

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MEDIANTE LA TECNICA *DOUBLE LOCUS SEQUENCE TYPING (DLST)*

Carla Gosálvez Cantó, Mireya Fernández Sánchez, Jesús Hurtado Tamayo, Mari Paz Ventero, Antonia Sánchez Bautista, Alfredo Zorraquino, José Sánchez Payá, Juan Carlos Rodríguez Díaz
 Hospital General Universitario de Alicante-ISABIAL

INTRODUCCIÓN



Pseudomonas aeruginosa es uno de los microorganismos más frecuentemente aislados en infecciones de origen nosocomial y frecuentemente se asocia a brotes dentro del ámbito hospitalario. Este proyecto surgió a raíz de la aparición de un brote de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en el Servicio de Nefrología del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA) confirmado por datos clínico-epidemiológicos y mediante electroforesis en campo pulsante (realizada en el Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid).



MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados clínicos: Estudio casos-control de caracterización genética de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Los casos son 23 cepas asociadas al brote del Servicio de Nefrología aisladas entre febrero y julio de 2017. Se utilizaron como controles 23 cepas de *P. aeruginosa* elegidas al azar durante agosto del mismo año que procedían de pacientes ingresados en otros servicios del hospital y sin relación conocida con el brote.

Técnicas microbiológicas:

- (i) Extracción del ADN bacteriano mediante chelex y centrifugación posterior.
- (ii) Amplificación de los loci *ms172* y *ms217*. Se siguieron las pautas establecidas por el sistema DLST diseñado en la Universidad de Lausana (Suiza) (1)
- (iii) visualización de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa al 2%
- (iv) purificación de los fragmentos mediante un sistema comercializado por Quiagen
- (v) secuenciación. Se realizó secuenciación tipo Sanger mediante los cebadores previamente descritos y el análisis de los fragmentos aportó la información necesaria para obtener la variante alélica de los genes introduciendo las secuencias en la base de datos de acceso gratuito Double locus sequence typing (<http://www.dlst.org>).
- (vi) Análisis bioinformático para obtener un árbol filogenético mediante el método de *Neighbour-joining* y un test Bootstrap (1000 repeticiones) realizado con el programa Mega7.

RESULTADOS

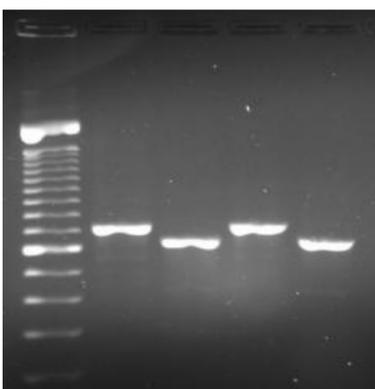


Fig1. Electroforesis en gel de agarosa. La columna 1 presenta el marcador de peso molecular 100 pb; Las columnas 2 y 3 representan los alelos *ms172* y *ms217* del caso 1; Y las columnas 4 y 5 representan los alelos *ms172* y *ms217* del caso 2.

Para todas las cepas de los casos del brote se obtuvo el mismo código al introducir la secuencia en la *DLST*, tanto para el *ms172* como para el *ms217*, siendo respectivamente las **variantes alélicas número 52 y 44**. En cuanto a las *pseudomonas* control, hubo una gran diversidad de códigos obtenidos.

El árbol filogenético también mostró que todos los casos se encuentran dentro de un **mismo cluster**, indicando proximidad evolutiva.

G A A A A C G C A T G C G T T T T T C A A T G C G A A C G A C C

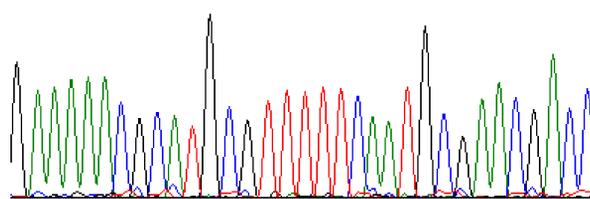


Fig2. Histograma obtenido a partir de la secuenciación de tipo Sanger de uno de los alelos del experimento.

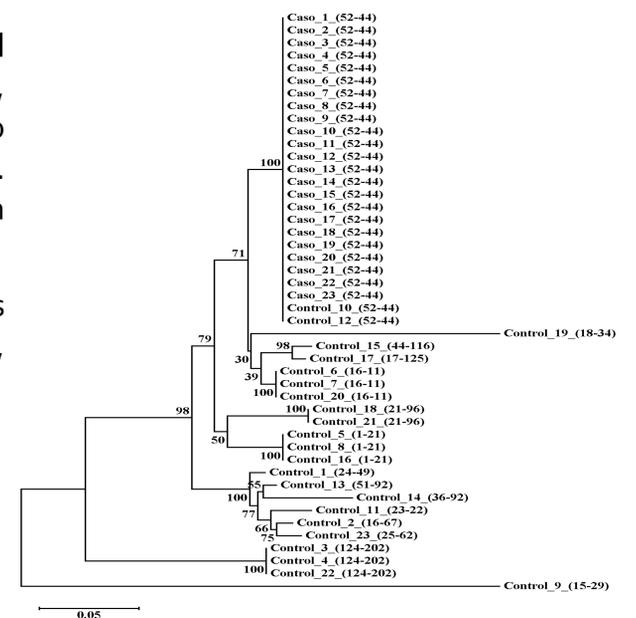


Fig3. Árbol filogenético de casos y controles construido a partir de las secuencias obtenidas utilizando el algoritmo Neighbour-joining y un test Bootstrap (1000 repeticiones).

CONCLUSIONES

La técnica secuencia dos fragmentos génicos presentes en todos los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* pero con gran variabilidad entre aislados no clonales. Esto permite diferenciar clones del microorganismo sin tener que recurrir a la electroforesis en campo pulsante ni a la secuenciación completa del microorganismo, técnicas complejas y no disponibles en la mayoría de los Laboratorios de Microbiología clínica. Este estudio confirma que la técnica empleada es rápida, sencilla y poco costosa para la detección de brotes hospitalarios. Puede ser utilizada para la rápida identificación de los mismos ante sospecha clínico-epidemiológica e incluso puede aplicarse a todos los aislamientos de infecciones nosocomiales asociadas a este patógeno para conocer la epidemiología molecular de este patógeno en cada ambiente hospitalario. Esto es especialmente útil en el caso de aislados clínicos multirresistentes por la repercusión clínica de el rápido control de este tipo de infecciones.