

# Tiragem molecular de *Pseudomonas aeruginosa* pelo Sistema DiversiLab

## *P. aeruginosa* molecular typing using DiversiLab™ System

Sandra João Nogueira Fernandes<sup>1\*</sup>, Ana Constança Pinheiro Mendes<sup>2</sup>, Ana Cláudia Santos<sup>3</sup>, Ana Cristina Braga<sup>4</sup>, Maria Helena Ramos<sup>5</sup>

<sup>1,2</sup> Serviço de Microbiologia, Unidade de Biologia Molecular. Hospital de Santo António – CHPorto;

<sup>3</sup> Serviço de Microbiologia. Hospital de Santo António – CHPorto;

<sup>4</sup> Serviço de Pediatria, Maternidade Júlio Dinis – CHPorto;

<sup>5</sup> Serviço de Microbiologia. Departamento de Patologia Laboratorial. Hospital de Santo António – CHP (Centro Hospitalar do Porto)

### Resumo

O isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* na hemocultura de um recém-nascido, bem como na água de duas das incubadoras da UCIN do Centro Hospitalar do Porto, despoletou a necessidade de esclarecer a existência de um surto. Foi efectuada a tipagem molecular dos três isolados pelo sistema Diversilab, bioMérieux, que revelou elevado grau de similaridade nos perfis genómicos. A resposta atempada permitiu implementar medidas para evitar a disseminação destas infecções.

**Palavras-chave:** *P. aeruginosa*, surto, tipagem molecular

### Abstract

The isolation of *Pseudomonas aeruginosa* in the blood of a newborn, as well as in the water of two incubators of UCIN of Oporto Hospitalar Centre, triggered the need to clarify the existence of an outbreak. Molecular typing of the three isolates was performed by Diversilab system, bioMérieux, which revealed a high degree of similarity in genomic profiles. The timely response allowed intervention measures to prevent the spread of these infections.

**Keywords:** *P. aeruginosa*, outbreak, molecular typing

### Introdução

As unidades de cuidados intensivos neo-natais (UCIN) são particularmente vulneráveis à ocorrência de surtos e incidentes esporádicos de infecções associadas à prestação de cuidados de saúde (IACS). (Zabel, Heeg *et al.* 2004) A antibioterapia e o recurso a dispositivos médicos para tratamento, monitorização e suporte de vida de recém-nascidos imunocomprometidos contribuem para a elevada frequência de infecções nestas unidades hospitalares e para o consequente aumento das taxas de morbilidade e mortalidade. (Haas and Trezza 2002)

As IACS por *Pseudomonas aeruginosa* estão amplamente descritas. A natureza ubiqüitária, a elevada afinidade para ambientes húmidos e a capacidade de sobrevivência em condições adversas caracterizam este microrganismo como um patógeno comum de infecção hospitalar, sendo o 2º agente mais frequente

de pneumonia associada ao ventilador e o 3º ou 4º agente de septicemia, infecções do tracto urinário e infecções de feridas cirúrgicas. Até recentemente, a transmissão horizontal das estirpes, resultante da prestação de cuidados pelos profissionais de saúde portadores, era considerada como a via de disseminação mais comum. No entanto, a *Ps aeruginosa* é frequentemente isolada em diversos reservatórios ambientais e estudos de tipagem molecular mostram que mais de 50 % das infecções nosocomiais por esta bactéria podem ter origem nos sistemas de fornecimento e distribuição de água. (Reuter, Sigge *et al.* 2002) (Trautmann, Halder *et al.* 2009)

O principal desafio das Comissões de Controlo de Infecção (CCI) consiste na contenção da disseminação de microrganismos que possam ser relevantes, na transmissão cruzada de infecções. A vigilância epidemiológica rápida, activa e específica é fundamental e tem por objectivos encorajar os

\* sjnfernandes@gmail.com / directora.dpl@hgsa.min-saude.pt

profissionais que prestam cuidados, a cumprir as recomendações de boa prática, corrigir ou melhorar práticas específicas e avaliar de forma contínua e sistemática as taxas de infecção, no sentido de reduzir a sua incidência e detectar precocemente a ocorrência de surtos. (PNCI-2008)

Para o controlo efectivo da disseminação é imprescindível a articulação das CCI com o Laboratório de Microbiologia, permitindo identificar e diferenciar infecções isoladas da ocorrência de surtos. Os estudos fenotípicos identificam e caracterizam os isolados, mas não estabelecem relações epidemiológicas entre estes. As metodologias de tipagem molecular possibilitam, com rigor, distinguir a ocorrência de surtos de infecção, de casos esporádicos e não relacionados entre si, constituindo deste modo, ferramentas essenciais para a caracterização e acompanhamento da expansão das estirpes, identificação das fontes e vias de transmissão, para que rapidamente se possam instituir medidas de controlo e perspectivar estratégias eficazes na prevenção de novos casos.

Os métodos clássicos de tipagem molecular, capazes de relacionar geneticamente as estirpes, são laboriosos, demorados e sujeitos à subjectividade da sua interpretação, sendo de difícil utilização em laboratórios clínicos. O investimento em metodologias de genotipagem devidamente optimizadas e adaptadas à rotina laboratorial constitui uma mais-valia no controlo de infecção hospitalar com um contributo indispensável na identificação de surtos. (Doleans-Jordheim, Cournoyer *et al.* 2009)

Com este estudo pretendeu-se testar um método comercial de tipagem molecular capaz de relacionar estirpes de *P. aeruginosa* isoladas numa UCI neonatal.

## Material e Métodos

Em Maio de 2008, na UCIN da Maternidade Júlio Dinis do CHP, foi isolada uma estirpe de *P. aeruginosa* responsável por sépsis num recém-nascido (RN). Neste contexto, foram analisadas as águas das incubadoras da mesma Unidade, tendo sido isoladas estirpes de *P. aeruginosa* em duas destas.

As três estirpes foram enviadas à Unidade de Biologia Molecular do CHP para tipagem molecular utilizando o sistema DiversiLab™ (bioMérieux Clinical Diagnostics). A extracção de DNA bacteriano foi efectuada a partir de colónias isoladas provenientes de culturas puras, utilizando o UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Lab Inc). Sequências repetitivas de DNA não-codificante, intercaladas no

genoma bacteriano foram amplificadas por rep-PCR e os fragmentos amplificados foram separados por electroforese capilar – Agilent®, 2100 Bioanalyser.

A análise dos perfis electroforéticos foi efectuada recorrendo ao *software* do sistema DiversiLab, que calcula estatisticamente (correlação de Pearson) o grau de similaridade entre as estirpes testadas, caracterizando-as como: **Indistinguíveis** – nenhuma banda de diferença; **Similares** – 1 banda de diferença; **Diferentes** – 2 ou mais bandas de diferença.

Tabela 1 – Similaridades entre estirpes

Estirpes		Similaridade
Sangue	Incubadora 1	97.4%
Sangue	Incubadora 2	99.3%
Incubadora 1	Incubadora 2	99.2%

## Resultados

As estirpes isoladas e identificadas como *P. aeruginosa* apresentavam perfis fenotípicos semelhantes.

Na fig. 1 é possível observar o dendograma e a matriz de similaridades gerados pelo sistema DiversiLab™, com destaque para as estirpes isoladas na UCIN, provenientes da hemocultura do recém-nascido, da água da incubadora onde este se encontrava (Incubadora 1) e da água de uma incubadora vizinha (Incubadora 2). As percentagens de similaridade obtidas entre as três estirpes encontram-se representadas na tabela 1. (As restantes estirpes de *P. aeruginosa* correspondem a isolamentos não relacionados com este estudo).

A estirpe isolada no sangue do recém-nascido apresentou 97,4 % de similaridade com a estirpe isolada na água da incubadora onde este se encontrava (incubadora 1). A similaridade entre as estirpes isoladas no sangue do RN e na incubadora vizinha (incubadora 2) foi de 99,3 % e entre as estirpes isoladas na água das duas incubadoras obteve-se uma similaridade de 99,2 %.

As matrizes de similaridade e os electroferogramas permitem analisar e comparar os perfis genómicos das estirpes estudadas e estabelecer a grandeza das relações genéticas entre elas.

A fig. 2 sobrepõe os electroferogramas das estirpes isoladas no sangue do RN e na água da respectiva incubadora, observando-se uma única banda de diferença entre elas, o que as classifica como similares, logo, geneticamente relacionadas.

Figura 1 – Matriz de similaridades

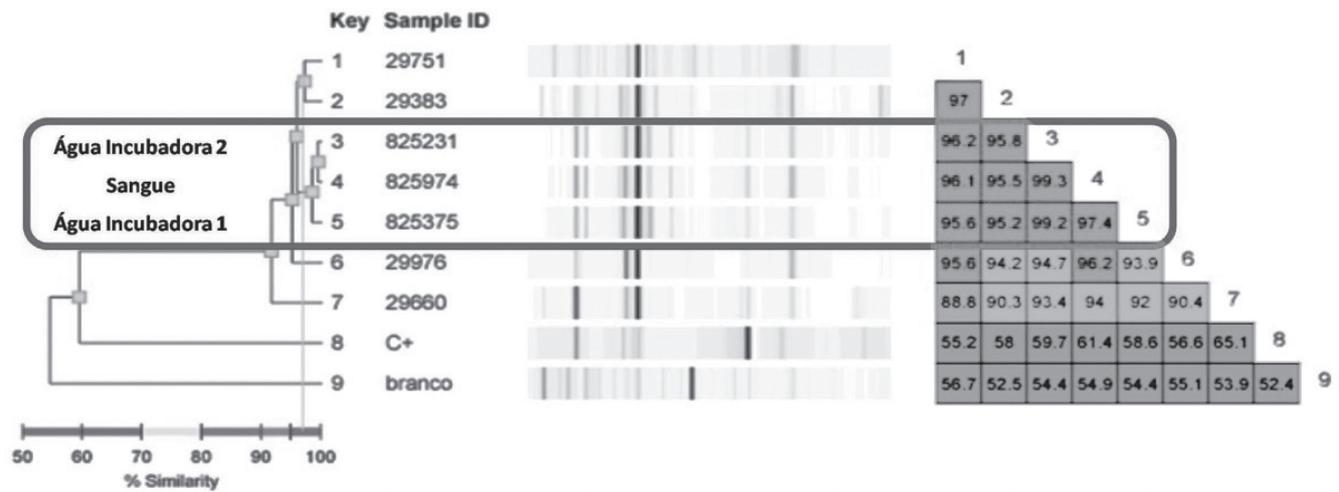
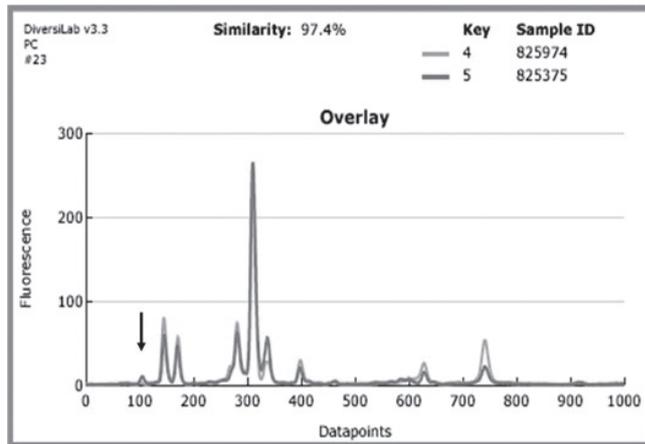
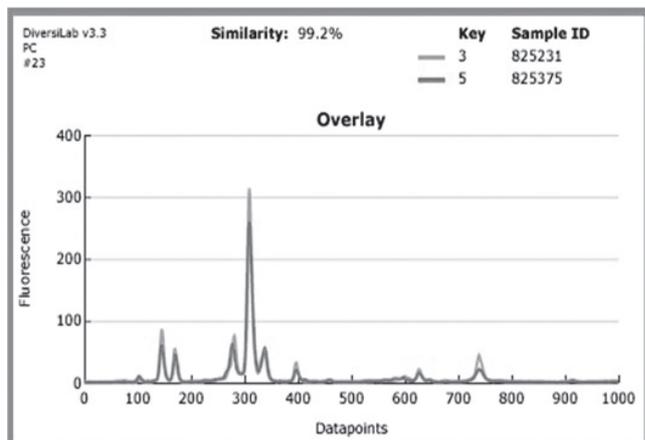


Figura 2 – Electroferogramas: Sangue/Incubadora 1



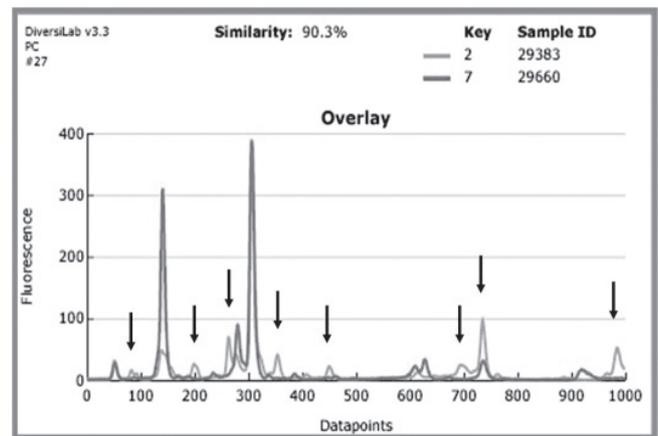
A comparação dos perfis genômicos das estirpes isoladas nas águas das incubadoras, cujos electroferogramas se encontram representados na fig. 3, mostrou não existir diferença no número de bandas, o que permitiu classificar estas estirpes como indistinguíveis.

Figura 3 – Electroferogramas: Incubadora 1/Incubadora 2



A fig. 4 representa um exemplo de estirpes não relacionadas, com mais do que 2 bandas de diferença entre elas, concluindo-se serem estirpes diferentes, e portanto geneticamente não relacionadas.

Figura 4 – Electroferogramas de estirpes não relacionadas



### Conclusão

A conjugação do rep-PCR com o software de análise de dados do sistema DiversiLab™, resulta num método simples, estandardizado, reprodutível e razoavelmente automatizado, capaz de estabelecer relações genéticas entre isolados num curto espaço de tempo (os resultados foram obtidos em aproximadamente 5 horas), permitindo a sua utilização no laboratório clínico.

Este sistema de tipagem molecular possibilitou relacionar os casos verificados da UCIN, permitindo concluir que o episódio de sépsis do RN poderá ter tido origem na água da incubadora.

Na sequência da infecção descrita neste estudo, as medidas de controlo instituídas foram tomadas tendo por base os resultados do estudo fenotípico. No entanto, em acontecimentos futuros, perante a suspeita de ocorrência de um surto, a utilização do sistema DiversiLab™ poderá ser a primeira forma de estabelecer relações entre isolados, excluir casos não relacionados e, rapidamente, identificar fontes de contaminação, de forma a ser possível a sua eliminação tão cedo quanto possível.

## **Bibliografia**

1. Doleans-Jordheim, A, Cournoyer, B. *et al.* "Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 2009; 28(9): 1105-11.
2. Haas, J. P. and L. A. Trezza. "Outbreak investigation in a neonatal intensive care unit." *Semin Perinatol*; 2002; 26(5): 367-78.
3. Reuter, S., A. Sigge, *et al.* "Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets." *Crit Care Med*; 2002; 30(10): 2222-28.
4. Trautmann M, Halder S, *et al.* "Reservoirs of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit. The role of tap water as a source of infection." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*; 2009; 52(3): 339-44.
5. Zabel L. T., Heeg *Pet al.* "Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*-isolates in a neonatal intensive care unit over a one year-period." *Int J Hyg Environ Health*; 2004; 207(3): 259-66.
6. Costa, A C, Silva M G, Noriega E, "Programa Nacional de Prevenção e Controlo de Infecção Associada aos Cuidados de Saúde – Manual de Operacionalização", 2008.