

Leslie Ecker Ferreira¹, Karilene Dalposso³, Bruna Barbosa Hackbarth³, Anderson R. Gonçalves², Glauco Adrieno Westphal², Paulo Henrique Condeixa de França¹, Mauro de Souza Leite Pinho¹

1. Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil.
2. Departamento de Medicina da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil.
3. Departamento de Farmácia da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil.

Trabalho realizado na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil.

Apoio financeiro: Universidade da Região de Joinville e Fundação para Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina.

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 1 de dezembro de 2010
Aceito em 10 de março de 2011

Autor correspondente:

Leslie Ecker Ferreira
UNIVILLE/ Área de Pesquisa
Rua Paulo Malschitzki, 10 – Campus
Universitário – Zona Industrial
CEP: 89219-710 – Joinville (SC),
Brasil.
Fone: (47) 3461-9197 / Fax (47) 3473-
0131
E-mail: leslie.ferreira@univille.br

Painel molecular para detecção de microrganismos associados à sepse

Molecular panel for detection of sepsis-related microorganisms

RESUMO

Introdução: A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica relacionada com altas taxas de mortalidade no meio hospitalar. O diagnóstico etiológico tardio e terapia antimicrobiana inadequada se associam a falhas do tratamento. Exames moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase são considerados métodos mais rápidos e precisos do que técnicas de hemocultura para identificação microbiana, proporcionando uma taxa mais elevada de sucesso terapêutico.

Objetivo: Desenvolver um painel de seqüências iniciadoras (*primers*) para fragmentos de DNA de microrganismos associados à sepse.

Métodos: Seqüências iniciadoras para amplificação de *Enterobacter spp.*, *Escheri-*

chia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.* foram desenvolvidos e testados quanto a sensibilidade e especificidade com base em suas respectivas cepas padrão.

Resultados: A especificidade pretendida foi obtida para os *primers* de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Candida spp.* O teste de sensibilidade mostrou um limite de detecção de 5 ng a 500 fg em amostras de sangue contaminado com DNA microbiano.

Conclusões: O painel molecular apresentado oferece a vantagem de constituir um sistema flexível “aberto” em comparação a outros métodos de detecção múltipla.

Descritores: Técnicas de diagnóstico molecular; Reação em cadeia da polimerase; Sepse; Primers de DNA/diagnóstico; Técnicas de amplificação de ácido nucleico

INTRODUÇÃO

Estima-se que ocorram no Brasil 400.000 casos de sepse grave por ano, que demandam 17% dos leitos disponíveis em unidades de terapia intensiva.⁽¹⁾ A confirmação do diagnóstico depende de exames microbiológicos baseados em hemoculturas que, em geral, exigem 24 a 72 horas.⁽²⁾ Assim, na maioria dos casos, a terapia antibiótica é iniciada com base em critérios clínicos. Regimes terapêuticos antimicrobianos inadequados se associam com o surgimento de cepas resistentes, aumento dos custos do tratamento e das taxas de mortalidade, especialmente em pacientes em condições críticas.⁽³⁾ Apesar disto, recomenda-se que uma terapia antimicrobiana adequada deva ser iniciada o mais precocemente possível, pois cada hora de atraso resulta em um aumento de 7,6% na mortalidade.⁽⁴⁾

Ensaio moleculares com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) são importantes ferramentas para a detecção de microrganismos e podem contribuir para o diagnóstico precoce com alta sensibilidade, mesmo quando os alvos estão presentes em quantidades extremamente baixas (10 a 100 cópias de DNA).⁽⁵⁾ As investigações de microrganismos com uso da PCR tem sido exploradas com siste-

mas de detecção múltipla conhecidos como Multiplex-PCR. Esta técnica é baseada na amplificação de segmentos distintos de DNA empregando-se dois ou mais pares de *primers* em um único tubo de reação, o que, por sua vez, geralmente significa custos mais baixos e redução de tempo. A termodinâmica da Multiplex-PCR exige um equilíbrio complexo entre parâmetros como concentrações de sais, *primers* e DNA polimerase, temperaturas compatíveis para o *annealing* dos *primers*, resultando em um desenho experimental laborioso.^(6,7) Além disso, os sistemas Multiplex-PCR tem demonstrado uma menor sensibilidade quando comparados às reações individuais com os pares de *primers* correspondentes isolados.⁽⁸⁾

Por outro lado, painéis moleculares são considerados uma alternativa menos complexa ao Multiplex-PCR. Nessa técnica utiliza-se dois ou mais pares de *primers*, planejados para distintos *loci*, e são realizados em tubos separados sob condições termodinâmicas iguais. Pares adicionais de *primers* tendo como alvo outros *loci* podem ser eventualmente incluídos, sem necessidade de redefinir os parâmetros da reação.⁽⁹⁾

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e padronizar um painel de *primers* para amplificação via PCR de fragmentos específicos de DNA de microrganismos associados à sepse, segundo um protocolo único, para um diagnóstico confirmatório mais rápido.

MÉTODOS

Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

Desenho dos *primers*

Um painel de *primers* para PCR foi desenvolvido para a detecção de cinco microrganismos associados à sepse, sendo: *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.* Uma série de sequências nucleotídicas de cada microrganismo foi selecionada a partir da base de dados GenBank, relativas ao gene 23S rRNA para *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *S. aureus* e ao gene 18S rRNA para *Candida spp.* Para cada conjunto específico, foi gerada uma sequência consensual por meio do programa ClustalW[®].⁽¹⁰⁾ Estas foram submetidas ao programa Visual OMP[®] ⁽¹¹⁾ para simular um conjunto de *primers* para amplificação simultânea. Os múltiplos oligonucleotídeos foram então testados *in silico* com relação à especificidade com a ferramenta BLAST contra todas as sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank.⁽¹²⁾ Semelhantemente, o gene *LacZ* foi definido para os *primers* pretendidos para identificação de *Escherichia coli* utilizando o programa PRIMER3[®].⁽¹³⁾

Microrganismos

Cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram adquiridas da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello.

Extração de DNA

Foi aplicado o kit Qiamp DNA Mini Kit[®] (Qiagen, Hilden, Alemanha) para extração de DNA das cepas mantidas em meio sólido ou presentes em amostras de sangue humano. As extrações de DNA de cepas de *Candida* foram precedidas por ruptura celular com esferas de vidro. As avaliações qualitativas e quantitativas do DNA extraído foram realizadas via mensurações espectrofotométricas.

Reação em cadeia da polimerase

As reações foram realizadas em um volume definido de 50 µL e incluíram 50 - 500 ng de DNA, 1 U *Taq* DNA polimerase (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 200 µM dNTP's (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 1 - 2 mM MgCl₂ (LGC Biotecnologia), 10X PCR Buffer (LGC Biotecnologia), e 20 pmol de cada *primer* (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Para o estabelecimento de uma temperatura de *annealing* ótima e comum a todos os pares de *primers*, as reações individuais foram testadas em gradientes de temperatura variável entre 40°C e 60°C, segundo a disposição dos tubos no aparelho de termociclagem (LGC XP thermocycler - BIOER Technology Co., Tóquio, Japão). A desnaturação inicial foi realizada a 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos incluindo três passos consecutivos de 45 segundos a 94°C, 50°C e 72°C. Uma fase de extensão a 72°C por 10 minutos finalizou o ciclo de amplificação. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) para análise via exposição à luz UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação (MiniBis-Pro photodocumentation system - DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel).

Testes de sensibilidade

Testes de sensibilidade foram realizados empregando-se diluições seriadas do DNA genômico extraído de amostras de sangue humano contaminadas artificialmente pelas cepas microbianas acima mencionadas.

Testes de especificidade

Testes de especificidade foram realizados empregando-se DNA extraído de amostras de sangue (DNA humano) ou culturas puras (DNA de microrganismos incluídos ou não no painel (vide também **extração de DNA**).

RESULTADOS

A análise de múltiplas sequências de oligonucleotídeos sugeridas pelo programa Visual OMP[®] resultou em um painel de quatro pares de *primers* compatíveis para amplificação dos respectivos microrganismos no mesmo protocolo de termociclagem. Como os *primers* para *Enterobacter spp.* mostraram amplificação cruzada com *E. coli*, foi desenvolvido um par adicional de *primers* baseados no gene *LacZ* de *E. coli* para diagnóstico diferencial em uma reação separada, quando necessário. Esses *primers* geraram produtos de 526 bp (*Enterobacter spp.*), 430 bp (*Candida spp.*), 407 bp (*E. coli*), 377 bp (*P. aeruginosa*), e 198 bp (*S. aureus*) (Tabela 1).

A análise das reações com o emprego de gradientes de temperatura para todos os pares de *primers* forneceu uma temperatura de *annealing* consensual de 50°C (Figura 1). Para a reação de diferenciação adicional entre *Enterobacter spp.* e *E. coli* foi empregada a temperatura de *annealing* a 60°C.

Os testes de sensibilidade demonstraram um limite mínimo para detecção de DNA microbiano de 5 ng (*Enterobacter*

spp.), 5 pg (*Candida spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) e 500 fg (*S. aureus*) (Figura 2). Resultados satisfatórios de especificidade foram obtidos com todos os pares de *primers* quando comparados a DNA microbiano divergente e DNA humano (Figura 3), exceto pela reação cruzada *Enterobacter spp.* – *E. coli* mencionada acima.

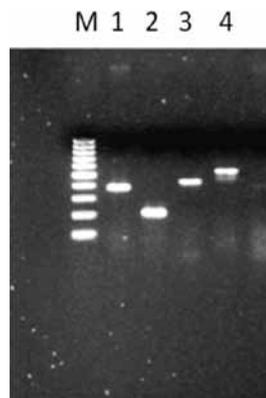


Figura 1 – Amplificação simultânea em tubos separados de (1) *P. aeruginosa*, (2) *S. aureus* (3) *C. albicans*, e (4) *E. aerogenes* com temperatura comum otimizada de *annealing* (50°C). (M) padrão molecular (100 bp ladder, Fermentas, Ontario, Canadá).

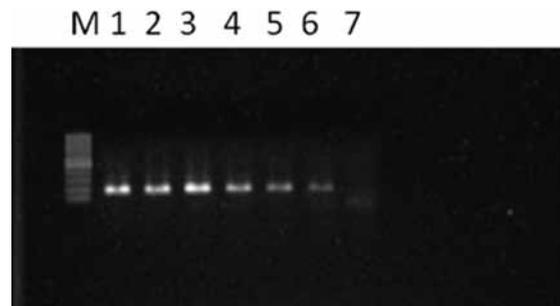


Figura 2 – Teste de sensibilidade para a PCR desenvolvida para detecção de *S. aureus*. (1) 50 ng, (2) 5 ng, (3) 500 pg, (4) 50 pg, (5) 5 pg, (6) 500 fg, e (7) 50 fg. (M) padrão molecular (100 bp ladder Fermentas).

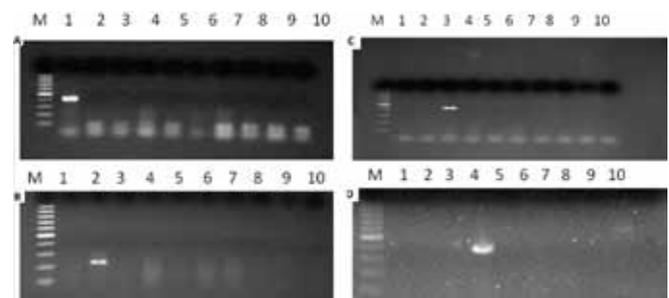


Figura 3 – Teste de especificidade da PCR desenvolvida para detecção de: (A) *E. coli*, (B) *S. aureus*, (C) *P. aeruginosa*, (D) *Candida spp.* (M) padrão molecular (100 bp ladder, Fermentas, Ontario, Canadá). (1) *E. coli*, (2) *S. aureus*, (3) *P. aeruginosa*, (4) *Candida albicans* (5) *A. baumannii*, (6) *E. aerogenes*, (7) *Streptococcus salivarius*, (8) *Streptococcus mutans*, (9) *H. sapiens*, e (10) controle negativo.

Tabela 1- Base de dados de *primers*

Sequências dos <i>primers</i>	Microrganismo alvo	Sentido	Produto (bp)
CACCTATTTTCTATCTA	<i>S. aureus</i>	Senso	198
CCTATAATCGTTTTAAT		Antisenso	
GTCAGTGTTACCTAA	<i>P. aeruginosa</i>	Senso	377
GAAAGGATCTTTGAA		Antisenso	
GTAAAGGTATTTACATT	<i>Candida spp.</i>	Senso	430
TCAGTTATCGTTTATT		Antisenso	
GAACATCAAACATTAAT	<i>E. coli</i>	Senso	454
AATCAGTCGAAGATA		Antisenso	
GTACGATTTGTTGTTA	<i>Enterobacter spp.</i>	Senso	526
AAAGAAAGCGTAATA		<i>E. coli</i>	

DISCUSSÃO

Como os procedimentos diagnósticos confirmatórios atuais para sepse exigem um período de 24 a 72 horas para confirmação da etiologia de uma infecção e identificação do patógeno, a terapia antibiótica é, em geral, iniciada com uma base empírica.⁽²⁾

Entretanto, estudos comparando hemoculturas e testes moleculares para a detecção de microrganismos associados à sepse tem destacado um diagnóstico significativamente mais rápido quando empregando técnicas baseadas na PCR.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

O tempo necessário para diagnóstico microbiológico específico utilizando o painel molecular desenvolvido no presente estudo é de cerca de 6 horas, exceto no caso de positividade para *Enterobacter spp.*, quando é necessário um procedimento adicional de 2 horas para diferenciar de *E. coli*. Também deve ser considerado que o painel desenvolvido inclui a detecção de *Candida spp.*, tendo em vista a dificuldade de romper as células fúngicas para extração de DNA genômico.⁽¹⁷⁾

Considerando a alta sensibilidade dos métodos de detecção baseados em PCR, devem ser adicionadas certas medidas para impedir resultados falsos positivos. Estas medidas incluem controles internos utilizando *primers* não específicos baseados em sequências conservadas de nucleotídeos de diferentes espécies e protocolos estritamente seguros para extração e amplificação de DNA.⁽¹⁸⁾

Outros estudos propuseram métodos diferentes de procedimentos diagnósticos baseados em PCR.⁽¹⁹⁻²¹⁾ Por exemplo, foi proposta uma estratégia molecular para detectar 62 patógenos por meio de PCR seguido de hibridização,⁽²²⁾ entretanto, esta abordagem não envolve a diferenciação dos microrganismos. Neste contexto, sistemas de detecção em larga escala, utilizando *microarrays* altamente sensíveis e métodos de PCR foram utilizados para identificar 800 genes de microrganismos relacionados à sepse;⁽²³⁾ porém, o valor clínico da técnica é comprometido pela complexidade intrínseca e altos custos.

Em um estudo recente,⁽⁹⁾ um conjunto de *primers* foi apresentado para detecção dos cinco microrganismos mais prevalentes em culturas de sangue, sugerindo que painéis moleculares demonstram uma maior sensibilidade e são mais rápidos do que as hemoculturas. Mais ainda, métodos rápidos e sensíveis baseados em painéis moleculares para a identificação de patógenos bacterianos e fúngicos causadores de sepse diretamente a partir das amostras de sangue parecem promissores para um refinamento antecipado da terapia antibiótica empírica.⁽¹⁵⁾

CONCLUSÃO

Em comparação a sistemas convencionais de detecção múltipla, onde todos os *primers* são incluídos em um único *kit* de reação “fechado”, o painel molecular oferece a vantagem adicional de um sistema “aberto”, onde *primers* objetivando outros microrganismos podem ser adicionados a um único protocolo de reação de PCR, sem interferir no tempo de diagnóstico.

Concluimos que o painel molecular desenvolvido é um método confiável para a detecção de microrganismos relacionados à sepse e mais estudos devem ser feitos para avaliar seu papel em condições clínicas.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado por verbas da FAPESC (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina) e FAP-UNIVILLE (Fundo Apoio à Pesquisa da Universidade da Região de Joinville). Agradecemos também a Carmen Diamantina Teixeira Heyder e Roseneide Campos Deglmann por seu apoio técnico.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is a systemic inflammatory response related to high mortality rates in the hospital environment. Delayed etiological diagnosis and inadequate antimicrobial therapy are associated with treatment failures. Molecular tests based on polymerase chain reaction are regarded as faster and more accurate procedures than culture techniques for microbial identification, providing a higher rate of therapeutic success.

Objective: To develop a panel of primers for DNA fragments of sepsis-related microorganisms.

Methods: Primers for amplification of *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida spp.* were designed and tested for sensitivity and specificity on the basis of their respective standard strains.

Results: The intended specificity was obtained for *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *Candida spp.* primers. Sensitivity tests showed a threshold for detection from 5 ng to 500 fg in blood samples contaminated with microbial DNA.

Conclusions: The molecular panel presented offers the advantage of a flexible ‘open’ system when compared to other multiplex detection methods.

Keywords: Molecular diagnostic techniques; Polymerase chain reaction; Sepsis; DNA primers/diagnosis; Nucleic acid amplification techniques

REFERÊNCIAS

1. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva Cl, Janiszewski M, Cal RG, Sousa EF, Abe TP, Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assuncao M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004;8(4):R251-60.
2. Cheng AC, West TE, Peacock SJ. Surviving sepsis in developing countries. *Crit Care Med*. 2008;36(8):2487; author reply 2487-8.
3. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*. 1999;115(2):462-74.
4. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma A, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(6):1589-96.
5. Cuchacovich R. Clinical applications of the polymerase chain reaction: an update. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(4):735-58, v. Republished from: *Rheum Dis Clin North Am*. 2003;29(1):1-20, v.
6. Settanni L, Corsetti A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review. *J Microbiol Methods*. 2007;69(1):1-22.
7. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):512-30.
8. López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(1):127-31.
9. Pechorsky A, Nitzan Y, Lazarovitch T. Identification of pathogenic bacteria in blood cultures: comparison between conventional and PCR methods. *J*
10. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673-80.
11. Santalucia J Jr. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design. In: Yuryev A, editor. *PCR primer design Methods in molecular biology (Methods in molecular biology)*. New Jersey: Human Press; 2007. p. 3-34.
12. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.
13. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz SA, editors. *Bioinformatics methods and protocols (Methods in molecular biology)* New Jersey: Human Press; 2000. p. 365-86.
14. Xu J, Millar BC, Moore JE, Murphy K, Webb H, Fox AJ, et al. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis--rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol*. 2003;94(3):197-206.
15. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):235-51.
16. Reier-Nilsen T, Farstad T, Nakstad B, Lauvrak V, Steinbakk M. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr*. 2009;9:5.
17. Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):3159-63.
18. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA Gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2000;38(7):2574-8.
19. Cursons RT, Jeyerajah E, Sleigh JW. The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. *Crit Care Med*. 1999;27(5):937-40.
20. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):32-9.
21. Yamamoto Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(3):508-14.
22. Klausegger A, Hell M, Berger A, Zinober K, Baier S, Jones N, et al. Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. *J Clin Microbiol*. 1999;37(2):464-6. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1660.
23. Palka-Santini M, Cleven BE, Eichinger L, Krönke M, Krut O. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiol*. 2009; 9:1.