

Métodos de Tipagem Molecular:

Ferramentas Básicas para o Controle de Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde



OSWALDO CRUZ
HOSPITAL ALEMÃO

25 de abril de 2018

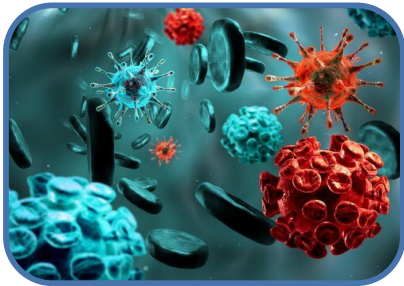
Enfa. MsC. Lígia Abraão

Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
Hospital Alemão Oswaldo Cruz - HAOC
Doutora em Doenças Tropicais - Faculdade
de Medicina de Botucatu, FMB-UNESP
Membro Grupo de Pesquisa em Políticas
Públicas, Epidemiologia e Tecnologias na
Prevenção de IRAS, da Escola de
Enfermagem da Universidade de São Paulo

Plano de aula

- ✓ Ferramentas básicas de Tipagem utilizadas
- ✓ Ferramentas básicas de Tipagem Molecular
 - Baseadas em amplificação:
 - Técnicas de PCR (convencional, multiplex, RT-PCR)
 - ERIC PCR, RAPD
 - Baseadas em restrição:
 - PFGE
 - RFLP
 - Baseadas em sequenciamento:
 - MLST
- ✓ Técnicas Moleculares e o Controle de IRAS

Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde – IRAS



- Problema de Saúde Pública
Esforços para melhoria e controle



- Agentes causadores: vírus, fungos e parasitas
- Destaque: Bactérias



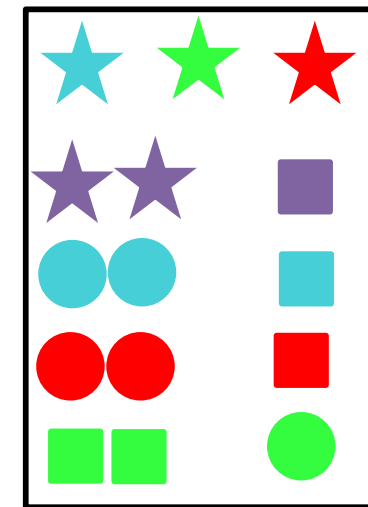
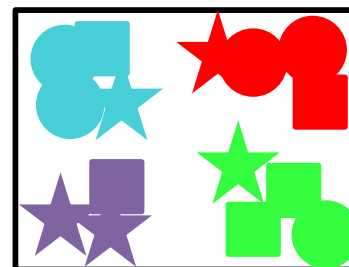
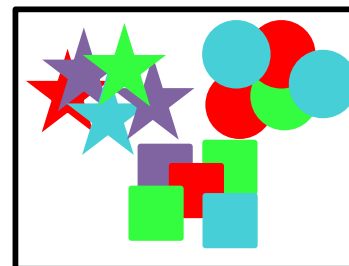
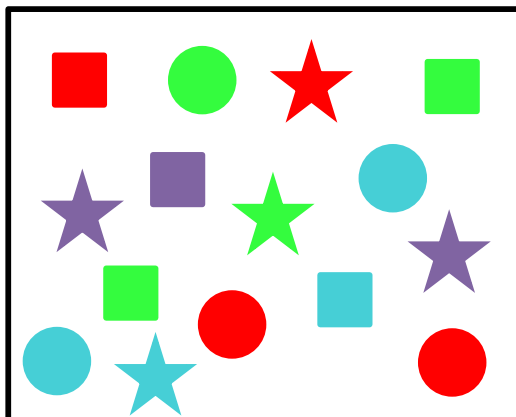
- Compreensão sobre a distribuição de patógenos

Métodos
de tipagem

Métodos de tipagem

- ✓ Identificação e rastreamento de uma bactéria em investigações epidemiológicas
- ✓ Caracterização mais pormenorizada de um microrganismo
- ✓ Envolve técnicas fenotípicas e/ou moleculares
- ✓ Nível de discriminação depende da pergunta formulada
- ✓ Diferentes metodologias → diferentes respostas

✓ Qual é a pergunta/objetivo?



Métodos de tipagem



- O que é?
 - Caracterização mais detalhada do microrganismo
- Qual a finalidade ?
 - O achado de cepas idênticas sugerem que estes microrganismos pertençam a um mesmo clone e tenham se originado de uma fonte comum de contaminação
- Como avaliar?
 - Poder discriminatório: capacidade de diferenciar amostras muito semelhantes e não relacionadas epidemiologicamente
 - Tipabilidade: capacidade da técnica de avaliar diferentes microrganismos

Métodos de tipagem



- **Vantagens**
- Vigilância de bactérias resistentes
- Identificação de surtos e pseudo surtos
- Tipagem de microrganismos para direcionamento da terapêutica
- Diferenciação entre colonização e infecção
- Otimização das medidas de precaução e isolamento
- Detecção de fontes diversas de patógenos e disseminação de clones epidêmicos
- Distinguir perfis de virulência
- Diferenciar recidivas de processos de reinfecção

Métodos de tipagem

- Métodos fenotípicos:
 - Baseados em características morfológicas (espécie/gênero dependente)

Biotipagem

A. Uninoculated strip



B. *E. coli* results after 24 hours



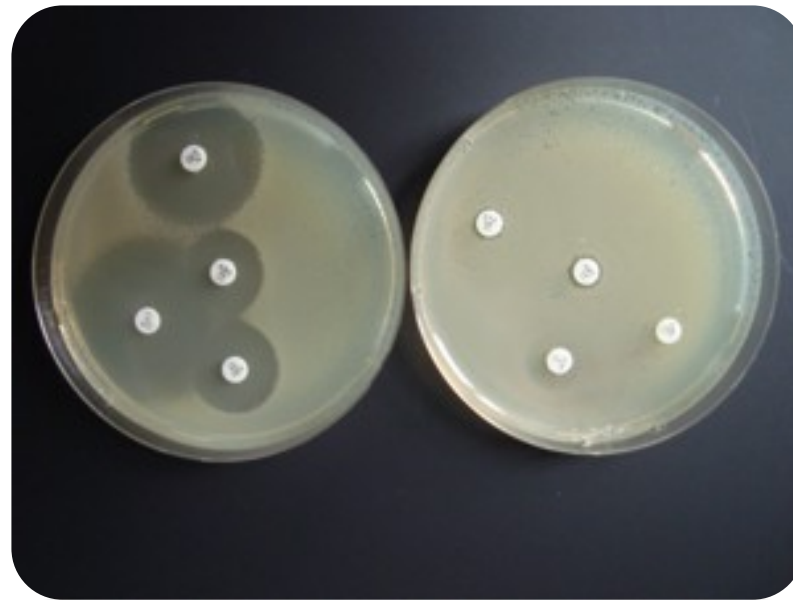
C. *P. mirabilis* results after 24 hours



Métodos de tipagem

- Métodos fenotípicos:
 - Baseados em características morfológicas (espécie/gênero dependente)

Antibiotipagem: comparação de perfis de susceptibilidade



Tipagem Molecular

- Métodos de tipagem molecular

Baseados em características estruturais (genéticas)

Detecção de microrganismos epidemiologicamente relacionados, por meio da análise de suas características genéticas, que envolvem a relação entre as espécies, fatores de virulência, resistência aos antimicrobianos, perfil clonal, mutações entre outros.





Técnicas moleculares: baseadas em amplificação



OSWALDO CRUZ
HOSPITAL ALEMÃO

Tipagem Molecular

- Técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase – PCR
- **PCR Convencional (qualitativa)**
- É um procedimento rápido que possibilita a manipulação *in vitro* de fragmentos de DNA específicos, partindo de uma quantidade mínima de DNA.
- Desenvolvida em 1983 - *Kary Mullis*
- Detecção de doenças hereditárias, a identificação características genéticas, diagnóstico de doenças infecciosas entre outros



(RAHMAN et al, 2013)

Tipagem Molecular

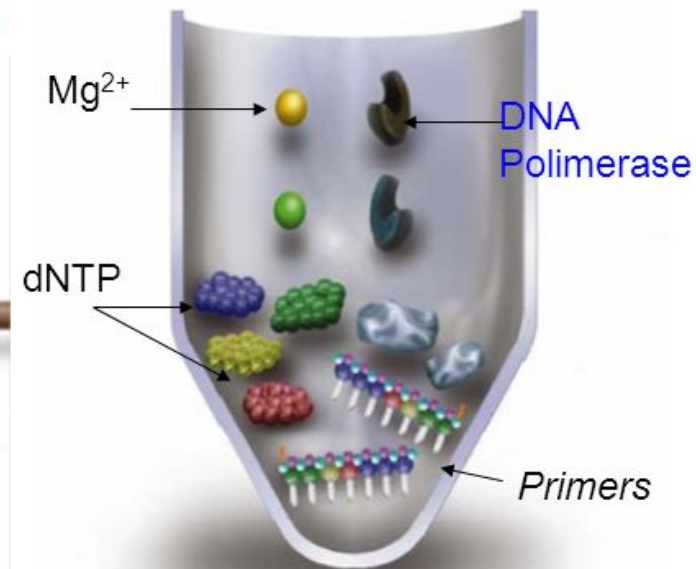
- **PCR Convencional (qualitativa)**
- É uma reação em cadeia, onde uma molécula é utilizada para produzir várias cópias do fragmento de interesse
- Duplicação: acompanhada de proteínas específicas, ou seja, enzimas conhecidas como polimerases que são capazes de construir blocos de DNA individuais formando cadeias moleculares longas
- Blocos de DNA: quatro bases de nucleotídeos: adenina (A); timina (T); citosina (C) e guanina (G)
- Fragmento de DNA: primer ou iniciador (se ligam aos blocos, estendendo ao longo de toda a molécula), servirá como molde
- As enzimas produzirão cópias exatas dos moldes indicados

Tipagem Molecular

(GARIBYAN et al , 2013; POWLEDGE, 2004)

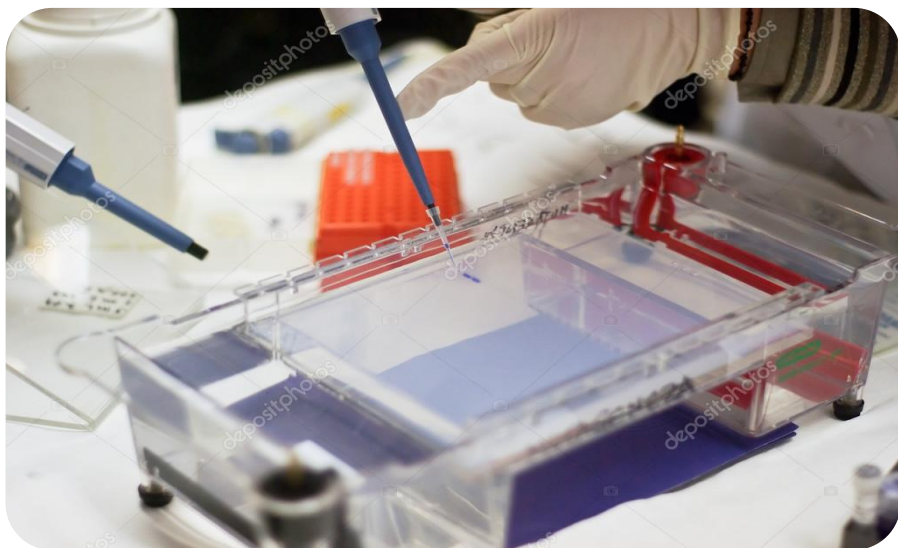
- **PCR Convencional (qualitativa)**

- **Quais os componentes?**



- Reação é realizada em pequenos tubos que são colocados em um aparelho conhecido como **termociclador**
- 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão
- Para visualização: o produto do DNA é corado com um corante químico, e passa pelo **método de eletroforese com gel de agarose** (permite a separação dos produtos de DNA de acordo com o tamanho e a carga) visível através da **radiação ultravioleta**.

PCR Convencional (qualitativa)



Eletroforese em gel de agarose



Visualização do produto amplificado sob luz UV

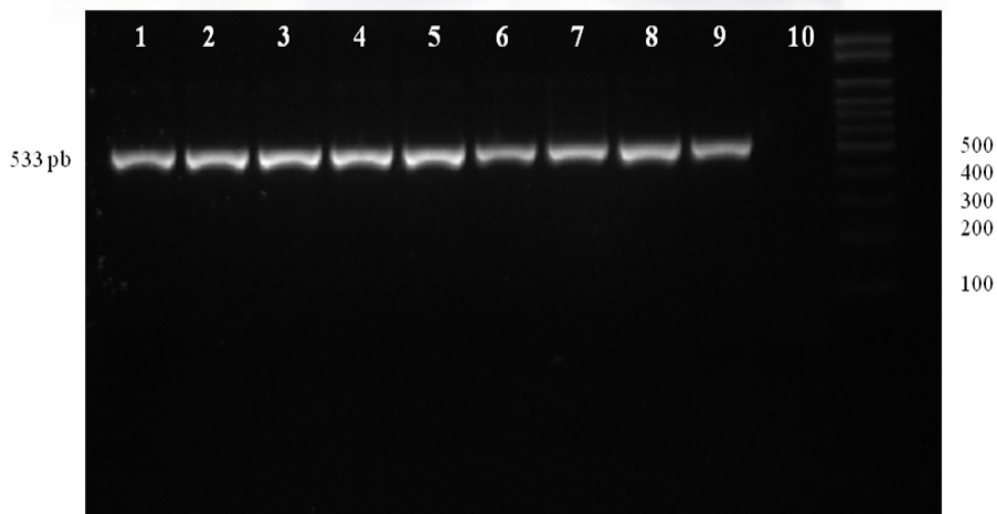


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando amostras de *S. aureus*, *mecA* positivas nos poços 1 a 8, sendo 7 e 8 contactantes, poço 9 controle positivo (ATCC 33591) e o poço 10 controle negativo (ATCC 25923).

- PCR Convencional (qualitativa)



Rev Soc Bras Med Trop 50(5):685-688, September-October, 2017
doi: 10.1590/0037-8682-0209-2017

Short Communication

Evaluation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil

Vinícius Victor Lorenzoni^{[1],[2]}, Danielly da Costa Silva^{[1],[2]}, Roberta Filipini Rampelotto^{[1],[2]},
Patrícia Chaves Brites^[3], Bárbara Villa^{[2],[3]} and Rosmari Hörner^[1]

[1]. Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [3]. Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract

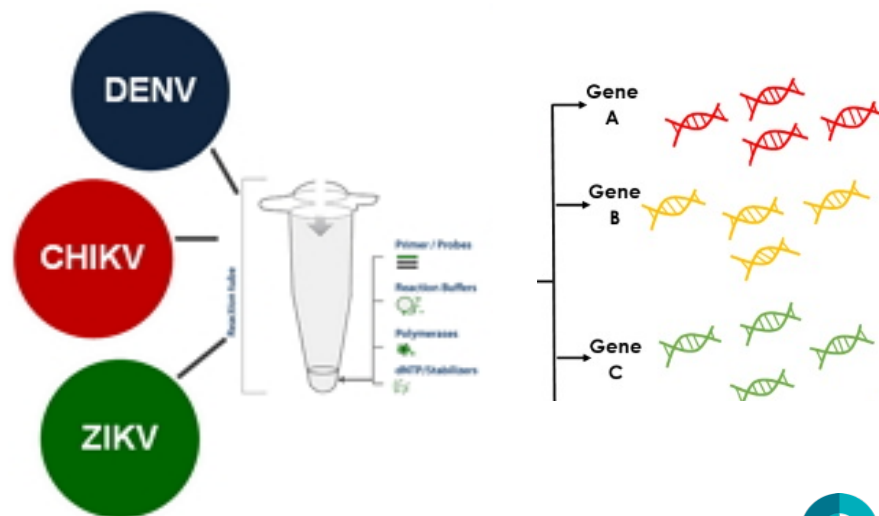
Introduction: The rapid global spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) is a threat to the health system. **Methods:** We evaluated the antimicrobial susceptibility profiles of 70 CRE isolated in a tertiary hospital in Brazil between August and December 2015, and determined their resistance mechanisms. **Results:** The most prevalent microorganism was *Klebsiella pneumoniae* (95.7%); it showed high-level resistance to carbapenems (>98%), with sensitivity to colistin (91.4%) and amikacin (98.6%). The *bla*_{KPC} gene was detected in 80% of the CRE isolates. **Conclusions:** Evaluation of bacterial resistance contributes to an appropriate treatment, and the reduction of morbimortality and dissemination of resistance.

Keywords: *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Multiresistance.

- ✓ Testes fenotípicos para detecção da resistência aos carbapenêmicos
- ✓ Testes moleculares PCR → Mecanismos de Resistência

PCR - Multiplex

- Mais eficiente e prática
- Utiliza de vários conjuntos de *primers* em um só tubo de reação
→ detecção simultânea de vários genes
- Os *primers* devem apresentar temperaturas de anelamento similares e tamanhos distintos, facilitando a interpretação dos mesmos.





The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Original article

Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction

Taisa Trevizani Rocchetti^{a,b,*}, Katheryne Benini Martins^a,
Patricia Yoshida Faccioli Martins^a, Rogério Antonio de Oliveira^c,
Alessandro Lia Mondelli^d, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza^b,
Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha^a

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus* spp. – both *S. aureus*, including methicillin-resistant strains (MRSA) and coagulase negative staphylococci (CoNS) – are relevant agents of healthcare-associated infections. Therefore, the rapid recognition of MRSA and methicillin-resistant CoNS from blood stream infections is critically important for patient management. It is worth noting that inappropriate empiric therapy has been associated with higher in-hospital mortality.

Material and methods: In this study we evaluated a multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) standardized to detect *Staphylococcus* spp., *S. aureus*, and *mecA* gene-encoded oxacillin resistance directly from blood culture bottles. A total of 371 blood cultures with Gram-positive microorganisms confirmed by Gram-stain were analyzed. Results from multiplex PCR were compared to phenotypic characterization of isolates.

Results: *Staphylococcus aureus* was detected in 85 (23.0%) blood cultures and CoNS in 286 (77.0%). There was 100% agreement between phenotypic and multiplex PCR identification. Forty-three (50.6%) of the 85 *S. aureus* carried the *mecA* gene and among the 286 CoNS, 225 (78.7%) were positive for the *mecA* gene.

- ✓ PCR Multiplex direto de garrafas de hemoculturas:
- ✓ Diferenciação entre *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa
- ✓ *mecA*

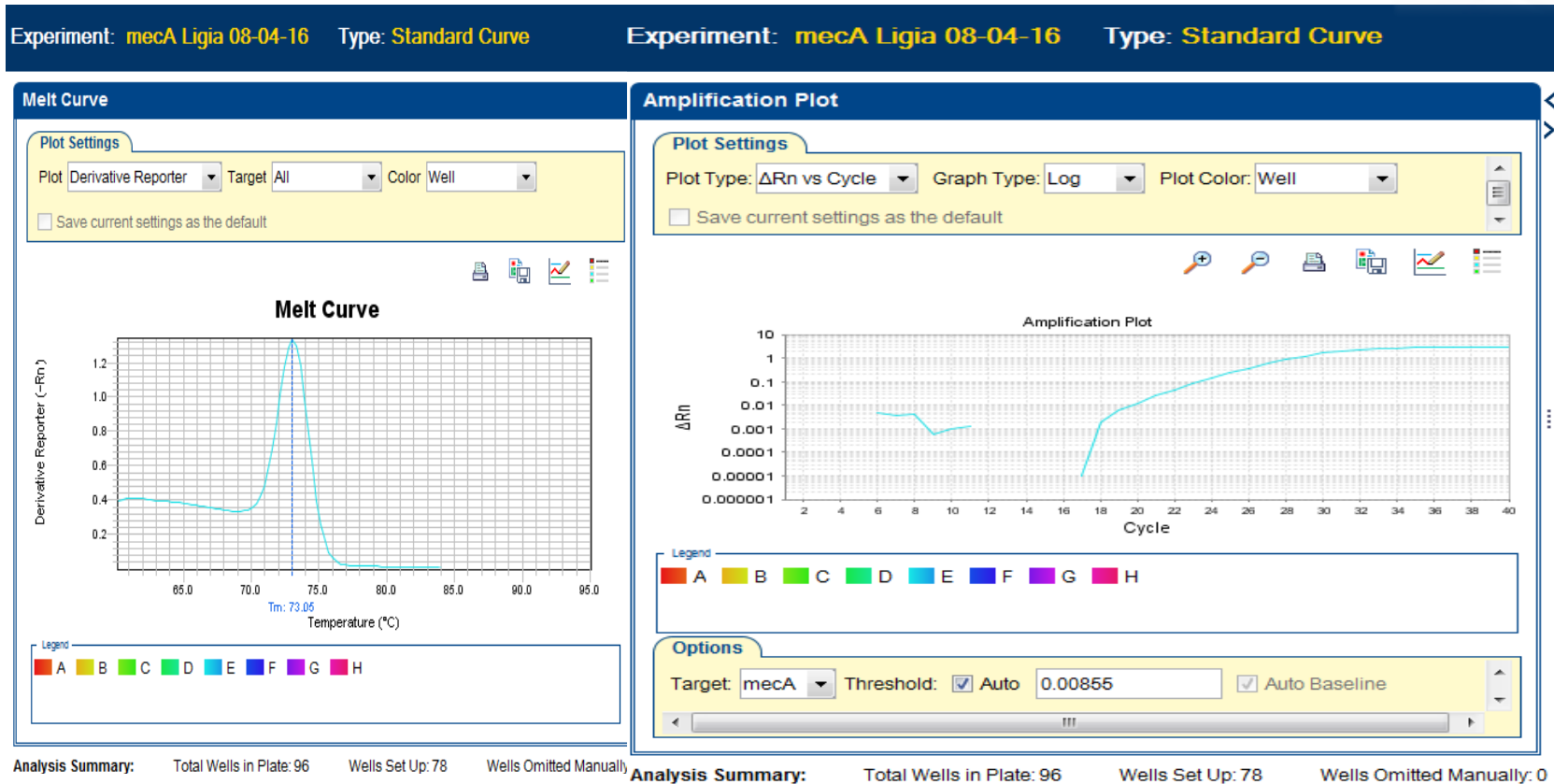


PCR Quantitativo ou PCR em tempo real (RT-PCR)

- Indica a quantidade de um DNA específico ou a presença de um determinado gene na amostra
- Permite simultaneamente a detecção (em tempo real) e a quantificação do produto da PCR, ao mesmo tempo que estão sendo sintetizados
- **Padrão ouro:** expressão gênica
- **Vantagens:** mede em tempo real a progressão do processo de amplificação do DNA, não precisa de gel de agarose



PCR Quantitativo ou PCR em tempo real (RT-PCR)



- A quantificação do DNA alvo em cada ciclo de um experimento baseia-se na mensuração da emissão de um corante fluorescente
- Os corantes se ligam a cadeia dupla de DNA e após um processo de excitação emitem luz

PCR Quantitativo ou PCR em tempo real (RT-PCR)

First draft submitted: 3 October 2017; Accepted for publication: 6 December 2017; Published online: 9 March 2018

Future
MICROBIOLOGY

Evaluation of reference values for phenotypic tests to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci

Luiza Pinheiro^{*,1,2}, Priscila L Mello¹, Ligia M Abraão¹, José Eduardo Corrente³ & Marla de Lourdes RS Cunha¹

¹Department of Microbiology & Immunology, Institute of Biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu 18618-970, Brazil

²Department of Anatomic Pathology, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru 17034-971, Brazil

³Department of Biostatistics, Institute of Biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu 18618-970, Brazil

* Author for correspondence: Tel.: +55 143 880 0428; lutzapinho@ibb.unesp.br

Aim: To evaluate the adequacy of the disc-diffusion test and E-test[®] compared with detection of *mecA* for coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures, nasal swabs and wounds. **Results:** Agreement between all techniques was observed in 65.7% of cases. The greatest discrepancy between *mecA*/susceptible E-test was observed for non-*epidermidis* species. A resistance breakpoint ≤ 19 mm using the oxacillin disc was found to best classify all coagulase-negative staphylococci isolates; *Staphylococcus epidermidis*, ≤ 19 mm (oxacillin) and ≤ 27 mm (cefoxitin); *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus capitis*, ≤ 21 mm (oxacillin) and ≤ 18 mm (cefoxitin); *Staphylococcus warneri*, MICs ≥ 0.75 mg/l. **Conclusion:** Although no longer recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute, we observed some cases in which only the oxacillin disc-diffusion test detected resistance. The discrepancy between phenotypic tests and *mecA* is probably due to heterogeneity and borderline resistance.

Detection of the *mecA* gene

Real-time PCR for detection of the *mecA* gene was performed with the StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Life Technologies, CA, USA) according to Pinheiro *et al.* [23] using the primers described by Vandecasteele *et al.* [24].

ERIC-PCR

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

- A técnica ERIC-PCR está ligada amplificação de um consenso intergênico repetitivo de enterobactérias
- Elementos repetitivos → regiões intergênicas no genoma de diversas bactérias, e são considerados como regiões altamente conservadas
- Essa ferramenta permitem elucidar relações internas e entre espécies bacterianas



(MANCUSO et al, 2007).

RAPD

(Random Amplified Polymorphic DNA)

- É uma técnica baseada na identificação da variação genética através da amplificação do DNA genômico: primers de sequência arbitrária com 10 nucleotídeos
- Os produtos amplificados são separados em um gel de agarose e corados com brometo de etídio
- A análise da variação genética permite a avaliação da diversidade genética devido à sua capacidade de gerar marcadores aleatórios de todo o genoma
- Não exige conhecimento específico da sequência de DNA do organismo alvo, ou seja, não requer pré-sequenciamento do DNA
- Simples e de baixo custo



Técnicas moleculares: baseadas em restrição



OSWALDO CRUZ
HOSPITAL ALEMÃO

RFLP-PCR

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

- RFLP: técnica baseada em polimorfismos no comprimento do fragmento de restrição; utilizada para estudos do genoma
- A detecção de RFLPs envolve a fragmentação de uma amostra de DNA através do uso de uma enzima de restrição
 - Enzima → reconhece e corta a molécula de DNA em uma pequena sequência específica (digestão de restrição)
 - Os fragmentos resultantes são separados de acordo com os seus comprimentos pelo método de eletroforese em gel de agarose
 - Membrana de nylon → com sondas de DNA marcadas dirigidas contra o fragmento de estudo

Aparecerão bandas correspondentes a fragmentos de restrição do DNA original que têm sequências total ou parcialmente complementares à sonda

PFGE

(Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

- Estudo dos padrões de restrição do DNA bacteriano, o que envolve a lise do microrganismo e digestão do DNA cromossômico através de endonucleases
- Diferentes enzimas utilizadas para diferentes organismos, de acordo com o número de sítios de restrição no genoma

Spe I



Xba I



Not I



Sma I

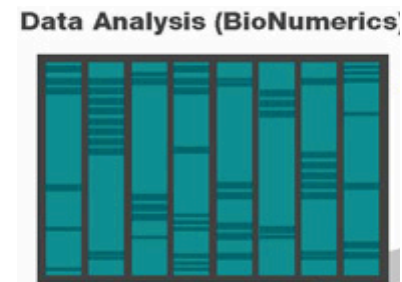
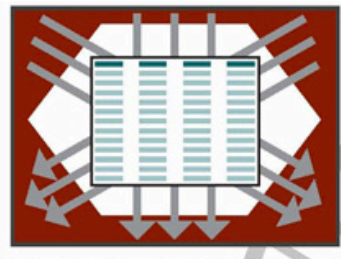
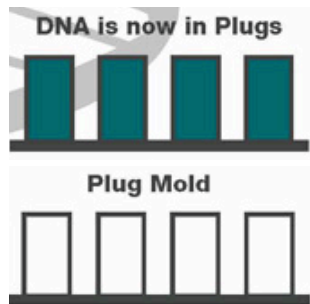
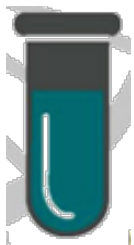


PFGE

(Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

- Os fragmentos gerados pelas enzimas de restrição são transferidos para um gel de agarose e submetidos à eletroforese em um campo pulsado (alteração do campo elétrico)
- Capaz de separar grandes moléculas de DNA (maiores do que 40 - 50 kb)
- O padrão de bandas é analisado através de softwares, tais como *BioNumerics (Applied Maths)* e *GelCompar (Sint-Martens-Latem, Bélgica)*

✓ PFGE é considerado uma excelente técnica de discriminação de linhagens



Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A Population-Based Survey

Fabiana Venegas Pires¹, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha², Lígia Maria Abraão¹, Patrícia Y. F. Martins², Carlos Henrique Camargo², Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza^{1*}

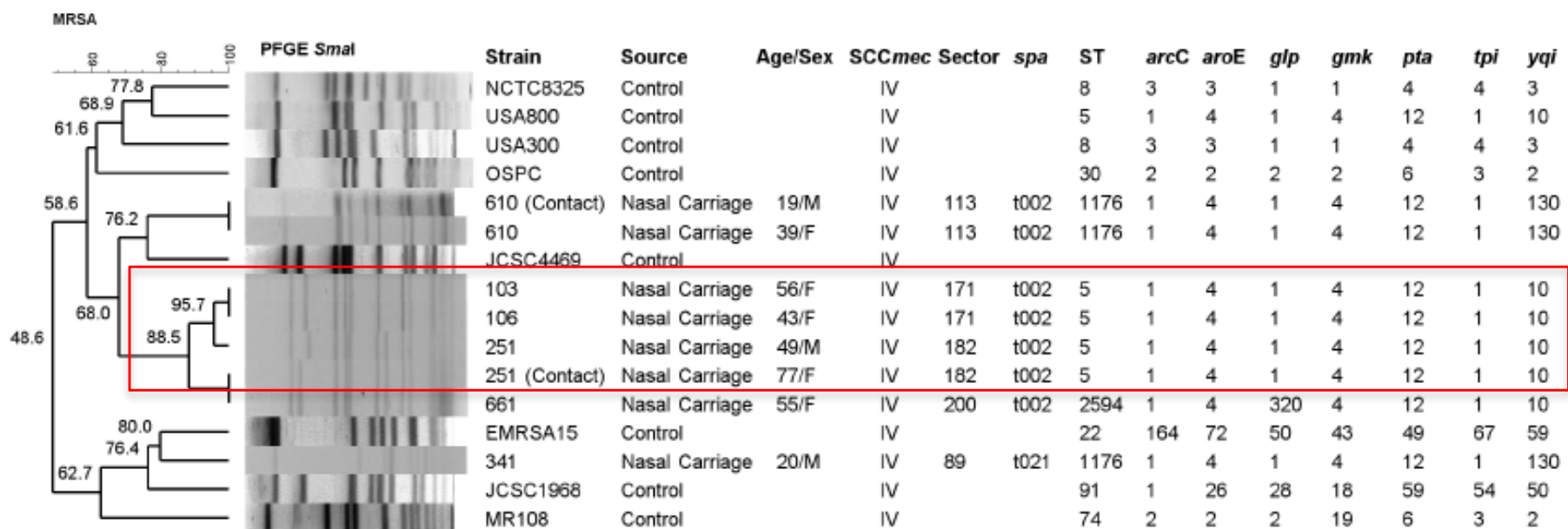


Figure 1. Dendrogram showing Pulsed Field Gel Electrophoresis typing of the study isolates, alongside with results from Multilocus Sequence Typing and *spa* typing. International SCCmec type IV clones are included as controls. Note. Data on age/gender and urban area typing are included. Control strains were kindly provided by Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari (Universidade Federal de São Paulo, City of São Paulo, São Paulo State, Brazil) and Dr. Agnes Marie Sá Figueiredo (Universidade Federal do Rio de Janeiro, City of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro State, Brazil). doi:10.1371/journal.pone.0092537.g001

PFGE

(Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

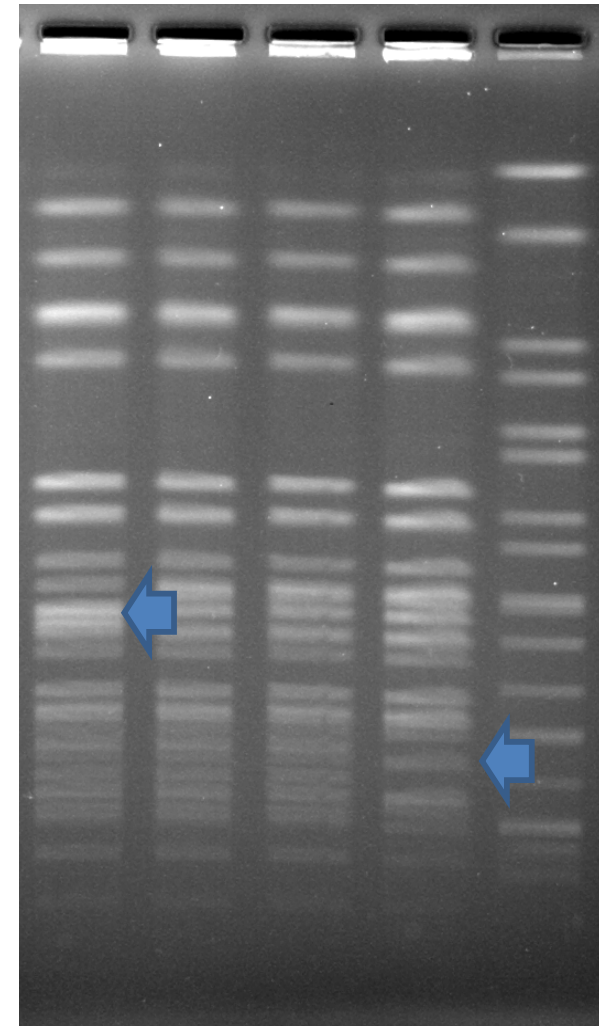


- **Aplicações**

- Investigações de surtos

- * ***Diferenças dos perfis de restrição***

- Surto em andamento (Variações do perfil)
- Fonte comum (Mesmo perfil)





Técnicas moleculares: baseadas em sequenciamento



OSWALDO CRUZ
HOSPITAL ALEMÃO

MLST

(Multilocus sequence typing)

- MLST é um método altamente discriminatório
- Sequenciamento para caracterização de isolados bacterianos, com base na função das sequências de fragmentos internos de sete genes constitutivos (*housekeeping genes*)
- 7 genes constitutivos = variabilidade “reduzida”
- Varia entre os gêneros ou entre as espécies

Gene	arcc	aroe	glpf	gmk	pta	tpi	yqil
------	------	------	------	-----	-----	-----	------

Staphylococcus aureus

MLST

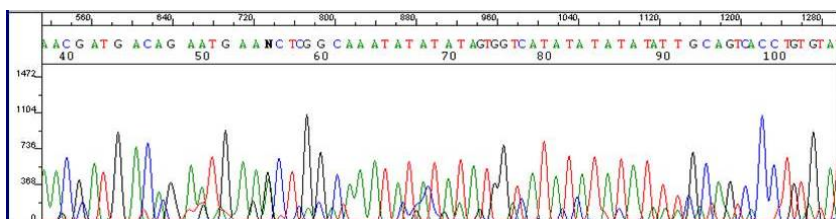
Vantagem da técnica MLST é a possibilidade de comparar os dados dessas sequências entre laboratórios

- Para cada fragmento de gene, diferentes sequências são designadas de acordo alelos distintos
- Os isolados são definidos pelos alelos em cada um dos sete loci *housekeeping genes*, o perfil alélico ou tipo sequência de tipo ST – *sequence typing*

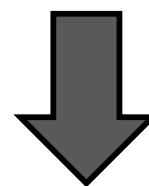
Staphylococcus aureus



Amplificação/Sequenciamento



Consulta banco de dados para definir o alelo



Sequence Type (ST) 1

Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A Population-Based Survey

Fabiana Venegas Pires¹, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha², Lígia Maria Abraão¹, Patrícia Y. F. Martins², Carlos Henrique Camargo², Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza^{1*}

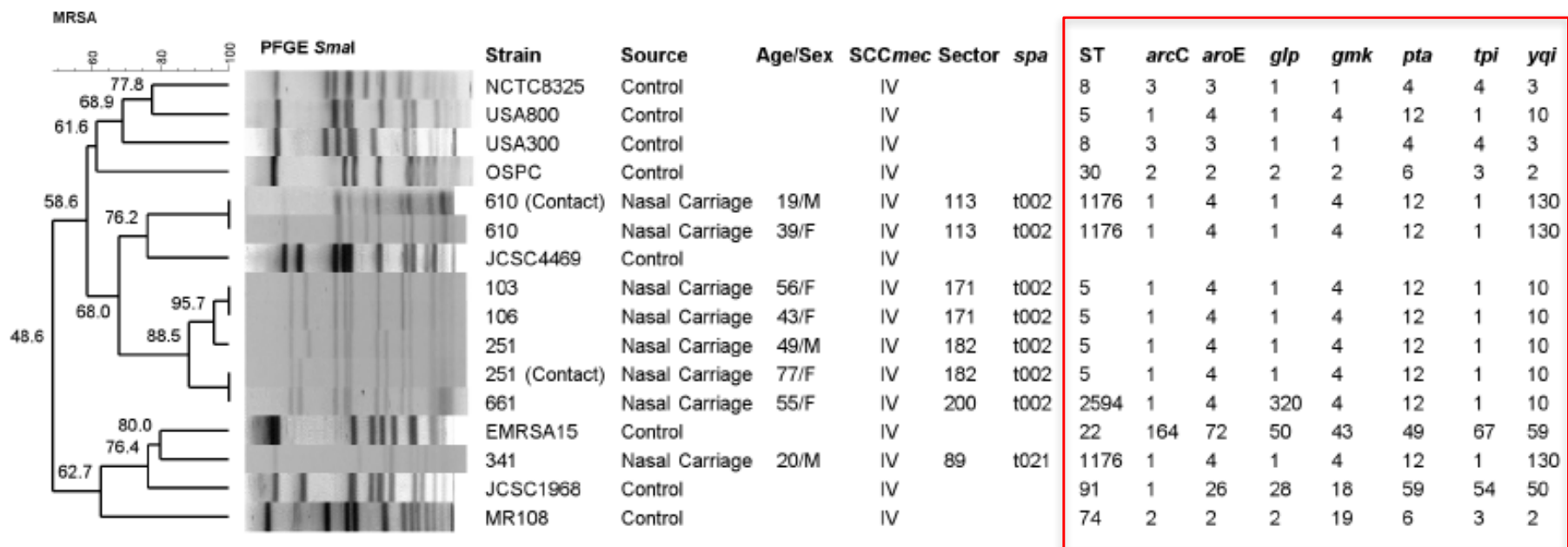


Figure 1. Dendrogram showing Pulsed Field Gel Electrophoresis typing of the study isolates, alongside with results from Multilocus Sequence Typing and spa typing. International SCCmec type IV clones are included as controls. Note. Data on age/gender and urban area typing are included. Control strains were kindly provided by Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari (Universidade Federal de São Paulo, City of São Paulo, São Paulo State, Brazil) and Dr. Agnes Marie Sá Figueiredo (Universidade Federal do Rio de Janeiro, City of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro State, Brazil). doi:10.1371/journal.pone.0092537.g001



Técnicas Moleculares e o Controle de IRAS



OSWALDO CRUZ
HOSPITAL ALEMÃO

Técnicas Moleculares e o Controle de IRAS

- Situações de surtos
- Situações endêmicas
- Pseudo surtos
- Disseminação de Clones

Técnicas Moleculares e o Controle de IRAS

Major Article

Pseudooutbreak of rapidly growing mycobacteria due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in a digestive and respiratory endoscopy unit caused by the same clone as that of a countrywide outbreak



- Em 2011 no Brasil em uma unidade de endoscopia e broncoscopia:
 - Pseudo surto por Micobátéria de crescimento rápido:
Mycobacterium abscessus susp. *bolletii*
- Em 1 semana: 3 pacientes apresentaram culturas de lavado broncoalveolar - LBA + para o *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*
- Pacientes eram assintomáticos → contaminação dos broncoscópios?

Pseudo surto – micobactéria de crescimento rápido

Major Article

Pseudooutbreak of rapidly growing mycobacteria due to *Mycobacterium abscessus* subsp *bolletii* in a digestive and respiratory endoscopy unit caused by the same clone as that of a countrywide outbreak



- Coletadas amostras: broncoscópios, endoscópios, máquinas utilizadas para desinfecção e água de abastecimento
- Técnicas de PCR e PFGE para identificação do perfil clonal dos isolados
- Identificado *Mycobacterium*: amostras dos broncoscópios, endoscópios, máquinas de desinfecção e também na água de abastecimento
- PCR: 3 tipos de *Micobacterium*
- PFGE: 2 pacientes apresentavam *Mycobacterium abcessus* susp. *bolletti* idênticos aos encontrados na água
- Clone já descrito em outros surtos no Brasil.

Tipagem Molecular X Controle de IRAS

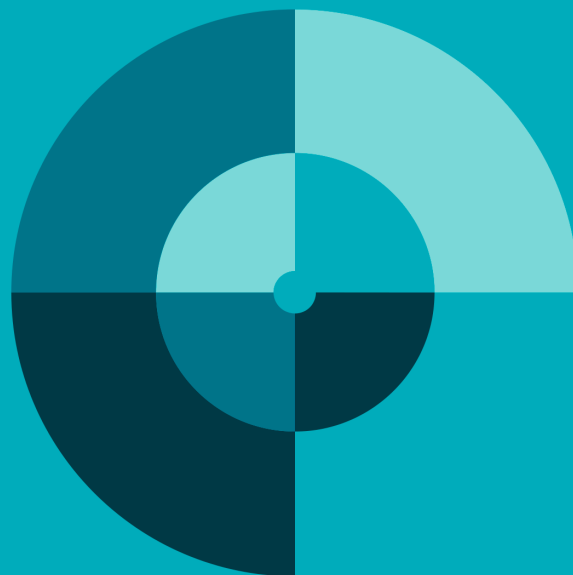
- ✓ Identificação de alterações em perfis clonais
- ✓ Disseminação geográfica de microrganismos
- ✓ Processo evolutivo e disseminação das bactérias resistentes

IMPORTANTE

Implementação das medidas adequadas de controle

Evolução e amplo emprego
das técnicas de Biologia
Molecular

Epidemiologia e Controle das IRAS



OSWALDO CRUZ
HOSPITAL ALEMÃO