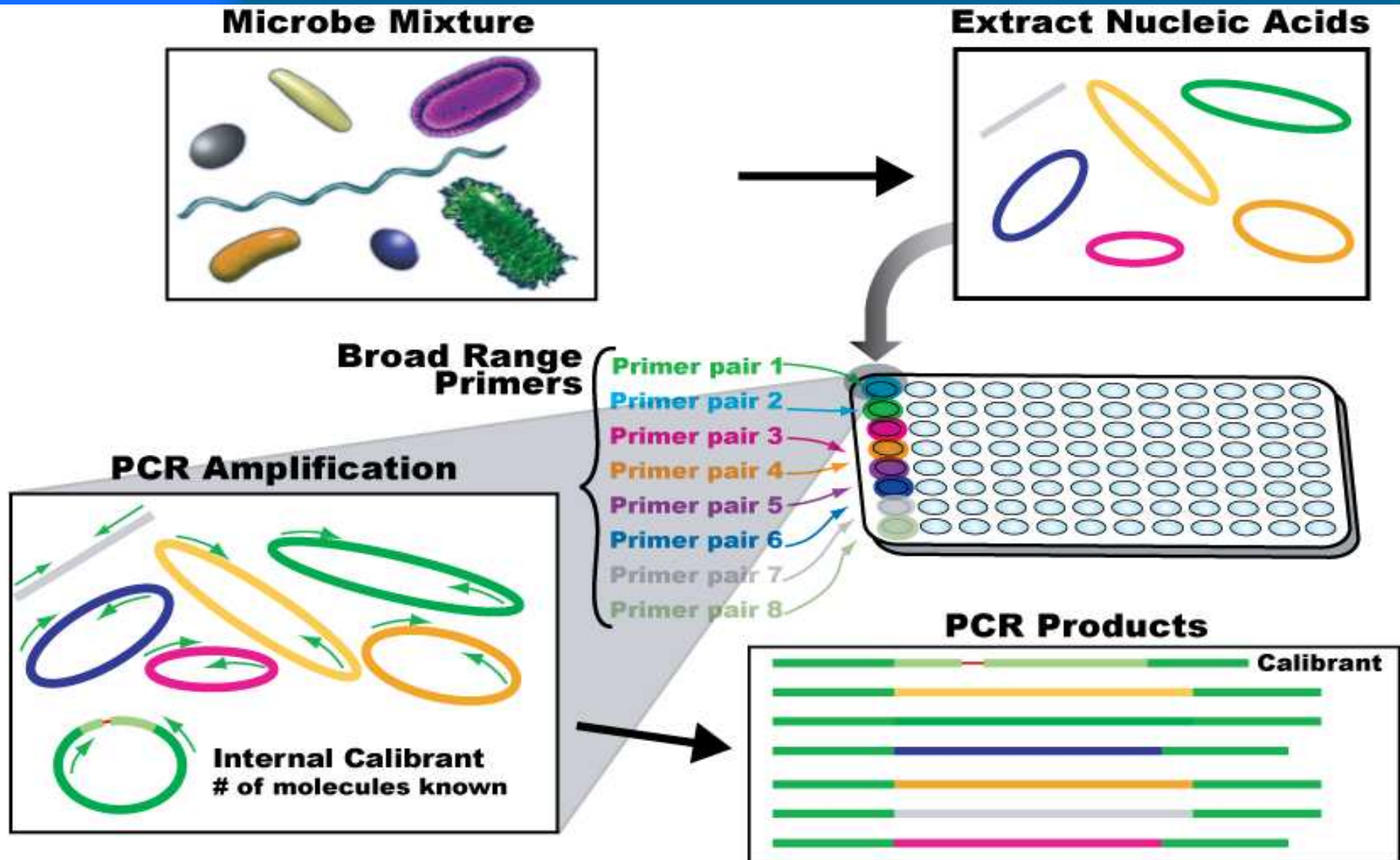
**EPEC str 2**

- 100% identity
- 70% identity
- 50% identity

**atypical EPEC**

- 100% identity
- 70% identity
- 50% identity

# Spettrometria + PCR



# Spettrometria + PCR

*Primers si legano a regioni conservate presenti in tutti (o a gruppi) batteri*  
**Target 16S & 23S rDNA**

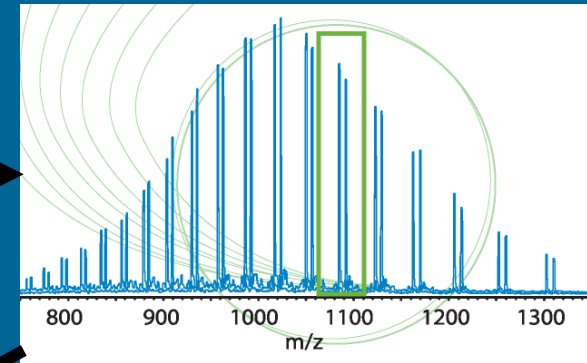
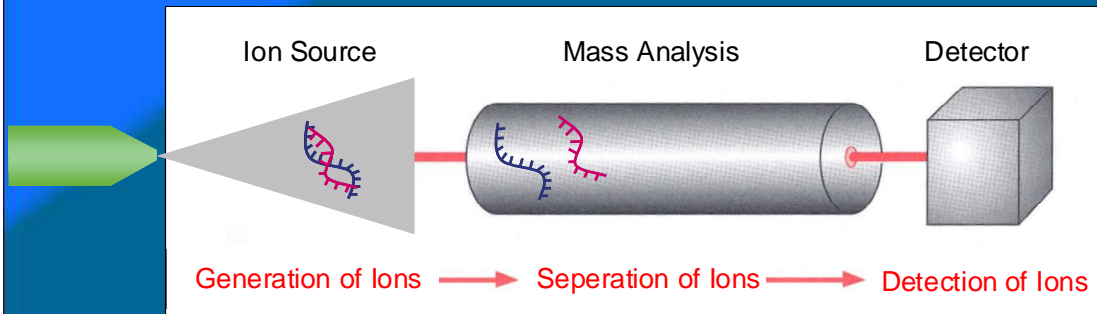
Primer pair	GGATTAGATACCCGGTAGTCC		CGCCTGGGGACTACGGCC
E. coli		ACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCC-CTTGA-GGCGTGGCTTCGGAGCTAACCGCTTAAGTCGAC	
Cox. burnetii	C	ACGCCGTCAACGATGAGAAGTACTGTTGGGAAG--TTCA-CTTCTTAGTAGCGAAGCTAACCGCTTAAGTTCTC	
Leg. pneumophila		ACGCTGTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGTTAT-ATGAAAATAATTAGTGGCGCAGCAAACCGGATAAGTTGAC	T
Ricket. prowazekii		ACGCCGTAAACGATGATGCTAGATATCGGAGG--ATTCT--CTTTCGGTTTCGCAGCTAACGCATTAAGCACTC	T
Mycb. tuberculosis		ACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGTTCCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCC	
Trep. pallidum		ACACAGTAAACGATGTACACTAGGTGTTGGGGC---ATGA--GTCTCGGCGCCGACGGAACGCATTAAGTGTAC	T T
Bacillus anthracis		ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGG-TTTCGGCCCTTAGTGCTGAAGTAAACGCATTAAGCACTC	
Staph. aureus		ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGG-TTTCGGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC	A
Staph. epidermidis		ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGG-TTTCGGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC	A
Strep. agalactiae		ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCC--TTTCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCACTC	A
Strep. mutans		ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCC--TTTCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCACTC	A
Strep. pneumoniae		ACGCTGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGACCC--TTTCGGGGCTTAGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCACTC	A
Strep. pyogenes		ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCC--TTTCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCACTC	A

*Regioni variano in differenti tipi di batteri = informazioni*



**Gli ampliconi ottenuti producono una Finger-Print univoca per ciascun batterio**

# Spettrometria + PCR



## Signal Processing Masses to Base Compositions

#	Mass	Base Count	Quantity
1	35875.03	A <sub>25</sub> G <sub>35</sub> C <sub>30</sub> T <sub>26</sub>	4260
2	35297.70	A <sub>29</sub> G <sub>33</sub> C <sub>27</sub> T <sub>25</sub>	1948
3	35619.87	A <sub>26</sub> G <sub>36</sub> C <sub>29</sub> T <sub>24</sub>	1555
4	36196.21	A <sub>23</sub> G <sub>37</sub> C <sub>31</sub> T <sub>26</sub>	1306
5	35297.70	A <sub>29</sub> G <sub>33</sub> C <sub>27</sub> T <sub>26</sub>	1949

## Base Compositions Map to Microbes

