

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

DETECÇÃO DE METALO β -LACTAMASES E SIMILARIDADE GENÉTICA EM
ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* DE EFLUENTE HOSPITALAR E
ÁGUA SUPERFICIAL

Daiane Bopp Fuentefria

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
ABRIL, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

DETECÇÃO DE METALO β -LACTAMASES E SIMILARIDADE GENÉTICA EM
ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* DE EFLUENTE HOSPITALAR E
ÁGUA SUPERFICIAL

Daiane Bopp Fuentefria
Farmacêutica-bioquímica (UPF)
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS)

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na área de Microbiologia do Ambiente

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
ABRIL, 2009

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

F954d Fuentefria, Daiane Bopp

Detecção de metalo-beta-lactamases e similaridade genética em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar e água superficial / Daiane Bopp Fuentefria. – 2009.

Tese(doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof^ª. Gertrudes Corção

1. *Pseudomonas aeruginosa* 2. Metalo-beta-lactamases 3. Águas residuárias 4. Águas superficiais 5. Resistência microbiana a drogas I. Corção, Gertrudes, orient. II. Título.

CDU 579.84 (043)

AGRADECIMENTOS

À Dra Geovana Brenner Michael e a Fernanda Simone Marks pelo incansável auxílio na padronização da técnica de PFGE.

Ao Hospital São Vicente de Paulo, Hospital Divina Providência, Hospital Conceição, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital São Lucas, por permitirem a coleta e análise dos esgotos hospitalares.

Aos colegas do laboratório 166, Natália Canal, Alessandra Ferreira, Kelly Priotto, Aline Spindler, Giuliano Hickenbick, Waldir Henkes, Tiago Gräf, Letícia Otton, Desireé Padilha e Lyvia Moreira de Oliveira pelos momentos de descontração, pelos almoços divertidos no “sushi” e por tornarem esses anos tão agradáveis.

Aos meus irmãos, Fernando e Felipe, pelo companheirismo, auxílio e apoio constante durante esses anos. Obrigado por poder sempre contar com vocês!

Ao meu noivo, Felipe Martinazzo, pelo apoio e amizade constantes, pelo “ombro sempre amigo”, pelo estímulo e compreensão nos momentos de ausência.

E finalmente, aos meus pais, Sérgio e Véra, que sempre me estimularam a crescer científica, profissional e pessoalmente, nunca deixando de acreditar e apostar em mim.

À CAPES pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa de estudos.

DETECÇÃO DE METALO β -LACTAMASES E SIMILARIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* DE EFLUENTE HOSPITALAR E ÁGUA SUPERFICIAL

Autor: Daiane Bopp Fuentefria

Orientador: Prof. Dr. Gertrudes Corção

¹ RESUMO

A presença de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a antimicrobianos no esgoto hospitalar contribui para sua disseminação em corpos d'água e possibilita o estabelecimento de reservatórios ambientais de resistência bacteriana. Os objetivos deste estudo foram comparar isolados de *P. aeruginosa* de amostras de esgoto hospitalar e água superficial quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a presença e diversidade de genes de metalo β -lactamases (MBLs) e a similaridade genética entre os isolados. Para isso, as amostras de esgoto hospitalar foram coletadas de cinco hospitais, localizados em Passo Fundo e Porto Alegre, RS, Brasil. As amostras de água superficial foram coletadas dos corpos d'água que recebem os esgotos de dois hospitais estudados. Os isolados foram identificados por provas bioquímicas clássicas e pela amplificação de um fragmento do rDNA 16S. O perfil de susceptibilidade foi avaliado pela técnica de disco-difusão. Os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} foram pesquisados por PCR. A relação clonal entre os isolados foi avaliada pela ERIC-PCR e PFGE. A diversidade nos genes de MBLs encontrados foi avaliada pela DGGE. Foram analisados 614 isolados de *P. aeruginosa*, dos quais somente 5,0% apresentaram o gene *bla*_{SPM-1}. Todos os isolados com este gene apresentaram fenótipo de multirresistência. A análise de similaridade genética pela ERIC-PCR e PFGE não mostrou relação clonal entre isolados de água superficial e esgoto hospitalar ou entre isolados provenientes de amostras de diferentes esgotos hospitalares. A presença de isolados resistentes e com o gene *bla*_{SPM-1}, em amostras de esgoto hospitalar, atenta para o risco de disseminação ambiental de resistência bacteriana.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Molecular de Procariotos e Eucariotos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (133p.) Abril, 2009.

DETECTION OF METALLO β -LACTAMASES AND GENETIC SIMILARITY IN
Pseudomonas aeruginosa ISOLATES FROM HOSPITAL SEWAGE AND
SUPERFICIAL WATER

Author: Daiane Bopp Fuentefria

Advisor: Dr. Gertrudes Corção

² ABSTRACT

The presence of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antimicrobials in hospital sewage contributes to its dissemination into water bodies and may lead to the establishment of environmental reservoirs of bacterial resistance. The objectives of this study were to compare *P. aeruginosa* strains isolated from hospital sewage and superficial water samples, about the susceptibility profile to antimicrobials, the presence and diversity of the metallo β -lactamases (MBLs) genes and the genetic similarity among the strains. For this purpose, hospital sewage samples were collected from five hospitals located in Passo Fundo and Porto Alegre, RS, Brazil. The superficial water samples were collected from the water bodies where the sewage from two of the analyzed hospitals were discharged. The isolates were identified by classical biochemical tests and amplification of 16S rDNA fragment. The susceptibility was determined by the disk-diffusion method. The *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} genes were screened by PCR. The clonal relationship among the strains was evaluated by ERIC-PCR and PFGE. The diversity on MBL genes found was analyzed by DGGE. A total of 614 *P. aeruginosa* strains were analyzed, of which only 5,0 % showed the *bla*_{SPM-1} gene. All isolates with this gene showed the multiresistance phenotype. The genetic similarity analysis by ERIC-PCR and PFGE didn't show clonal relationship between the strains from superficial water and hospital sewage or between the strains from samples of different hospital sewages. The presence of resistant isolates and isolates with the *bla*_{SPM-1} gene in hospital sewage samples call attention to the risk of environmental dissemination of bacterial resistance.

² Doctoral thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (133p.) April, 2009

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	ix
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.2 Resistência antimicrobiana em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
2.3 Metallo β -Lactamases (MBLs)	11
2.4 Resistência bacteriana no esgoto hospitalar	18
2.5 Tipificação Molecular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.5.1 Amplificação de Sequências Intergênicas Repetidas de Enterobactérias (ERIC-PCR)	20
2.5.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	21
2.6 Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE)	23
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	25
3.1 Artigo 1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial	25
3.2 Artigo 2: Spread of Metallo- β -lactamases: Screening reveals the presence of a <i>bla</i> _{SPM-1} gene in hospital sewage in southern Brazil	38
3.3 Artigo 3: Antimicrobial-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> from hospital sewage and superficial water: are they genetically related?	50
3.4 Artigo 4: Similaridade genética e perfil de susceptibilidade entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de diferentes esgotos hospitalares no Brasil.....	71
3.5 Artigo 5: Ocorrência do gene <i>bla</i> _{SPM-1} em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de esgoto hospitalar: perfil de susceptibilidade e tipificação molecular.....	89
4. DISCUSSÃO GERAL	108
5. CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
VITA	135

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Artigo 1: Susceptibilidade dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> das amostras de água superficial (Pontos de coleta B e C) e efluente hospitalar (Pontos de coleta D, E e F).	36
Tabela 2	Artigo 1: Soma de Quadrados (Q) e Probabilidades (P) encontradas a partir da análise de variância analisando contrastes específicos entre amostras de água superficial (Pontos B e C) e esgoto hospitalar (Pontos D, E e F).....	37
Tabela 1	Artigo 2: Description of sampling points, and numbers of isolates recovered from the different points of Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) and Hospital Divina Providência (HDP).....	48
Tabela 2	Artigo 2: Susceptibility results from <i>P. aeruginosa</i> isolates from Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) and Hospital Divina Providência (HDP).....	49
Tabela 1	Artigo 3: Frequência dos principais perfis de resistência dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dos pontos de Coleta B e C (água superficial) e pontos D, E e F (esgoto hospitalar) do Ambiente I e dos pontos de Coleta G e H (esgoto hospitalar) e I, J e K (água superficial) do Ambiente II	68
Tabela 1	Artigo 4: Perfil de susceptibilidade reduzida dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> de amostras de esgoto dos Hospitais I, II e III (n=218)	86
Tabela 2	Artigo 4: Principais perfis de resistência encontrados entre os isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de esgoto dos Hospitais I, II e III	87
Tabela 1	Artigo 5: Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes portadores ou não do gene <i>bla_{SPM-1}</i> provenientes de amostras dos esgotos dos Hospitais I a V (n = 36)	105
Tabela 1	Discussão geral: Perfis de Resistência encontrados entre os isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de esgoto hospitalar e água superficial dos Ambientes I e II e Hospitais I, II e III (n=614)	111

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1	Artigo 3: Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de ERIC-PCR dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> de esgoto hospitalar e água superficial do Ambiente I	69
Figura 2	Artigo 3: Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de ERIC-PCR dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> de esgoto hospitalar e água superficial do Ambiente II	70
Figura 1	Artigo 4: Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de ERIC-PCR dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> de esgoto hospitalar	88
Figura 1	Artigo 5: Dendrograma (Dice, UPGMA) dos padrões de ERIC-PCR dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de esgoto hospitalar dos Hospitais I a V	106
Figura 2	Artigo 5: Gel de agarose representativo de alguns perfis de PFGE dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> de esgoto hospitalar	107
Figura 3	Artigo 5: Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação do fragmento de gene bla _{SPM-1} dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> de esgoto hospitalar. Poliacrilamida 8,0 %, gradiente de desnaturação de 15-50%	107

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2MPA	ácido 2-mercaptopropiônico
%	porcentagem
°	grau
°C	grau Celsius
AAC	aminoglicosídeo acetiltransferase
Ami	amicacina (30µg)
ANT	aminoglicosídeo nucleotiltransferase
APH	aminoglicosídeo fosforiltransferase
AP-PCR	<i>arbitrarily primed polymerase chain reaction</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Atm	aztreonam (30µg)
Caz	ceftazidima (30µg)
CHEF	<i>Contour-clamped homogeneous electric field</i>
Cip	ciprofloxacina (5µg)
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
Cpm	cefepime (30µg)
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
ESBL	β-lactamase de espectro estendido
Etest	<i>Episilometer test</i>
g	grama
Gen	gentamicina (10µg)
H'	Índice de diversidade de Shannon-Weaver
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
HC	Hospital Conceição
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDP	Hospital Divina Providência
HSL	Hospital São Lucas
HSVP	Hospital São Vicente de Paulo
Imp	imipenem (10µg)
Kb	kilobase
L	litro
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
MBL	Metalo β-lactamase
Mer	meropenem (10µg)
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MIC	<i>Minimal Inibitory Concentration</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
MMR	<i>Methyl-directed mismatch-repair</i>

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS (continuação)

ng	nanograma
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed fiel gel electrophoresis</i>
Pol	polimixina B (300µg)
Ppt	piperacilina-tazobactam (100µg/10µg)
QRDRs	<i>Quinolone resistance determinant regions</i>
REP	<i>Repetitive enterobacterial palindromic</i>
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	ácido ribonucléico ribossomal
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
Tic	ticarcilina-ácido clavulânico (75µg/ 10µg)
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade
UPGMA	<i>Unweighted pair-group method with average linkages</i>
V	volt
β	beta
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro

1. INTRODUÇÃO

A presença de bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência tem sido descrita em diferentes tipos de amostras ambientais, incluindo amostras de esgoto hospitalar e água superficial. Estudos têm demonstrado que efluentes hospitalares apresentam níveis mais elevados de bactérias resistentes a antimicrobianos, quando comparados a efluentes derivados de outras fontes e que a concentração de antimicrobianos na água que recebe o esgoto hospitalar também é superior, gerando um ambiente com forte pressão seletiva. Ambientes fortemente seletivos levam a um aumento da frequência de bactérias resistentes a antimicrobianos, as quais são liberadas no esgoto hospitalar e, através deste, chegam ao sistema de esgoto municipal, que por sua vez, é lançado, na maioria das vezes em corpos d'água, como rios, lagos e oceanos, sem tratamento prévio.

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno nosocomial frequente, causador de infecções em diversos sítios do corpo humano. Além disso, é uma bactéria ubíqua com características hidrofílicas, capaz de manter-se por longos períodos em ambientes como corpos d'água, formando rotas de disseminação e reservatórios ambientais de resistência bacteriana. Há uma grande preocupação com patógenos nosocomiais, especialmente com a *P.*

aeruginosa, uma vez que existe a tendência de adquirirem novos mecanismos de resistência. Nesse sentido, a *P. aeruginosa* é particularmente problemática por sua resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos e sua habilidade de adquirir resistência a praticamente todos os antimicrobianos efetivos. Um dos principais mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* é a produção de β -lactamases adquiridas do tipo metalo β -lactamases (MBLs). Bactérias carreadoras de genes adquiridos de MBLs apresentam um amplo espectro de resistência a agentes β -lactâmicos que não é revertido por inibidores das serino β -lactamases. Em função da eficiente atividade de carbapenemase dessas enzimas, o perfil de resistência produzido pelas linhagens produtoras de MBLs é muito amplo, abrangendo, principalmente, os carbapenêmicos. Por estas razões, as infecções causadas por bactérias produtoras de MBLs estabelecem um grande desafio à terapia antimicrobiana, trazendo ao cenário atual a necessidade de identificar essas bactérias produtoras de MBLs no esgoto hospitalar e avaliar sua disseminação em amostras de água superficial.

Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar, qualitativamente, linhagens de *P. aeruginosa* produtoras de metalo β -lactamases provenientes de esgoto hospitalar e de amostras de água superficial que recebem o esgoto hospitalar, proporcionando uma comparação entre os perfis de sensibilidade e a frequência e diversidade dos genes produtores de MBLs destes dois grupos de amostras. Visa, também, traçar um perfil da presença de isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBLs em amostras de esgoto hospitalar de quatro diferentes hospitais de Porto Alegre, RS. Além disso, a similaridade genética

entre isolados de *P. aeruginosa* de diferentes ambientes será avaliada pela amplificação de elementos de DNA repetitivos (ERIC-PCR) e pela Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE). Para avaliar a diversidade dos genes de metalo β -lactamases encontrados nos isolados de *P. aeruginosa*, propõe-se a utilização de uma técnica molecular já consagrada, a Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* foi descrito há mais de 100 anos e, desde então, a classificação taxonômica sofreu várias modificações. Em 1966, as cepas foram classificadas em quatro grupos: fluorescente, pseudomallei, acidovorans e alcaligenes (Stanier et al., 1966). Em 1974 houve uma reclassificação baseada em estudos de homologia DNA-rRNA e o gênero foi classificado em cinco grupos geneticamente diferentes (Palleroni et al., 1973). Em 1996, quatro dos cinco grupos de homologia foram reclassificados em novos gêneros: *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* e *Brevundimonas*. O gênero *Pseudomonas* ficou no Grupo I, formado pelas espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes* e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Kerstens et al., 1996).

O Gênero *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonadaceae*, apresentando-se como bacilos Gram-negativos, aeróbicos estritos, a maioria

das cepas apresenta motilidade por meio de flagelos polares, utiliza glicose e outros carboidratos pela via oxidativa e, em geral são citocromo-oxidase positivas (Palleroni, 1984).

O gênero *Pseudomonas* possui características ubiqüitárias na natureza, com predileção por ambientes úmidos, razão pela qual, são consideradas bactérias hidrofílicas. Possui versatilidade metabólica, que permite a utilização de diversos compostos orgânicos, ocupando uma posição ecológica importante no ciclo do carbono. Também são importantes patógenos de animais e plantas (Yamamoto et al., 2000).

A *Pseudomonas aeruginosa* é a principal espécie do gênero, capaz de produzir quatro pigmentos distintos: piocianina (azul), pioverdina (amarelo-esverdeado), piorrubina (vermelho) e piomelanina (marrom). A piocianina é encontrada em mais da metade dos isolados clínicos, enquanto que os demais pigmentos são encontrados em menos de 2 % dos casos (King et al., 1954). Essa espécie tornou-se uma importante causa de infecção, especialmente em pacientes imunocomprometidos. É freqüentemente relacionada a infecções nosocomiais, como pneumonia, infecções do trato urinário e bacteremias. Geralmente as infecções por *P. aeruginosa* estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (Lang et al., 2004). No Brasil, é a primeira causa de pneumonia nosocomial (Sader et al., 2001).

A *P. aeruginosa* produz diversas substâncias consideradas fatores de virulência e responsáveis por aumentar a capacidade de colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro, sendo considerada a espécie mais virulenta entre as bactérias oportunistas Gram-negativas não fermentadoras da

glicose. Possui fatores de virulência associados à célula como os pili, apêndices celulares que promovem aderência a receptores presentes na superfície das células do hospedeiro, além de possuírem importante função de transferência de conteúdo genético através da conjugação, os flagelos, também envolvidos na aderência e a endotoxina, lipopolissacarídeo (LPS) de membrana externa responsável pela sepse através da ativação e liberação de mediadores da vasodilatação (Simpson et al., 1992). Dentre os fatores extracelulares, destacam-se a produção de alginato, importante no desenvolvimento de infecções broncopulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística, a exotoxina A, exoenzima S, elastases, proteases alcalinas e fosfolipase C (Gilligan et al., 1991; Boyd & Chakrabarty, 1994).

2.2 Resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*

Os principais mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos observados em *P. aeruginosa* são inativação enzimática, alteração da permeabilidade de membrana, transporte ativo do antimicrobiano e alteração do sítio alvo. O fenótipo de multirresistência, freqüentemente observado em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, pode ser explicado por uma combinação de mecanismos de resistência e não por um único mecanismo isolado. A resistência intrínseca a diferentes classes de antimicrobianos e a habilidade de adquirir resistência através de mutações aos antimicrobianos clinicamente importantes, associados às altas taxas de resistência adquirida e ao seu papel nas infecções hospitalares graves faz da *P. aeruginosa* um dos principais patógenos nosocomiais da atualidade (Livermore, 2002). Uma característica importante, que não pode ser esquecida, é que cepas de *P.*

aeruginosa podem e, freqüentemente apresentam mais de um mecanismo de resistência simultaneamente, aumentando seu arsenal de resistência aos antimicrobianos.

Mesmo os isolados de *P. aeruginosa* sensíveis aos antimicrobianos possuem consideráveis formas de defesa contra ação de antimicrobianos, as quais são intrínsecas da espécie. Os sistemas de efluxo ativo de múltiplas drogas constituem um desses eficientes mecanismos de resistência intrínseca em *P. aeruginosa*. O sistema MexAB-OprM, por exemplo, que é expresso constitutivamente em células tipo-selvagem, contribui para a resistência natural deste patógeno a vários antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos, inibidores de β -lactamases, quinolonas, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim, sulfametoxazol e novobiocina (Masuda e Ohya, 1992; Li et al., 1994; Hamzhepour et al., 1995; Köler et al., 1996; Li et al., 1998). Já foram descritos, no genoma de *P. aeruginosa*, genes que codificam para vários sistemas de efluxo e, até o momento, seis sistemas diferentes já foram caracterizados: MexAB-OprM (Poole et al., 1993), MexCD-OprJ (Poole et al., 1996), MexEF-OprN (Köhler et al., 1999), MexGHI-OpmD (Aendekerk et al., 2002) e MexXY-OprM (Murata et al., 2002).

Ainda entre os mecanismos intrínsecos apresentados por *P. aeruginosa* encontram-se a produção de β -lactamases induzíveis do tipo AmpC, as quais conferem resistência a alguns β -lactâmicos, como cefalotina e ampicilina (Livermore, 1995); a baixa permeabilidade da membrana externa; a ausência de porinas de alta permeabilidade e a produção de enzimas

inativadoras de aminoglicosídeos (Benz e Hancock, 1981; Mingeot-Leclercq, 1999; Li et al., 2000).

Entre os β -lactâmicos, diversos mecanismos de resistência já foram citados, como hiperexpressão de sistemas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana e produção de β -lactamases. A produção de β -lactamases é, na verdade, o mecanismo mais importante de resistência aos agentes β -lactâmicos. A hidrólise por β -lactamases potencializa a resistência aos β -lactâmicos causada por sistemas de efluxo e baixa permeabilidade celular (Livermore, 1989). Uma grande variedade de β -lactamases plasmidiais tem sido detectada em *P. aeruginosa*, incluindo β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e enzimas que hidrolisam carbenicilina. Dentre as ESBLs foram encontradas as enzimas da classe A de Ambler TEM-1, PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3 e CARB-4 (que hidrolisam carbenicilinas), HMS-1, LCR-1, NPS-1 e de classe D de Ambler, ou oxacilinases, OXA-18, derivados de OXA-2 e OXA-10, OXA-3 a 19, OXA-24 e ARI-1 (que hidrolisam oxacilinas e carbenicilinas). Também já foram descritas, em *P. aeruginosa*, as enzimas PER-1, VEB-1 e as derivadas de TEM e SHV (que hidrolisam ceftazidima e cefepime) (Nordmann & Guibert, 1998; Poirel et al., 2001). Além disso, a ESBL GES-2, derivada da GES-1 e pertencente à classe A de Ambler, que foi identificada em uma amostra de *P. aeruginosa* da África do Sul, também apresenta atividade de carbapenemase (Poirel et al., 2001; Castanheira et al., 2004a).

Uma das principais classes de drogas anti-pseudomonas, os carbapenêmicos, também não está livre de resistência. O mecanismo de

resistência aos carbapenêmicos mais preocupante em *P. aeruginosa* é a produção de enzimas carbapenemases, principalmente as metalo β -lactamases. Porém, na ausência de carbapenemases, o mecanismo mais comum que leva a resistência aos carbapenêmicos é multifatorial, originando-se de uma associação entre baixa permeabilidade de membrana, ação de sistemas de efluxo, principalmente o sistema MexAB-OprM, e a atividade de uma β -lactamase cromossomal do tipo *AmpC* induzível ou desreprimida (Livermore, 1992). A proteína de membrana externa OprD permite a entrada de carbapenêmicos e sua expressão reduzida é freqüentemente observada em isolados resistentes aos carbapenêmicos (Quale et al., 2006).

Entre os aminoglicosídeos, os mecanismos mais comuns de resistência adquirida são a inativação enzimática, devido à produção de enzimas modificadoras, sistemas de efluxo ativo e impermeabilidade (Giamarellou et al., 2001; Poole, 2005). Os aminoglicosídeos são inativados por fosforilação enzimática (aminoglicosídeo fosforiltransferase, APH), acetilação (aminoglicosídeo acetiltransferase, AAC) e adenilação (aminoglicosídeo nucleodiltransferase, ANT). Essas enzimas modificadoras são localizadas nos cromossomos ou plasmídeos bacterianos. Individualmente, isolados de *P. aeruginosa* resistentes a aminoglicosídeos podem apresentar múltiplas enzimas modificadoras, resultando em resistência de amplo espectro aos aminoglicosídeos (Poole, 2005).

Os principais mecanismos de resistência a fluoroquinolonas em *P. aeruginosa* incluem alterações na DNA girase e/ou topoisomerase IV, causadas por mutações em regiões determinantes de resistência a quinolonas

(QRDRs) da GyrA e ParC (Nakajima et al., 2002; Muramatsu et al., 2003). Outros estudos sugerem que mutações na GyrB também estão associadas à resistência a fluoroquinolonas (Mouneimnè et al., 1999; Le Thomas et al., 2001). O sistema de efluxo ativo, um mecanismo secundário, também contribui para a susceptibilidade reduzida às fluoroquinolonas (Le Thomas et al., 2001; Livermore, 2002). Dos sistemas de efluxo conhecidos em *P. aeruginosa*, somente o sistema MexAB-OprM é expresso constitutivamente em níveis suficientes para resultar em resistência intrínseca a fluoroquinolonas (Zhanel et al., 2004).

Várias penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, além das polimixinas, conseguem vencer as defesas inerentes da *P. aeruginosa* e apresentar atividade contra a maioria dos isolados. Entretanto, qualquer um desses antimicrobianos citados pode deixar de ser ativo através de mutações ou da aquisição de novos genes que levem à resistência adquirida (Livermore, 2002).

Além dos genes de resistência adquiridos, da resistência intrínseca e da possibilidade de mutações, isolados de *P. aeruginosa* hipermutáveis foram recuperados de pacientes com fibrose cística (Oliver et al., 2000). A *P. aeruginosa* é um microrganismo extremamente versátil, capaz de adaptar-se rapidamente a uma grande variedade de ecossistemas, com predileção pelas vias aéreas de pacientes com fibrose cística. Durante a infecção crônica, fatores de estresse como o sistema imune, antibióticos e a presença de um ambiente microaerófilo/anaeróbico contribuem para a seleção de múltiplos fenótipos de *P. aeruginosa* por variação genética (Oliver et al., 2000; Ratjen &

Döring, 2003). Dois mecanismos são conhecidos por acelerar as taxas de mutação e/ou recombinação em populações bacterianas: genes induzidos pelo estresse em cepas tipo-selvagem, geralmente do operon SOS e, genes cuja perda funcional aumenta a taxa de variabilidade genética (cepas hipermutáveis). O sistema bacteriano SOS somente é ativado sob forte pressão seletiva e, assim que as condições de crescimento são restabelecidas, ou por uma adaptação genética ou por uma mudança favorável do ambiente, as atividades de mutação e hiper-recombinação são reprimidas pelo repressor LexA (Radman et al., 2000). Cepas hipermutáveis são aquelas com aumento na taxa de mutação espontânea, devido a defeitos em genes envolvidos no reparo do DNA. O sistema MMR (*methyl-directed mismatch-repair*) (MutS, MutL, MutH ou UvrD) é o mais freqüentemente afetado em populações bacterianas naturalmente hipermutáveis (Oliver et al., 2002). A probabilidade do aparecimento de resistência é maior nessas cepas hipermutáveis e, por isso, os antibióticos as escolhem, aumentando assim a probabilidade de emergência de resistência (Livermore, 2002).

A grande preocupação na emergência dessas cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes está no fato de que, associando diferentes mecanismos de resistência, a *P. aeruginosa* pode determinar um fenótipo de resistência a quase todos, se não todos, os antimicrobianos anti-pseudomonas disponíveis. Esse fato torna-se ainda mais crítico se uma resistência a β -lactâmicos for associada à resistência a aminoglicosídeos e/ou fluoroquinolonas.

2.3 Metalo β -Lactamases (MBLs)

As metalo β -lactamases (MBLs) são β -lactamases pertencentes à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby que hidrolisam quase todos os β -lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactâmico aztreonam (Bush, 2001). Essas enzimas apresentam a mesma estrutura tridimensional, necessitam de dois íons divalentes como co-fator para sua atividade catalítica, geralmente o zinco, e apresentam resíduos conservados, que são responsáveis pela interação da enzima com os íons (Murphy et al., 2003).

As MBLs são inibidas por EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) ou compostos derivados do ácido tiolático (ex.: ácido 2-mercaptopropiônico) e não são inibidas por inibidores de serino β -lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Bush et al., 1995).

As MBLs podem ser divididas em enzimas codificadas por genes cromossomais e enzimas codificadas por genes plasmidiais (Walsh et al., 2005). As MBLs mediadas por cromossomos são produzidas intrinsecamente por diversos microrganismos, tais como *Bacillus cereus* (Thompson et al., 1990), *Aeromonas* spp. (Walsh et al., 1998), *Chryseobacterium meningosepticum* (Rossolini et al., 1998), *Stenotrophomonas maltophilia* (Avison et al., 2001; Spencer et al., 2001), *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* (Simm et al., 2001). Em função da possibilidade de seqüenciamento do DNA bacteriano, um número cada vez maior de MBLs cromossomais tem sido detectado em bactérias de origem não

clínica (Saavedra et al., 2003), como recentemente em *Erwinia carotovora* (Stoczko et al., 2008).

Desde o início da década de 1990, novos genes que codificam MBLs têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* (Poirel et al., 2000; Yan et al., 2001). Esses novos genes que codificam MBLs estão inseridos em estruturas genéticas que acabam por fornecer mobilidade ao gene, sendo então conhecidos como MBLs móveis ou MBLs adquiridas. Atualmente, seis grupos de MBL adquiridas são conhecidos: IMP (imipenemase) (Osano et al., 1994), SPM (São Paulo metalo β -lactamase) (Toleman et al., 1996), VIM (Verona imipenemase) (Lauretti et al., 1999), GIM (German Imipenemase) (Castanheira et al., 2004), SIM (Seul Imipenemase) (Lee et al., 2005), AIM-1 (Australian Imipenemase) (Gupta, 2008) e KHM-1, descrita em *Citrobacter freundii* (Sekiguchi et al., 2008) e, mais recentemente a NDM-1 (New Delhi MBL), descrita em *Klebsiella pneumoniae* na Índia (Yong, 2009).

Dentre estas classes, as MBL tipo IMP-1 foram identificadas em vários bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* e em alguns não fermentadores da glicose, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp (Laraki et al., 1999; Tsakris et al., 2000). Além disso, no Japão, diversas variantes do tipo IMP-1 foram caracterizadas, incluindo IMP-3 de *Shigella flexneri* (Iyobe et al., 2000), IMP-6 de *Serratia marcescens* (Yano et al., 2001), IMP-10 de *P. aeruginosa* e *Alcaligenes xylosoxidans* (Iyobe et al., 2002) e IMP-11 de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Recentemente, no México, um

isolado de *P. aeruginosa* produtor de IMP-15 foi identificado (Garza-Ramos et al., 2008). Metalo β -lactamases tipo VIM, incluindo VIM-1 e VIM-2, em isolados de *P. aeruginosa* foram relatadas pela primeira vez, em 1999, na Itália e França, respectivamente (Lauretti et al., 1999; Poirel et al., 2000). Surtos de linhagens de MBL tipo VIM também foram relatados na Grécia (Tsakris et al., 2000). Recentemente, duas novas variantes tipo-VIM-2, VIM-15 e VIM-16, foram relatadas em isolados de *P. aeruginosa* na Bulgária e Alemanha (Schneider et al., 2008). O gene *bla*_{SPM-1}, membro do terceiro grupo de MBLs mediadas por plasmídeos tem sido extensivamente detectado no Brasil (Toleman et al., 2002; Gales et al., 2003; Gräf et al., 2008). A ocorrência de cepas de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 continua crescendo no Brasil (Carvalho et al., 2006). Além dessas, diversas outras variantes dos principais grupos de MBLs têm sido relatadas em todo o mundo, como VIM-3 em isolados de *Pseudomonas* em Taiwan (Yan et al., 2001); isolados de *P. aeruginosa* VIM-8 (Crespo et al., 2004) e VIM-6 em *Pseudomonas* na Singapura (Koh et al., 2004); uma nova variante, VIM-11, detectada em isolado clínico de *P. aeruginosa* na Argentina (Pasteran et al., 2005); um surto de *P. aeruginosa* VIM-2 na Colômbia (Villegas et al., 2006); e a presença do gene *bla*_{IMP-4} em patógenos Gram-negativos na Austrália (Peleg et al., 2005; Herbert et al., 2007), entre outros.

Interessantemente, esses isolados foram encontrados quase que exclusivamente no ambiente hospitalar. Recentemente, uma cepa de *P. pseudoalcaligenes* produtora de VIM-2 foi recuperada de uma amostra de esgoto hospitalar (Quintera et al., 2005), indicando que as MBLs podem

disseminar-se para novos nichos ainda não reportados. Um estudo de triagem de MBLs em ambientes não hospitalares revelou a presença do gene *bla*_{VIM-2} em dois isolados não relacionados de *P. aeruginosa* de ambiente aquático, sugerindo o ambiente hospitalar como possível origem dessas cepas carreadoras de *bla*_{VIM-2} (Quintera & Peixe, 2006). Isolados ambientais de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} foram recuperados de amostras de diferentes esgotos hospitalares, no Rio Grande do Sul, Brasil (Fuentefria et al., 2008a, Fuentefria et al., 2008b). De fato, as MBLs adquiridas já foram detectadas em todos os continentes, sua prevalência continua aumentando em muitos países e, agora, em diferentes ambientes, dando uma dimensão ainda maior ao problema da disseminação de resistência.

Uma vez que as MBLs têm a capacidade de hidrolisar uma grande variedade de agentes β -lactâmicos de amplo espectro, as linhagens produtoras de MBL geralmente demonstram resistência a múltiplos agentes β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas, penicilinas e carbapenêmicos (Shibata et al., 2003). Por isso, essas linhagens produtoras de MBL têm sido incluídas entre os principais patógenos nosocomiais. Tudo isso é enfatizado pelo fato de que, virtualmente, toda MBL aparece em um microrganismo que produz pelo menos uma outra β -lactamase não relacionada. Por exemplo, algumas espécies de *Aeromonas* produzem uma cefalosporinase cromossomal do grupo 1 e uma penicilinase do grupo 2, juntamente com uma MBL (carbapenemase) de espectro estreito do grupo 3 (Rasmussen et al., 1997). Outro exemplo recentemente reportado é a presença da MBL VIM-11 juntamente com uma β -lactamase de espectro estendido GES-1 em um isolado clínico de *P.*

aeruginosa na Argentina (Pasteran et al., 2005). Outro estudo relatou a primeira ocorrência de co-produção de uma metalo β -lactamase tipo SPM-1 e de uma metilase do RNAr 16S que gera resistência a aminoglicosídeos; uma combinação que compromete severamente as opções terapêuticas (Dai et al., 2007).

As MBLs adquiridas são codificadas por genes cassetes localizados no cromossomo ou no plasmídeo bacteriano. Entretanto, com exceção da enzima SPM-1, a qual é codificadas por um gene inserido em um plasmídeo (Poirel et al., 2004), as demais MBLs adquiridas são codificadas por genes cassetes localizados em integrons (Walsh et al., 2002). Os integrons são capazes de encontrar genes cassetes por um evento de recombinação específico entre dois sítios de DNA, um no integron e outro no gene cassete. Os integrons consistem de três regiões: a região 5' conservada, a região 3' conservada e uma região variável. A região 5' é formada pelo gene da integrase (*intI*), que é adjacente ao sítio de recombinação (*attI*) e um promotor, que facilita a expressão do gene cassete na região variável. A região 3' freqüentemente é formada por um gene *qac* parcialmente deletado (*qacE+1*) fusionado a um gene *sul* e confere resistência a compostos quaternários de amônio e sulfonamida, respectivamente (Walsh et al., 2005).

Genes cassetes são pequenos fragmentos de DNA de aproximadamente 1 Kb com um sítio de recombinação (elemento de 59 bases). Na maioria dos casos, os genes cassetes que carregam uma MBL carregam também um gene *aacA4* que codifica resistência para amicacina, neomicina e estreptomicina (Walsh et al., 2005). Os genes cassetes que carregam

resistência a antimicrobianos podem mover-se livremente de um integron para outro, porém não podem se mover de um microrganismo para outro sem o auxílio de outros elementos genéticos, como plasmídeos e transposons (Benett, 1999). A maioria dos genes de MBLs, presentes em integrons, é carregada por plasmídeos grandes não conjugativos (entre 120 e 180 Kb), entretanto alguns genes, como VIM-7, são carregados por plasmídeos conjugativos (24 Kb) (Toleman et al., 2004).

Nem todos os genes de MBLs estão associados a integrons ou transposons, como dito anteriormente. O gene *bla*_{SPM-1} é adjacente a genes intimamente relacionados com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e não a integrons ou transposons. O gene *bla*_{SPM-1} é parte de uma ilha de patogenicidade e é encontrado em um plasmídeo de aproximadamente 180 Kb. As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* têm sido associadas a regiões móveis comuns, as quais têm sido associadas a outros elementos móveis, denominados regiões SXT, que podem ser mobilizadas em condições de estresse bacteriano (Walsh et al., 2005). Toleman et al. (2002) encontraram 250 pares de bases *upstream* do gene SPM-1 que corresponde a um gene codificante de uma proteína tipo-LysR. O contexto genético do SPM-1 mostrou-se similar ao locus *qac/LysR* associado a β -lactamase PSE-1 de uma ilha de múltipla resistência a drogas encontrada em *S. enterica* sorovar *Typhimurium* DT104 (Toleman et al., 2002).

A SPM-1 foi identificada em amostra de uma cepa de *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Essa amostra

bacteriana foi enviada ao programa SENTRY, que, em parceria com o laboratório Bristol Centre for Antimicrobial Research and Evaluation (BCARE), da Universidade de Bristol, Inglaterra, caracterizou esse novo determinante de resistência. O gene que codifica SPM-1 parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não foi detectado em demais microrganismos responsáveis por infecções nosocomiais (Mendes et al., 2006).

2.4 Resistência bacteriana no esgoto hospitalar

Diversas bactérias resistentes a antimicrobianos e diferentes genes de resistência têm sido detectados em amostras ambientais, como esgoto hospitalar (Iversen et al., 2002; Fuentefria et al., 2008a; Fuentefria et al., 2008b; Tuméo et al., 2008) lodo ativado (Reinthalder et al., 2003; Prado et al., 2008), esgoto doméstico (Tennstedt et al., 2003) e águas de rios contaminadas por esgoto (Costanzo et al., 2005). Esses agentes antimicrobianos e bactérias resistentes a antimicrobianos são descartadas em grandes quantidades no ambiente, principalmente como resultado do uso freqüente e, muitas vezes inapropriado, de antimicrobianos nas práticas médicas, veterinárias e agrícolas (Goñi-Urriza et al., 2000). Há mais de três décadas, estudos demonstram que efluentes hospitalares apresentam níveis mais elevados de bactérias entéricas resistentes a antimicrobianos do que efluentes derivados de outras fontes e, que a concentração de antimicrobianos na água que recebe o esgoto hospitalar também é superior, criando um ambiente com forte pressão seletiva (Linton et al., 1974). Sabe-se que ambientes fortemente seletivos, como o ambiente hospitalar, podem levar a um aumento da freqüência de bactérias resistentes a

antimicrobianos, as quais são liberadas no esgoto hospitalar (Meirelles-Pereira et al., 2002; Prado et al., 2008). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o esgoto hospitalar é muitas vezes drenado para o sistema de esgoto municipal, que por sua vez, é lançado no ambiente, sem tratamento prévio.

P. aeruginosa é um microrganismo ubíquo, capaz de persistir em diversos ambientes por sua capacidade de utilizar diferentes compostos orgânicos como fonte de energia e de sobreviver por longos períodos em ambientes úmidos (Tuméo et al., 2008). No ambiente hospitalar, os fluidos biológicos de pacientes colonizados ou infectados por *P. aeruginosa* são descartados na rede de esgoto hospitalar, o que oferece risco de contaminação ambiental. Nesse sentido, a disseminação de cepas resistentes a antimicrobianos pode representar um potencial risco de saúde pública, uma vez que a *P. aeruginosa* é uma espécie bem adaptada, capaz de sobreviver e multiplicar-se nesse ambiente formando rotas de disseminação e reservatórios ambientais de genes de resistência (Meirelles-Pereira et al., 2002).

2.5 Tipificação Molecular de *Pseudomonas aeruginosa*

Bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose, como a *P. aeruginosa* são importantes causa de infecções em pacientes imunocomprometidos. A técnica epidemiológica mais útil para estabelecer a relação genética entre cepas é a caracterização ou tipificação molecular. Essas técnicas utilizam diversos métodos baseados na análise do DNA dos patógenos bacterianos, que geram diferentes “impressões digitais” dessas cepas, que podem ser visualizadas pela coloração com brometo de etídeo ou por hibridização com ácidos nucléicos. Dentre essas diversas metodologias, destacam-se a

Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e a Amplificação de Sequências Intergênicas Repetidas de Enterobactérias (ERIC-PCR).

2.5.1 Amplificação de Seqüências Intergênicas Repetidas de Enterobactérias (ERIC-PCR)

Elementos de DNA repetitivos dispersos ocorrem naturalmente e são encontrados em muitos, se não em todos, os gêneros bacterianos e podem servir como *primers* para amplificação do DNA genômico (Versalovic et al., 1991). Diferentes famílias de seqüências repetitivas estão dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas, entretanto três famílias têm sido mais estudadas: o elemento REP (*repetitive extragenic palindromic*) de 35-40 pb, o elemento ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) de 124-127 pb e o elemento BOX de 154 pb (Versalovic et al., 1994). Todos esses elementos possuem seqüências palindrômicas invertidas e repetidas centrais altamente conservadas. A verdadeira função desses elementos altamente repetitivos e conservados ainda é um enigma, embora seu envolvimento na estabilização do RNAm (Newbury et al., 1987), recombinação homóloga (Shyamala et al., 1990), organização do cromossoma e ligação a proteínas HU, DNA girase e DNA polimerase I tenha sido sugerido (Higgins et al., 1982; Yang & Ames, 1988; Gilson et al., 1990). Entretanto, até o momento, nenhuma função específica é capaz de explicar satisfatoriamente a conservação da seqüência de DNA e sua ubíqua distribuição no genoma bacteriano (Hulton et al., 1991).

Essas seqüências consenso permitiram que Versalovic et al. (1991) desenhasse oligonucleotídeos iniciadores específicos para o elemento ERIC e

testasse o genoma de uma grande variedade de eubactérias para a presença dessas seqüências tipo-ERIC, através da reação da polimerase em cadeia (PCR). O elemento ERIC pode ser amplificado com um único *primer* ou com um par de *primers*, ERIC1 e ERIC2 (Versalovic et al., 1991). Os pesquisadores encontraram seqüências tipo-ERIC, com significativo grau de homologia com as seqüências consenso de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, em uma grande variedade de gêneros bacterianos, embora uma hibridização de DNA preferencial com bactérias Gram-negativas tenha sido observada (Versalovic et al., 1991). Essas regiões, localizadas entre os elementos ERIC, variam de tamanho devido a diferenças entre cepas individuais e, assim, fragmentos de diferentes tamanhos são amplificados, criando padrões únicos e característicos quando separados por eletroforese em géis de agarose. Assim, a ERIC-PCR foi proposta por Versalovic et al. (1991) como uma metodologia útil para tipificação de genomas bacterianos e tem sido utilizada inclusive para tipificação de *P. aeruginosa*, mostrando-se uma metodologia com grande poder discriminatório e boa reprodutibilidade (Luzzaro et al., 2001; Silbert et al., 2004; Agarwal et al., 2002).

2.5.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada o “padrão ouro” das técnicas de tipificação molecular. Na PFGE, células bacterianas íntegras embebidas em agarose são sujeitas à lise celular enzimática e por detergentes e à posterior digestão com uma enzima de restrição de corte raro. A reação de macro-restrição é sujeita à eletroforese em

um sistema onde a polaridade da corrente é alternada em intervalos predeterminados (Olive & Bean, 1999).

Através desse princípio, a PFGE permite a separação de fragmentos de DNA grandes, com tamanhos moleculares variando de 10 a 800 Kb, ao contrário de géis de agarose convencionais, que não permitem a migração eficiente de moléculas de DNA maiores que 40-50 Kb (Singh et al., 2006). Os fragmentos resultantes são estáveis, de excelente resolução e representam todo o genoma do microrganismo analisado e, além disso, os resultados podem ser reproduzidos entre diferentes laboratórios que utilizam o mesmo protocolo (Olive & Bean, 1999).

O sistema de PFGE mais utilizado é o CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field*), que utiliza uma câmara com múltiplos eletrodos, permitindo estabelecer condições com campos elétricos altamente eficientes para separação; geralmente o sistema reorienta as moléculas de DNA pela mudança do campo elétrico em ângulos de 120° (Singh et al., 2006).

Diversos estudos que definem o padrão de fragmentos de diferentes bactérias, digeridas com diferentes enzimas de restrição, têm sido desenvolvidos; entretanto, a grande maioria dos trabalhos que envolvem análise de *P. aeruginosa* por PFGE utiliza protocolos padronizados, nos quais o DNA genômico é clivado com a enzima de restrição *SpeI* (Luzzaro et al., 2001; Freitas & Barth, 2002; Gales et al., 2004). A PFGE tem se mostrado superior a maioria dos outros métodos de tipificação molecular, com grande poder discriminatório na análise de *Escherichia coli*, *Enterococcus* resistentes à vancomicina, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*

spp., (Gales et al., 2004; Biavasco et al., 2007; Wang et al., 2007; Campbell et al., 2008; Laing et al., 2008), entre outros.

2.6 Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE)

A técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE) permite analisar produtos de PCR com base na sua seqüência de nucleotídeos e não na diferença do tamanho dos produtos. A DGGE utiliza géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturante (uréia e formamida). Moléculas de DNA de mesmo tamanho, mas com seqüência de nucleotídeos diferente, apresentam comportamento eletroforético diferente quando expostas ao gradiente de agentes desnaturantes. A dupla fita de DNA é desnaturada ao atingir uma determinada concentração de desnaturante e a migração é retardada. Assim, a seqüência de nucleotídeos de um fragmento de DNA definirá a posição no gradiente em que o DNA de fita dupla irá desnaturar-se, passando parcialmente a fita simples, que não possui mais mobilidade no gel. A desnaturação completa das fitas não ocorre devido a um domínio de alto gradiente de desnaturação, criado artificialmente em uma das extremidades da molécula pela incorporação de um grampo-GC. Uma vez que moléculas de DNA, com seqüências diferentes, apresentam taxas de migração diferentes em géis desnaturantes, esta metodologia é uma poderosa ferramenta para estudos de variações em seqüências gênicas (Muyzer & Smalla, 1998; Muyzer, 1999).

Em princípio, a DGGE pode ser utilizada para estudo de qualquer grupo de genes amplificado pela PCR e serve como uma triagem na pesquisa de seqüências alélicas de um mesmo gene (Gurtler et al., 2002). Algumas das aplicações desta técnica objetivaram o estudo da estrutura e evolução de

comunidades microbianas do solo (Avarhami et al., 2003; Nicol et al., 2003); do mar, rios e lagos (Bano & Hollibaugh, 2002; Sekiguchi et al., 2002 e Crump et al., 2003); e de amostras clínicas (Burton et al., 2003; Mc Bain et al., 2003). A PCR-DGGE também tem sido utilizada como ferramenta para identificação e tipificação microbiana (Gurtler et al., 2002).

O grande potencial da DGGE estimulou a sua utilização para investigar a diversidade dos genes produtores de metalo β -lactamses, uma vez que a PCR diferencia apenas a classe de metalo- β -lactamase, necessitando do sequenciamento do gene para confirmação do alelo. Recentemente, Mendes et al. (2007) basearam-se no comportamento de desnaturação de fragmentos de metalo β -lactamses amplificados por PCR em tempo real para diferenciação dos tipos de MBLs. A técnica desenvolvida, que se baseia num princípio semelhante ao da DGGE, permitiu não somente a detecção de isolados clínicos portadores de MBLs, mas também a diferenciação do tipo de MBL presente em função da análise da curva de desnaturação. Em outro estudo, Henriques et al. (2006) utilizaram a DGGE-PCR para avaliar a diversidade em genes de β -lactamases de ambientes aquáticos e mostraram que a maioria das seqüências avaliadas, principalmente *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA-2}, são idênticas ou muito similares às seqüências dos genes de β -lactamases previamente caracterizadas em isolados clínicos. Outros estudos têm utilizado a PCR-DGGE para avaliar a diversidade em diferentes genes de resistência (Chee-Sanford et al., 2001; McCammon et al., 2005), ampliando o campo de utilização desta metodologia.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Artigo 1: *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial

Artigo publicado na “Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical”.

***Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente
hospitalar e água superficial**

***Pseudomonas aeruginosa*: spread of antimicrobial resistance on hospital sewage and
superficial water**

Daiane Bopp Fuentefria¹, Alessandra Einsfeld Ferreira¹, Tiago Gräf² e Gertrudes Corção^{1,2}

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar amostras de efluente do Hospital São Vicente de Paulo com amostras de água do Rio Passo Fundo, quanto ao perfil de susceptibilidade de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, para inferir sobre a presença de isolados de origem hospitalar em amostras de água superficial. A significância estatística entre os perfis de susceptibilidade das amostras foi testada por análise de variância e a comparação das amostras foi feita por contrastes de interesse. Foram identificados 198 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* a partir das amostras analisadas. O fenótipo de multirresistência não foi observado nas amostras do Rio Passo Fundo, embora alguns isolados resistentes a carbapenêmicos tenham sido identificados, indicando a presença de contaminação com bactérias provenientes de um ambiente sob forte pressão seletiva. Diferenças significativas entre as amostras de água e efluente hospitalar foram observadas a partir da análise de variância por contrastes de interesse.

Palavras-chaves: *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência bacteriana. Águas superficiais. Esgoto hospitalar.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare samples of sewage from the Hospital São Vicente de Paulo with water samples from the Passo Fundo River, by assessing the susceptibility profiles of strains of *Pseudomonas aeruginosa* with the aim of evaluating the presence of hospital strains in samples of superficial water. The statistical significance between the susceptibility profiles of the samples was tested by analysis of variance, and the samples were compared by contrasts of interest. One hundred and ninety eight strains of *Pseudomonas aeruginosa* were recovered from the analysed samples. No multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* was found in the Passo Fundo River, although some carbapenem-resistant isolates were

identified, indicating the presence of contamination with bacteria derived from an environment under strong selection pressure. Significant differences between samples from surface water and those from hospital sewage were observed, based on the analysis of variance by contrasts of interest.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial resistance. Superficial water. Hospital sewage.

Antibióticos e bactérias resistentes são descartados em grandes quantidades no ambiente⁶ como resultado do aumento e freqüente uso indiscriminado de antibióticos nas práticas médicas, veterinárias e agrárias. As águas dos rios são os principais receptores desses poluentes, uma vez que recebem os esgotos urbano, industrial e hospitalar. Os rios são considerados uma das principais fontes de água, direta ou indiretamente, para consumo humano e animal, portanto, esta poluição pode contribuir para a manutenção e até disseminação da resistência bacteriana⁵. O esgoto hospitalar, especificamente, libera uma variedade de substâncias além de antibióticos, tais como fármacos, desinfetantes, anestésicos, metais pesados e drogas não metabolizadas por pacientes³. A ocorrência de ambientes fortemente seletivos para os microrganismos, como o ambiente hospitalar, gera um aumento da freqüência de genes de resistência bacteriana. Estudos têm demonstrado que efluentes hospitalares apresentam níveis mais elevados de bactérias entéricas resistentes a antimicrobianos do que efluentes derivados de outras fontes e, que a concentração de antimicrobianos na água que recebe o esgoto hospitalar também é superior, criando um ambiente com forte pressão seletiva¹⁰. Além disso, as precárias condições de saneamento básico e a falta de tratamento dos efluentes hospitalares podem estabelecer rotas de disseminação de bactérias multirresistentes^{1 13}.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais microrganismos recuperado de efluentes hospitalares. É um patógeno nosocomial freqüente, responsável por infecções em

diversos sítios do corpo humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Está amplamente distribuída no ambiente e é capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos e desenvolver resistência a agentes antimicrobianos⁴. Além da característica intrínseca de apresentar baixo nível de sensibilidade aos antimicrobianos, diversos mecanismos de resistência têm sido identificados em *Pseudomonas aeruginosa*, como hiperexpressão de bombas de efluxo, produção de β -lactamases, perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa^{9 11 12}. Frequentemente, isolados de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive contra cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipenem e meropenem). Por estas razões, as infecções causadas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes estabelecem um substancial desafio para a terapia antimicrobiana, trazendo ao cenário atual a inevitável necessidade de identificar essas bactérias multirresistentes no efluente hospitalar e avaliar sua contribuição para a disseminação da resistência em amostras de água superficial.

Este estudo visa comparar o perfil de susceptibilidade entre amostras de efluente hospitalar e de água superficial, através de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes das respectivas amostras, com o intuito de inferir sobre a presença de isolados de origem hospitalar em amostras de água superficial do Rio Passo Fundo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Duas coletas foram realizadas, nos meses de Outubro/2005 e Março/2007, totalizando 12 amostras; seis de efluente hospitalar e seis de água superficial. As amostras de efluente foram coletadas do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), um hospital de 635 leitos, localizado em Passo Fundo, RS. As amostras de água superficial foram coletadas do Rio Passo Fundo em três pontos distintos: próximo à nascente do rio (Ponto A); à montante do descarte

do efluente hospitalar (Ponto B) e à jusante do descarte do efluente hospitalar (Ponto C). Os Pontos D, E e F são amostras de efluente hospitalar e drenam diferentes setores hospitalares. Foram coletadas amostras de 1L de água superficial ou efluente hospitalar. Alíquotas de 100mL foram filtradas em membranas de ésteres mistos de 0,45µm de porosidade. As membranas foram transferidas para o caldo seletivo asparagina e, posteriormente, alíquotas de 100µl dos tubos positivos foram transferidas para caldo acetamida e isoladas em ágar acetamida, para seleção de colônias características.

Identificação dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. A identificação fenotípica foi realizada pela coloração de Gram e provas bioquímicas convencionais, como citocromo-oxidase, fermentação e oxidação da glicose, fermentação e oxidação da lactose, crescimento em caldo simples a 42°C, motilidade, produção de H₂S, redução de nitrato e produção de pioverdina. A identificação foi confirmada pela amplificação de um fragmento do 16S rDNA de *Pseudomonas aeruginosa*.

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. O perfil de susceptibilidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foi determinado pela técnica de disco-difusão de acordo com as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute*, 2005⁶. Os seguintes antibióticos foram testados: amicacina (30µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg), ceftazidima (30µg), piperacilina-tazobactam (100µg/10µg), ticarcilina-ácido clavulânico (75µg/ 10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), cefepime (30µg), aztreonam (30µg) e polimixina B (300µg)⁴. Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência à pelo menos quatro classes diferentes de antimicrobianos. A cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle de qualidade dos testes de susceptibilidade.

Análise estatística. Os perfis de susceptibilidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* nos diferentes pontos de coleta foram analisados, sendo a significância estatística entre as diferenças testada por meio de análise de variância por testes de aleatorização (com intervalo

de confiança de 95%). A hipótese nula (H_0) formulada é de que não existe diferença entre os perfis de susceptibilidade dos grupos analisados. A comparação dos perfis de susceptibilidade foi feita por contrastes de interesse, a fim de comparar amostras de efluente hospitalar com amostras de água superficial. Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram considerados unidades amostrais e os antibióticos, variáveis. Os dados originais foram transformados para dados semiquantitativos (sendo: 0= sensível; 1= intermediário e 2= resistente ao antibiótico testado) para cálculo de distância euclidiana entre unidades amostrais. A análise de variância foi realizada com auxílio do Programa Multiv (versão 242).

RESULTADOS

Foram identificados 198 isolados de *Pseudomonas aeruginosa*: 53 do Ponto B; 18 do Ponto C; 42 do Ponto D; 44 do Ponto E e 41 do Ponto F. Nenhum isolado de *P. aeruginosa* foi recuperado no Ponto A.

Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do Ponto B apresentaram 77,3% de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, sendo que a principal resistência observada foi ao imipenem. No Ponto C, a taxa de sensibilidade a todos antimicrobianos testados foi de 44,4% e a resistência dos isolados foi verificada predominantemente frente ao meropenem, sendo 55,5% resistentes aos carbapenêmicos. Os isolados do Ponto D (efluente hospitalar) foram, na sua maioria, sensíveis a todos os antibióticos testados (80,9%), com exceção de dois isolados que apresentaram resistência a imipenem, meropenem, cefepime e aztreonam. Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do Ponto E também apresentaram alto índice de susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados (65,9%), embora 34% dos isolados tenham apresentado resistência aos carbapenêmicos. O Ponto F apresentou 73,2% de isolados resistentes a imipenem e/ou meropenem e 78% dos isolados com fenótipo de multirresistência (Tabela 1).

A análise de variância por aleatorização mostrou que o fator local de coleta apresenta diferenças significativas entre os grupos analisados ($p < 0,05$). A Tabela 2 mostra que a comparação entre as amostras de água superficial e de efluente hospitalar apresentou diferenças significativas entre os contrastes analisados ($p < 0,05$). Todos os contrastes analisados mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Dentre os 198 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados, 71 foram provenientes de água superficial. O ponto A, próximo à nascente, não apresentou nenhum isolado de *Pseudomonas aeruginosa*, talvez por não receber efluente da Cidade de Passo Fundo e, portanto, não ser um local impactado. O ponto C, à jusante do descarte do efluente hospitalar, apresentou menor número de isolados do que o ponto B (à montante); talvez, o Ponto B esteja recebendo outra fonte de contaminação, que tenha contribuído para o maior número de isolados. Entretanto, quanto ao perfil de susceptibilidade, os isolados do Ponto B mostraram menor índice de resistência a carbapenêmicos, quando comparados aos isolados do Ponto C. Ao todo, 127 isolados foram recuperados das amostras do efluente hospitalar, sendo que o número de isolados de cada ponto não mostrou diferenças significativas.

Diversos estudos comprovam a presença de bactérias resistentes em água superficial. No presente estudo, foi observada resistência a carbapenêmicos em amostras de água do Rio Passo Fundo (Tabela 1), embora o fenótipo de multirresistência não tenha sido observado. Além disso, a resistência ao imipenem encontrada em alguns isolados do Ponto B pode indicar uso de antibióticos carbapenêmicos na comunidade, uma vez que as águas do Ponto B não recebem efluente do HSVP, apenas efluente domiciliar e industrial. O uso doméstico de antibióticos pode estar exercendo pressão seletiva suficiente para permitir o aparecimento de isolados resistentes, aumentando o problema de resistência na comunidade².

As amostras de efluente hospitalar, principalmente os pontos E e F, apresentaram alta porcentagem de isolados resistentes a carbapenêmicos e, no Ponto F especificamente, 78% de isolados multirresistentes, com resistência principalmente a gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulânico, imipenem, e aztreonam. O Ponto F drena o maior número de enfermarias do HSVP, além de setores de coleta ambulatoriais e administrativos, assim, provavelmente a alta taxa de multirresistência tenha ocorrido, entre outros fatores, em função de água de banho desses pacientes e por ser o ambiente com menor número de Centros de Tratamento Intensivos (CTIs), provavelmente sujeito a menor controle de infecção.

Além de substâncias antimicrobianas e desinfetantes, bactérias resistentes também são excretadas por seres humanos e lançadas no efluente, podendo alcançar outros compartimentos ambientais⁸. A pressão seletiva exercida pelos antibióticos normalmente presentes no efluente hospitalar é um importante fator de seleção de bactérias resistentes, como as encontradas nos pontos E e F deste estudo. Por outro lado, existem muitas evidências de que a resistência antimicrobiana já esteja presente em ambientes naturais e que ocorra apenas a troca de genes entre bactérias¹⁰, fato que também pode estar ocorrendo entre os isolados do presente estudo, uma vez que os principais mecanismos de resistência aos antibióticos onde foi observada resistência (gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulânico, imipenem, e aztreonam) são adquiridos e passíveis de transferência horizontal.

As diferenças significativas observadas a partir da análise de contrastes de interesse ($p = 0,001$) ocorrem em função dos perfis de susceptibilidade dos isolados desses pontos. Quando amostras de água superficial (Pontos B e C) foram comparadas com amostras de efluente hospitalar (Pontos D, E e F) observou-se diferença significativa, que pode ser explicada, principalmente, pelo fato de que 78% dos isolados do ponto F apresentaram o fenótipo de

multirresistência, enquanto que esse fenótipo não foi observado nos pontos B e C. Esses dados indicam que os isolados bacterianos presentes no efluente do HSVP apresentam um perfil de susceptibilidade diferente das recuperadas do rio Passo Fundo. Entretanto, o fato de nove isolados do Ponto C (n=18) apresentarem susceptibilidade reduzida ao meropenem não descarta a hipótese de que a contaminação dessas águas esteja ocorrendo, de alguma maneira, através do efluente hospitalar, pois o meropenem é um antibiótico de amplo espectro e de uso hospitalar restrito.

Nenhum isolado multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa* foi encontrado nas amostras de água superficial do rio Passo Fundo e, diferenças significativas foram observadas entre os perfis de susceptibilidade dos isolados de água superficial e efluente hospitalar. Entretanto, um grau detectável de resistência pôde ser observado entre do Rio Passo Fundo, indicando uma possível contaminação por bactérias provenientes de um ambiente sob forte pressão seletiva, como é o ambiente hospitalar. Ambientes aquáticos contaminados podem constituir uma rota de disseminação de resistência bacteriana para a comunidade. Assim, reduzir a liberação de bactérias do ambiente hospitalar para a comunidade torna-se essencial para evitar o surgimento de reservatórios ambientais de resistência a antibióticos. Estudos de caracterização molecular adicionais devem revelar se existe ou não relação genética entre os isolados resistentes recuperados das amostras de água superficial e os isolados de efluente hospitalar, indicando uma possível rota de contaminação neste ambiente.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital São Vicente de Paulo, pela aprovação das coletas de amostras de esgoto para este projeto. O presente trabalho recebeu financiamento CAPES-PROF.

REFERÊNCIAS

1. Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 2: 510-518, 2004.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Abstract of the 15th Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute document. M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9), Wayne, Pennsylvania, USA 38-39, 2005.
3. Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Materials A117*: 1-11, 2005.
4. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 183-190, 2001.
5. Goni-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 125-132, 2000.
6. Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 36: 357-393, 1998.
7. Kümmerer K. The significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 5-7, 2001.
8. Kümmerer K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 311-320, 2004.

9. Li XZ, Barre N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 46:885-93, 2000.
10. Linton KB, Richmond MH, Bevan R, Gillespie WA. Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. *Journal of Medical Microbiology* 7: 91-103, 1974.
11. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Disease* 34:634-40, 2002.
12. Masuda N, Ohya S. Cross-resistance to meropenem, cepheims, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial and Agents Chemotherapy* 36:1847-1851, 1992.
13. Muela A, Pocino I, Arana J, Justo JI, Iriberry J, Barcina I. Effects of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4273-4278, 1994.

Tabela 1 - Susceptibilidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* das amostras de água superficial (Pontos de coleta B e C) e efluente hospitalar (Pontos de coleta D, E e F).

Dados gerais de susceptibilidade	Pontos de coleta				
	nº isolados <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%)				
	B (n=53)	C (n=18)	D (n=42)	E (n=44)	F (n=41)
Isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados	41 (77,3)	8 (44,4)	34 (80,9)	29 (65,9)	4 (9,7)
Isolados resistentes a imipenem e/ou meropenem	12 (22,6)	10 (55,5)	6 (14,3)	15 (34)	30 (73,2)
Isolados multirresistentes	0 (0)	0 (0)	2 (4,8)	0 (0)	32 (78)

Tabela 2 - Soma de Quadrados (Q) e Probabilidades (P) encontradas a partir da análise de variância analisando contrastes específicos entre amostras de água superficial (Pontos B e C) e esgoto hospitalar (Pontos D, E e F).

Fator de variação: local	Soma de quadrados (Q)	<i>P</i>
Entre grupos	465,04	0,001
Contrastes		
Ponto B x Pontos DEF	128,88	0,001
Ponto C x Pontos DEF	108,95	0,001
Pontos BC x Pontos DEF	180,7	0,001
Dentro de grupos	227,84	
Total	692,87	

3.2 Artigo 2: Spread of Metallo- β -lactamases: Screening reveals the presence of a *bla*_{SPM-1} gene in hospital sewage in southern Brazil

Artigo aceito para publicação na revista “Brazilian Journal of Microbiology”.

**Spread of Metallo- β -lactamases: Screening reveals the presence of a *bla*_{SPM-1}
gene in hospital sewage in southern Brazil**

Authors: Daiane Bopp Fuentefria¹, Alessandra Einsfeld Ferreira¹, Tiago Gräf²,
Gertrudes Corção^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA) –
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Correspondence to: Dr. Gertrudes Corção, Departamento de Microbiologia, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500. Cidade Baixa.
Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil. Tel/Fax: +55-51-3308-4111; E-mail:
corcao@ufrgs.br

Spread of Metallo- β -lactamases: Screening reveals the presence of a *bla*_{SPM-1} gene in hospital sewage in southern Brazil

Abstract: Of 396 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospital sewage, the *bla*_{SPM-1} gene was confirmed in nine. This is the first report of environmental *P. aeruginosa* strains carrying the *bla*_{SPM-1} gene in Brazil. The carbapenem resistance, already disseminated among clinical isolates, has been detected among environmental isolates.

Key words: Metallo- β -Lactamases, hospital sewage, *P. aeruginosa*, bacterial resistance

Disseminação de Metallo- β -Lactamases: Triagem revela a presença do gene *bla*_{SPM-1} em efluente hospitalar no Sul do Brasil

Resumo: Ao todo, 396 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram estudados. O gene *bla*_{SPM-1} foi encontrado em nove isolados de efluente hospitalar. Este estudo é o primeiro relato de isolados ambientais de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} no Brasil. A resistência aos carbapenêmicos, amplamente disseminada entre isolados clínicos, já é detectada em isolados ambientais.

Palavras-chave: Metallo- β -Lactamases, efluente hospitalar, *P. aeruginosa*, resistência bacteriana

Metallo- β -lactamases (MBLs) are emerging worldwide as a source of acquired carbapenem resistance in Gram-negative bacteria, especially *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. and Enterobacteriaceae. A particular concern is that acquired MBL genes are located on integron structures that reside on mobile genetic

elements such as plasmids or transposons (17), thus enabling widespread dissemination. The emergence of these enzymes drastically compromises effective treatments of infections by these microorganisms, since MBLs are capable of hydrolyzing most β -lactams, including carbapenems, and are not susceptible to inhibitors. During the last few years, several MBL-producing bacteria have been reported in Brazil (4, 6, 7, 10, 12,15). These isolates were found almost exclusively in hospital settings. Recently, a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* VIM-2 strain was isolated outside hospital boundaries, from hospital sewage. This finding suggests that the ongoing spread of the *bla*_{VIM-2} is occurring simultaneously in several dimensions, since it can now be found in different environments and in several bacterial species (13). Another study revealed the presence of *bla*_{VIM-2} in two unrelated *P. aeruginosa* strains from aquatic environments (14). The release of antibiotic-resistant bacteria into the community is a particular concern, since they might proliferate in soil and surface water, persist and spread in different environments, and transfer antibiotic-resistance genes among different species (3). However, the role and the presence of outside hospital niches acting as a reservoir for bacteria that carry acquired MBLs genes is still poorly established, and there is a need for further evaluation. Because the *bla*_{SPM-1} MBL gene is the most prevalent in Brazil, its presence was evaluated in *P. aeruginosa* isolates from hospital sewage and surface-water samples, in order to obtain epidemiological data on the spread and dissemination of this gene in environmental samples in southern Brazil. This is the first report of environmental *P. aeruginosa* strains carrying a *bla*_{SPM-1} like gene. Sewage samples were collected from the Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), located in Passo Fundo, Rio Grande do Sul (RS), Brazil, and the Hospital Divina Providência (HDP), located in Porto Alegre, RS, Brazil. Samples were also collected from waterbodies upstream and downstream of the hospitals' sewage discharge outlets (Table 1). Samples of 1 L of surface water or

hospital sewage were collected in sterile bottles and stored at 4° C until processing. Aliquots of 100 mL were filtered on membranes of mixed esters of 0.45 µm porosity. The membranes were then transferred to the selective asparagine broth. The appearance of green fluorescence under ultraviolet light was considered a positive result. Aliquots of 100 µl from the positive tubes were transferred to acetamide broth and subsequent isolation in acetamide agar, for selection of the characteristic colonies. Biochemical tests and amplification of 16S rDNA were used to identify all *P. aeruginosa* strains (16). Susceptibility was determined by the disk-diffusion method according to CLSI guidelines (5). The isolates were screened for MBL production using the 2-mercaptopropionic acid double-disk potentiation method and the imipenem-EDTA double-disk synergy test (1,19). The MBL Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) was used as a further test of MBL production. The MBL Etest was only done with the isolates that showed reduced susceptibility to imipenem and/or meropenem. The presence of the *bla*_{SPM-1} gene was determined by polymerase chain reaction (PCR) with the following pair of primers: SPMF (5'- TCG GAT CAT GTC GAC TTG CC -3') and SPMR (5'- CCT TCG CTT CAG ATC CTC GT -3'). *P. aeruginosa* SPM-1 producer was used as a positive control in PCR amplification reactions. The PCR fragments were confirmed by sequencing. A total of 198 *P. aeruginosa* strains were recovered from HSVP (Table 1). Among these, 78 isolates showed reduced susceptibility to imipenem and/or meropenem, and were submitted to the MBL Etest, where 7.8% (n= 6) of the isolates showed positive results. From HDP, 198 isolates were recovered (Table 1). Eleven isolates showed reduced susceptibility to imipenem and/or meropenem, and were also submitted to the MBL Etest. Of these, 27.3% (n=3) showed positive results, including H9, H11 and H12 strains. All isolates were susceptible to polymyxin B. The H8, H9, H11, H12 and H13 strains from HDP were resistant to all antimicrobials tested, except for piperacillin-tazobactam, aztreonam and polymyxin B. The *bla*_{SPM-1} gene was detected by PCR amplification among four strains from the HSVP (strains D30, F3, F7

and F20). Five isolates (strains H8, H9, H11, H12 and H13) from Point H hospital sewage were confirmed with the 344 bp fragment of *bla*_{SPM-1} gene in HDP. Sequence analysis of the fragments showed 100% identity with the *bla*_{SPM-1} gene of *P. aeruginosa* (accession number DQ145284). The accession number for the sequences of the PCR fragments from H8, H9, H11 H12 and H13 isolates, are FJ197850, FJ197851, FJ197852, FJ197853 and FJ197854, respectively. Great variability was seen in the resistance profile among the different isolates from hospital sewage and surface water. The *P. aeruginosa* isolates from HSVP showed imipenem and/or meropenem resistance in samples taken at all points, including Passo Fundo River points B and C. Point C isolates averaged 55.5% imipenem and/or meropenem resistance, but no multiresistant strains were detected (Table 2). The high percentage of carbapenem, resistance observed in a strain from Point C suggests that selection has occurred in this environment; it possibly originated from the HSVP activities, since this point is located downstream from the HSVP sewage discharge. Point B averaged 22.6% carbapenem resistance. Although this point is located upstream from the HSVP sewage outlet, it seems that this area receives hospital sewage and also domestic effluents. This type of resistance may indicate the degree of selection exerted by the indiscriminate use of antibiotics in a community setting. The domestic use of antimicrobials has expanded, and may be exercising enough selection pressure to permit the appearance of resistance profiles, therefore confirming the problem of resistance in the community (2). It is generally assumed that antibiotic use has a significant impact on bacterial resistance rates. Lepper et al. (2002) demonstrated that the consumption of imipenem was correlated with β -lactam resistance in *P. aeruginosa*, in a hospital setting. This behavior must have also occurred in the community setting of the present study. The percentage of carbapenem resistance from HDP was much lower than HSVP, and the number of multiresistant strains was also lower (Table 2). This difference may be a function of the smaller size of the HDP, which accepts

approximately 9,000 internments per year; the HSVP accepts around 28,000 internments. Recently, clinical isolates of *P. aeruginosa* producing SPM-1 were reported in the São Lucas Hospital (SLH) and the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil (19). It is important to note that the five isolates with positive SPM-1 results found in the present study (strains H8, H9, H11, H12 and H13) were collected from locations that are geographically distant from the health institutions mentioned by Zavascki et al. (2006), and that there was no physical link between SLH, HCPA and HDP. Nevertheless, the presence of the bla_{SPM-1} gene in the five strains found in the present study suggests that genes carrying antibiotic resistance associated with the clinical setting might be continuously contaminating the community environment through wastewater discharge. High rates of carbapenem resistance were found in *P. aeruginosa* strains from this study, especially in HSVP isolates (Table 2). Many isolates showed a positive MBL screening test, but did not have the bla_{SPM-1} gene. Because they were previously detected in clinical isolates of *P. aeruginosa* in Porto Alegre, RS, the genes bla_{IMP-1} and bla_{VIM-1} were also investigated by PCR; however, neither of these was detected in the present study (7, 11). Therefore, these isolates may be carrying another type or another allele variant of the MBL gene, or may even show another mechanism of resistance to the carbapenems.

It is noteworthy that poor sanitation and proper care with hospital effluents is not observed, and these effluents are often discharged completely untreated into waterbodies. These waterbodies receiving effluents containing strongly selected bacteria can constitute an important route of transfer of multiresistance between hospital (high-selection compartments) and the community. This study is the first report of an environmental *P. aeruginosa* strain carrying the bla_{SPM-1} gene in Brazil. It now seems clear that this type of carbapenem resistance has already crossed the hospital boundaries. Reducing the release of bacteria or genetic elements from the clinical setting into the community is becoming a critical issue, to avoid the buildup of

environmental reservoirs of antibiotic resistance. Not only is the case of transfer of genetic resistance elements in the environment a reminder for proper hygiene, but it is also illustrates the importance of reducing the use of antimicrobial agents so as decrease the level of antimicrobial resistance among bacteria. There is general agreement that the pool of resistance genes in the environment is amplified by the use of antimicrobial agents (8). Minimizing the use of antimicrobial agents will reduce the risk of spread of resistance factors in the environment, securing the continuous benefit of antimicrobial drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks to Dr. Ana Cristina Gales (Laboratório Alerta and Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Division of Infectious Diseases, Universidade Federal de São Paulo) who kindly provided the *Pseudomonas aeruginosa* used as the positive control in this study. We are also grateful to CAPES-PROF for financial support.

REFERENCES

1. Arakawa, Y.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Kurokawa, H.; Yagi, T.; Fujiwara, H.; Goto, M. (2000) Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by using Thiol Compounds. *J. Clin. Microbiol.* 3, 40-43
2. Baquero, F.; Negri, M.C.; Morosini, M.I.; Blázquez, J. (1997) The antibiotic selective process: concentration-specific amplification of low-level resistant populations. *Ciba. Found. Symp.* 207, 93-105
3. Baquero, F. (2004) From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 510-518.
4. Cipriano, R.; Vieira, V.V.; Fonseca E.L.; Rangel, K.; Freitas, F.S.; Vicente, A.C. (2007) Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the blaSPM clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. *Microb Drug Resist.* 13, 142-6.

5. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
6. Gales, A.C.; Menezes, I.C.; Silbert, S.; Sader, H.S. (2003) Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 699-702.
7. Gaspareto, P.B.; Martins, A.F.; Zavascki, A.P.; Barth, A.F. (2007) Occurrence of bla_{SPM1} and bla_{IMP1} genes of metallo-β-lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 38,108-109
8. Kruse, H.; Sorum, H. (1994) Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4015-4021.
9. Lepper, P.M.; Grusa, E.; Reichl, H.; Högel, J.; Trautmann, M. (2002) Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in *P. aeruginosa*. *Antimicrobial. Agents. Chemother.* 46, 2920-2925
10. Magalhães, V.; Lins, A.K.; Magalhães, M. (2005) Metallo-Beta-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Hospitals in Recife, PE, Brazil. *Braz J Microbiol.* 36:123-125
11. Martins, A.F.; Zavascki, A.P.; Gaspareto, P.B.; Barth, A.L. (2007) Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallo-beta-lactamases in Hospitals from Southern Brazil. *Infection.* 35, 457-60
12. Pellegrino, F.L.; Casali, N.; Dos Santos, K.R.; Nouér, S.A.; Scheidegger, E.M.; Riley, L.W.; Moreira, B.M. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying bla(SPM) metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Chemother.* 18,151-6.

13. Quintera, S.; Ferreira, H.; Peixe, L. (2005) First isolation of bla_{VIM-2} in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrobial. Agents. Chemother.* 49, 2140-2141
14. Quintera, S.; Peixe, L. (2006) Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3743-3745
15. Sader, H.S.; Reis, A.O.; Silbert, S.; Gales, A.C. (2005) IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 63-82
16. Spilker, T.; Coenye, T.; Vandamme, P.; LiPuma, J.J. (2004) PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2074-2079
17. Walsh, T.R.; Toleman, M.A.; Poirel, L.; Nordmann, P. (2005) Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 306-325
18. Young, D.; Lee, K.; Yum, J.H.; Shin, H.B.; Rossolini, G.M.; Chong, Y. (2002) Imipenem-EDTA disk method for differentiation of Metallo- β -Lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Clin. Infect. Dis.* 10, 3798-3801
19. Zavascki, A.P.; Barth, A.L.; Gonçalves, A.L.S.; Moro, A.L.D.; Fernandes, J. F.; Martins, A.F.; Ramos, F.; Goldani, L.Z. (2006) The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Antimicrobial. Chemother.* 58, 387-392

Table 1 – Description of sampling points, and numbers of isolates recovered from the different points of Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) and Hospital Divina Providência (HDP).

HSVP			HDP		
Sample point	Number of isolates	Description	Sample point	Number of isolates	Description
A	0	Passo Fundo River near its source, 11,5 Km from HSVP	G	56	Hospital sewage
B	53	Passo Fundo River 800 m upstream of hospital sewage discharge	H	50	Hospital sewage
C	18	Passo Fundo River 600 m downstream of hospital sewage discharge	I	44	Gruta Streamlet
D	42	Hospital sewage	J	31	Cascata Arroyo downstream of hospital sewage discharge
E	44	Hospital sewage	K	17	Cascata Arroyo upstream of hospital sewage discharge
F	41	Hospital sewage			
Total	198		Total	198	

Table 2 – Susceptibility results from *P. aeruginosa* isolates from Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) and Hospital Divina Providência (HDP).

	HSVP sample points						HDP sample points			
	(n ^o isolates / %)						(n ^o isolates / %)			
	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
<i>Susceptibility to all antimicrobials tested</i>	41/ 77.3	8/ 44.4	34/ 80.9	29/ 65.9	4/ 9.7	37/ 66	40/ 80	41/ 93.2	28/ 90.3	15/ 88.2
<i>Resistance to IPM and/or MER</i>	12/ 22.6	10/ 55.5	6/ 14.3	15/ 34	30/ 73.2	1/ 1.8	9/ 18	1/ 2.3	0/ 0	1/ 5.9
<i>Resistance to at least four antimicrobial classes</i>	0/ 0	0/ 0	2/ 4.8	0/ 0	32/ 78	0/ 0	6/ 12	0/ 0	0/ 0	0/ 0

IPM = Imipenem, MER = Meropenem

3.3 Artigo 3: Antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital sewage and superficial water: are they genetically related?

Artigo a ser submetido para publicação na revista “International Journal of Hygiene and Environmental Health”.

**Antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital sewage
and superficial water: are they genetically related?**

***Pseudomonas aeruginosa* resistentes a antimicrobianos isoladas de
esgoto hospitalar e água superficial: estão elas geneticamente
relacionadas?**

Daiane Bopp Fuentefria, Alessandra Einsfeld Ferreira, Gertrudes Corção

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Correspondência para: Dr. Gertrudes Corção, Departamento de Microbiologia, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500. Cidade Baixa.
Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil. Tel/Fax: +55-51-3308-4111; E-mail:
corcao@ufrgs.br

Nota de rodapé: Environmental *P. aeruginosa*, Hospital sewage *P. aeruginosa*

RESUMO

Diversos estudos relatam a presença de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos em amostras ambientais, como esgoto hospitalar e água superficial. Para inferir sobre este tipo de contaminação, este estudo avaliou a contribuição do esgoto hospitalar na disseminação de *P. aeruginosa* resistentes no ambiente aquático, através da análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e similaridade genética pela ERIC-PCR. Foram coletadas amostras de esgoto de dois hospitais localizados no Rio Grande do Sul, Brasil, e amostras de água dos respectivos corpos d'água que recebem esses esgotos. A susceptibilidade dos isolados foi avaliada por disco-difusão e a genotipificação realizada pela ERIC-PCR. A ocorrência de resistência foi maior entre os isolados de esgoto hospitalar e o fenótipo de multirresistência só foi observado em isolados de esgoto hospitalar. Os padrões da ERIC-PCR não revelaram relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar e água superficial; ao contrário, mostraram que populações geneticamente distintas estão estabelecidas nos diferentes ambientes e que, provavelmente, outras fontes de contaminação, que não os esgotos hospitalares estudados, estejam contribuindo para a presença dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes a antimicrobianos nos corpos d'água.

Palavras chave: *Pseudomonas aeruginosa*. ERIC-PCR. Resistência bacteriana. Esgoto hospitalar. Água superficial.

Introdução

Diversas bactérias resistentes a antimicrobianos e diferentes genes de resistência têm sido detectados em amostras ambientais, como esgoto hospitalar (Iversen et al., 2002; Fuentefria et al., 2008a; Fuentefria et al., 2008b; Tuméo et al., 2008) lodo ativado (Reinthal et al., 2003; Prado et al., 2008), esgoto doméstico (Tennstedt et al., 2003) e águas de rios contaminadas por esgoto (Costanzo et al., 2005). A ocorrência de ambientes fortemente seletivos, como o ambiente hospitalar, leva a um aumento da frequência de bactérias resistentes a antimicrobianos, as quais são liberadas no esgoto hospitalar (Meirelles-Pereira et al., 2002; Prado et al., 2008). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o esgoto hospitalar é muitas vezes drenado para o sistema de esgoto municipal, que por sua vez, é lançado em corpos d'água, como rios, lagos e oceanos, sem tratamento prévio.

Alguns microrganismos de importância médica, como *Pseudomonas aeruginosa*, podem manter-se por longos períodos em ambientes como corpos d'água, formando rotas de disseminação e reservatórios ambientais de genes de resistência (Meirelles-Pereira et al., 2002). A *P. aeruginosa* é um microrganismo com características ubiqüitárias, presente na água, solo e plantas, sendo responsável por uma proporção bastante significativa de infecções nosocomiais (Blanc et al., 1998). Há uma grande preocupação com patógenos nosocomiais uma vez que existe a tendência de adquirirem novos mecanismos de resistência (Livrelli et al., 1996). Nesse sentido, a *P. aeruginosa* é particularmente problemática por sua resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos e sua habilidade de adquirir resistência a

praticamente todos os antimicrobianos efetivos (Gad et al., 2007). Todas essas características fazem da *P. aeruginosa* um microrganismo satisfatório para monitorar a resistência aos antimicrobianos no ambiente. Para avaliar a contribuição de esgoto hospitalar na disseminação de genes de resistência, é importante conhecer o padrão de resistência de isolados de *P. aeruginosa* que são lançados, através do esgoto hospitalar, em corpos d'água, bem como comparar o perfil molecular de isolados recuperados de amostras de esgoto hospitalar e água superficial. Com esse enfoque, o presente estudo avaliou a contribuição de um esgoto hospitalar na disseminação de *Pseudomonas aeruginosa* para o ambiente aquático; para isso, isolados de esgoto hospitalar e água superficial foram caracterizados quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e similaridade genética pela ERIC-PCR.

Material e Métodos

Ambiente de estudo

As amostras foram coletadas nos meses de Outubro de 2005 (Coleta 1) e Março de 2007 (Coleta 2) de esgotos de dois hospitais no Rio Grande do Sul, Brasil. No mesmo período, foram coletadas amostras de água superficial dos corpos d'água que recebem esses esgotos hospitalares. O Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), localizado em Passo Fundo, RS, possui 635 leitos e realiza cerca de 28.000 internações ao ano. O Hospital Divina Providência (HDP), localizado em Porto Alegre, RS possui 150 leitos e realiza cerca de 9.000 internações ao ano.

Amostragem de esgoto hospitalar e água superficial

As amostras de água superficial foram coletadas no Rio Passo Fundo, em um ponto à jusante e outro à montante do descarte do esgoto hospitalar (Pontos B e C, respectivamente). O esgoto do HSVP apresenta três pontos de descarte de esgoto na rede canalizada da cidade de Passo Fundo e as amostras foram coletadas nestes pontos, designados Pontos D, E e F. No HDP, as amostras foram coletadas em dois pontos de descarte de esgoto (Pontos G e H). As amostras de água superficial foram coletadas em um ponto à jusante e outro à montante do Arroio Cascata (Pontos J e K, respectivamente) e em um ponto do Riacho da Gruta (Ponto I), ambos localizados próximo ao HDP. Para facilitar a análise, os Pontos B a F (HSVP e Rio Passo Fundo) foram denominados de Ambiente I e os Pontos G a K (HDP, Arroio Cascata e Riacho da Gruta) de Ambiente II.

Isolamento e identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Amostras de 1 L de esgoto e de água superficial foram coletadas em garrafas estéreis e mantidas refrigeradas até o processamento, por um período máximo de 8 horas. Alíquotas de 100 mL das amostras de esgoto e água superficial foram concentradas por filtração em membranas de ésteres mistos de 0,45 µm de porosidade. As membranas foram transferidas para o caldo seletivo asparagina e incubadas a 37°C por 24-48 horas. A produção de fluorescência verde sob luz ultravioleta no caldo indicou um teste presuntivo positivo para *Pseudomonas aeruginosa*. Alíquotas de 1 mL do caldo asparagina foram transferidas para caldo acetamida e incubadas a 37°C por 24 horas. O desenvolvimento de coloração rosa indicou presença de *P. aeruginosa*. Alíquotas de 100 µl foram então transferidas para placas com ágar acetamida

para seleção de colônias características. Os isolados foram fenotipicamente identificados pela coloração de Gram e por provas bioquímicas clássicas: citocromo-oxidase, redução de nitrato, oxidação e fermentação da glicose e lactose, motilidade, produção de H₂S e produção de pioverdina. A identificação fenotípica foi confirmada pela amplificação de um fragmento do 16S rDNA (Spilker et al., 2004).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* foi determinado pela técnica de disco-difusão de acordo com as normas do CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, 2007). Os seguintes antibióticos foram testados: amicacina (30µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg), ceftazidima (30µg), piperacilina-tazobactam (100µg/10µg), ticarcilina-ácido clavulânico (75µg/10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), cefepime (30µg), aztreonam (30µg) e polimixina B (300µg). Isolados resistentes a pelo menos quatro classes distintas de antimicrobianos foram considerados multirresistentes. A cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle de qualidade dos testes de sensibilidade.

Genotipificação

A similaridade genética entre os isolados foi avaliada pela Reação da Polimerase em Cadeia das seqüências Intergênicas Repetidas de Enterobactérias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction - ERIC-PCR*). O DNA genômico foi preparado pela técnica descrita por Agarwal et al. (2002). A região adjacente ao ERIC foi amplificada com os *primers* ERIC1 e ERIC2 (Versalovic et al, 1991). A mistura da PCR foi

realizada em um volume final de 30 µl, consistindo de 8 µl de DNA genômico, 5,5 mM de MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 400 ng de cada primer e 2 U de Taq DNA-polimerase (Invitrogen). A PCR foi realizada com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e, uma extensão final a 72°C por 15 minutos. Os amplicons resultantes foram visualizados em gel de agarose 2% acrescido do polímero Synergel (BioAmerica) em Tampão Tris-Borato (89mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA, pH 8,3) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

Análise dos dados

Os padrões da ERIC-PCR foram convertidos em uma matriz binária (1, presença; 0, ausência) e analisados com o programa SPSS (versão 11.5). A análise de agrupamentos foi realizada utilizando o método UPGMA (*unweighted pair-group method with average linkages*) dos coeficientes de Jaccard. O índice diversidade de Shannon-Weaver (H') foi calculado para amostras de esgoto e de água superficial dos Ambientes I e II, utilizando a fórmula $H=C/N (N \times \log N - \sum n_i \times \log n_i)$, onde n_i corresponde ao número de isolados com o mesmo perfil ERIC-PCR, N corresponde ao número total de isolados e C uma constante com valor igual a 2.3 (Borges et al., 2003).

Resultados

Foram recuperados 198 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do Ambiente I, sendo 53 do Ponto B, 18 do Ponto C, 42 do Ponto D, 44 do Ponto E e 41 do Ponto F e, 198 isolados do Ambiente II, sendo 56 do Ponto G, 50 do Ponto H, 44 do Ponto I, 31 do Ponto J e 17 do Ponto K, totalizando 396

isolados. Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram 29 perfis de resistência diferentes, sendo que alguns perfis foram mais freqüentes e outros permitiram a diferenciação entre pontos de coleta (Tabela 1). Observou-se uma tendência de índices de sensibilidade mais elevados entre isolados provenientes de amostras de água superficial, independente do local de coleta (Pontos B, C, I, J, K), quando comparados a isolados de esgoto hospitalar (Pontos D, E, F, G, H). Os perfis de resistência 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 20 e 21 foram encontrados exclusivamente em isolados do Ambiente I e os perfis de resistência 23, 24, 26 e 27 em isolados do Ambiente II. Os perfis de resistência 1 e 2 foram os únicos comuns aos dois ambientes estudados (Tabela 1). Todos os isolados apresentaram sensibilidade à polimixina B. O fenótipo de multirresistência foi encontrado somente em isolados de esgoto hospitalar, sendo observado em 85,4% dos isolados do Ponto F e em 12,0% dos isolados do Ponto H (Tabela 1).

Os isolados de *P. aeruginosa* submetidos à genotipificação pela ERIC-PCR foram selecionados com base no seu perfil de resistência, dando ênfase a isolados com susceptibilidade reduzida a pelos menos três classes de antimicrobianos diferentes. Cento e dois isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do Ambiente I e 21 isolados do Ambiente II foram analisados. Os padrões de ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* do Ambiente I apresentaram alta diversidade, com 3 a 12 amplicons variando de 201 até 2807 pb. Os padrões de ERIC-PCR dos isolados do Ambiente II apresentaram de 3 a 9 amplicons, variando de 201 a 1064 pb. No Ambiente I, os 102 isolados formaram seis grupos constituídos por mais de três isolados, denominados Cluster 1 a Cluster

6, em um nível de similaridade de 70%. Os grupos formados com 70% de similaridade foram formados por isolados provenientes do mesmo ponto de coleta e da mesma origem, ou seja, por isolados de esgoto hospitalar ou de água superficial, sempre provenientes do mesmo ponto de coleta. A exceção foi o Cluster 3, formado por dois sub-grupos, 3a e 3b, em 80% de similaridade. O sub-grupo 3a foi constituído por isolados de água superficial e o sub-grupo 3b por isolados de esgoto hospitalar. O perfil de resistência dos isolados mostrou ser o mesmo dentro dos grupamentos formados, com exceção do Cluster 5, formado pelos sub-grupos 5a e 5b, que apresentou isolados com os seguintes perfis de resistência: 4, 7, 8, 10, 13 e 14 no sub-grupo 5b (Figura 1). No Ambiente II, 21 isolados foram divididos em cinco grupos principais em um nível de similaridade de 70% (Cluster 1 a Cluster 5), seguindo a origem da amostra. Isolados provenientes de amostras de esgoto hospitalar somente agruparam com isolados de água superficial em um nível de similaridade inferior a 35%. Assim como no Ambiente I, os grupos foram formados por isolados com perfil de resistência idêntico ou muito semelhante (Figura 2). Todos os grupos foram formados por isolados coletados numa mesma ocasião, com exceção dos Clusters 1 e 3 do Ambiente I e, dos Clusters 3 e 5 do Ambiente II (Figuras 1 e 2).

O índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') dos perfis de ERIC-PCR foi maior entre os isolados de *P. aeruginosa* do Ambiente I, tanto para amostras de esgoto hospitalar quanto de água superficial. Os índices de diversidade (H') dos Ambientes I e II foram de 3,88 e 2,66, respectivamente. Os índices de diversidade para as amostras de água superficial dos Ambientes

I e II foram de 2,90 e 2,14, respectivamente e, para as amostras de esgoto hospitalar foram de 3,43 e 2,16 para os Ambientes I e II, respectivamente.

Discussão

Os resultados mostraram diferenças no perfil de resistência e na frequência de multirresistência entre isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de esgoto hospitalar e água superficial, sendo a ocorrência de resistência e multirresistência muito maior em isolados de esgoto hospitalar. A avaliação dos perfis de resistência permitiu identificar padrões específicos de um ambiente ou ponto de coleta. Nas amostras de esgoto hospitalar do Ambiente I, observou-se resistência a diferentes classes de antimicrobianos, mas, principalmente a β -lactâmicos. Esse dado é preocupante, pois tais microrganismos poderiam contribuir, em nível ambiental, para a disseminação de genes de resistência e estabelecimento de focos de contaminação, bem como influenciar o uso de drogas β -lactâmicas no controle de doenças infecciosas. O descarte de esgoto hospitalar não tratado contendo bactérias resistentes a antimicrobianos é um problema de saúde pública, uma vez que oferece risco à população. Entretanto, os dados de susceptibilidade deste estudo mostram que os isolados resistentes encontrados no esgoto hospitalar não estão sendo recuperados nos respectivos corpos d'água, independente de não haver tratamento do esgoto hospitalar.

As diferenças nos perfis de resistência entre amostras de esgoto e água superficial encontradas podem refletir tipos de exposição diferentes. No presente estudo, a resistência à ciprofloxacina foi observada somente em isolados de esgoto hospitalar. Esse fato pode ter ocorrido pela exposição a

altas concentrações de fluoroquinolonas presentes no ambiente hospitalar, as quais podem induzir mutações na DNA girase ou uma hiper-expressão de sistemas de efluxo (Zhang et al., 2001; Nakajima et al., 2002). Além disso, desinfetantes como triclosan e compostos quaternários de amônio, muito utilizados em ambiente hospitalar, são substratos de sistemas de efluxo em *P. aeruginosa*, podendo também induzir sua hiper-expressão (Chuanchuen et al., 2001). O sistema de efluxo MexAB-OprM é expresso constitutivamente em *P. aeruginosa* e contribui para a resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, incluindo fluoroquinolonas, β -lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim e sulfonamidas. Resistência a alguns desses antimicrobianos foram também observadas entre os isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram resistência a ciprofloxacina. Além dos antimicrobianos de importância médica, o sistema MexAB-OprM também exporta corantes e detergentes (Poole, 2002). Dados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados por Tuméo et al. (2008) ao avaliarem o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa*, sendo que isolados de esgoto hospitalar apresentaram resistência mediada principalmente pela hiper-expressão de sistemas de efluxo.

A disseminação da resistência bacteriana através do esgoto hospitalar é causa de preocupação, principalmente para espécies hidrofílicas que, como a *P. aeruginosa*, podem fazer do esgoto seu habitat natural. A tipificação por ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* revelou alta diversidade nos dois ambientes estudados, indicando múltiplas origens. Entretanto, o achado de isolados geneticamente relacionados em diferentes pontos de coleta do

Ambiente II (Figura 2, Clusters 3 e 5), implica que uma disseminação clonal destas cepas possa ter ocorrido. O achado de isolados idênticos ou intimamente relacionados no mesmo ponto coleta, porém coletados em diferentes ocasiões, indica que essas cepas estão persistindo no ambiente ou sendo constantemente lançadas por um reservatório como o hospital (Ambiente I, Clusters 1 e 3; Ambiente II, Clusters 3 e 5). Por outro lado, os demais grupos foram formados por isolados do mesmo ponto de coleta, coletados na mesma ocasião, indicando que há uma sucessão (ou modificação) de populações de *P. aeruginosa* ao longo do tempo. Em um estudo realizado por Tuméo et al. (2008), entre isolados clínicos e de esgoto hospitalar de *P. aeruginosa*, nenhum isolado clínico multirresistente foi recuperado no esgoto. Em outro estudo, a relação genética de 573 isolados de *P. aeruginosa* ambientais e clínicos foi examinada através da PFGE e indicou que variantes intimamente relacionadas de um clone principal persistiram em habitats separados espacial e temporalmente (Römling et al., 1994).

Os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') encontrados para amostras de esgoto hospitalar foram superiores aos de amostras de água superficial, nos Ambientes I e II. Provavelmente, o esgoto tenha servido como um ambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias geneticamente mais diversas. De maneira geral, o maior índice de diversidade foi encontrado entre os isolados de *P. aeruginosa* do Ambiente I, o que pode ser evidenciado pelo baixo número de grupos formados no dendrograma e pelo grande número de perfis de ERIC-PCR diferentes encontrados. Embora os índices de diversidade encontrados nas amostras de água superficial sejam menores que os das

amostras de esgoto hospitalar, eles são elevados, indicando que o próprio esgoto hospitalar pode ter contribuído para a diversidade dos isolados de *P. aeruginosa* de água superficial.

Os isolados de *P. aeruginosa* avaliados no presente estudo formaram grupos fenotípicos e genotípicos de acordo com sua origem: esgoto hospitalar e água superficial, indicando que outras fontes de contaminação, que não os esgotos hospitalares estudados, estejam contribuído para a presença dos isolados de *P. aeruginosa* nos corpos d'água. Apesar dos resultados encontrados neste estudo, é consenso geral que a seleção e disseminação de bactérias resistentes no ambiente deve ser evitada, a fim de garantir um tratamento eficaz contra doenças infecciosas e manter o balanço ecológico ambiental favorável a microbiota de bactérias susceptíveis. O uso indiscriminado de antimicrobianos pode romper esse balanço em favor de bactérias resistentes e, o esgoto hospitalar em especial, desempenha um papel crucial na seleção de resistência bacteriana (Guardabassi et al., 1998)

Agradecimentos

Agradecemos às Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIFH) dos hospitais estudados por permitirem a coleta das amostras de esgoto e divulgação dos resultados. Este estudo teve o suporte financeiro da CAPES-PROF.

Referências

Agarwal, G., Kapil, A., Kabra, S.K., Chandra, R., Diwedi, S.N. 2002. Phenotypic & genotypic variants of pseudomonas aeruginosa isolated from children with cystic fibrosis in India. Ind. J. Med. Res 116, 73-81

- Blanc, D.S., Petignat, C., Janin, B., Bille, J., Francioli, P. 1998. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect* 4, 242–247.
- Borges, L. G. A., Dalla Vecchia, V., Corção, G. 2003. Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS. Microbiol. Ecol* 45, 173-180.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R., Schweizer, H.P. 2001. Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects *nfxB* Mutants Overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents. Chemother* 45, 428–432.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Costanzo, S.D., Murby, J., Bates, J. 2004. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 218-223.
- Fuentefria, D.B., Ferreira, A.E., Gräf, T., Corção, G. 2008a. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Ver Soc Bras Med Trop.* 41, 470-473.

- Fuentefria, D.B., Ferreira, A.E., Gräf, T., Corção, G. 2008b. Spread of Metallo- β -lactamases: Screening reveals the presence of a bla_{SPM-1} gene in hospital sewage in southern Brazil. Braz. J. Microbiol in press.
- Gad, G.F., El-Domany, R.A., Zaki, S., Ashour, H.M. 2007. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. J. Antimicrobial. Chemother.60, 1010-1017.
- Guardabassi, L., Petersen, A., Olsen, J., Dalsgaard, A. 1998. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. Appl. Environ. Microbiol 61, 3499-3502.
- Iversen,A., Kühn, I., Franklin, A., Möllby, R. 2002. High Prevalence of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Swedish Sewage. Appl. Environ. Microbiol 68, 2838-2842.
- Livrelli, V., De Champs, C., Di Martino, P., Darfeuille-Michaud, A., Forestier, C., Joly, B. 1996. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. J. Clin. Microbiol 34: 1963–1969.
- Meirelles-Pereira, F., Pereira, A.M.S., Silva, M.C.G., Gonçalves, V.D., Brum, P.R., Castro, E.A.R., Pereira, A.A., Esteves, F.A., Pereira, J.A.A. 2002. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to humans infections. Braz. J. Microbiol 33, 287-293.
- Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., Nakae, T. 2002. High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Due to Interplay of

the MexAB-OprM Efflux Pump and the DNA Gyrase Mutation. *Microbiol. Immunol* 6, 391-395.

Poole, K. 2002. Outer Membranes and Efflux: The Path to Multidrug Resistance in Gram- Negative Bacteria. *Curr. Pharm. Biotech.* 3, 77-98.

Prado, T., Pereira, W.C., Silva, D.M. Seki, L.M., Carvalho, A.P.D`A. , Asensi, M.D. 2008. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge os a hospital sewage tretament plant. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 136-141.

Reinthalder, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F., Marth, E. 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res* 37, 1685-1690.

Römling, U., Wingender, J., Muller, H., Tummler, B. 1994. A Major *Pseudomonas aeruginosa* Clone Common to Patients and Aquatic Habitats. *Appl. Environ. Microbiol* 60, 1734-1738.

Spilker, T., Coenye, T., Vandame, P., Lipuma, J.J. 2004. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol* 42, 2074-2079.

Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A., Schlüter, A. 2003. Occurence of integron associated resistance gene cassetes located on antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater tratment plant. *FEMS. Microbiol. Ecol* 45, 239-252.

Tuméo, E., Gbaguidi-Haore, H., Patry, I., Bertrand, X., Thouverez, M., Talon, D. 2008. Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from

hospitalised patients recovered in the hospital effluents? Int. J. Hyg. Environ. Health 211, 200–204.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 19, 6823-6831.

Zhang, L., Li, X., Poole, P. 2001. Fluoroquinolone susceptibilities of efflux mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. J. Antimicrob. Chemother 48, 549-552.

Tabela 1 – Freqüência dos principais perfis de resistência dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* dos pontos de Coleta B e C (água superficial) e pontos D, E e F (esgoto hospitalar) do Ambiente I e dos pontos de Coleta G e H (esgoto hospitalar) e I, J e K (água superficial) do Ambiente II.

Perfil	Perfil de Resistência	Frequência (%)									
		Ambiente I					Ambiente II				
		B n=53	C n=18	D n=42	E n=44	F n=41	G n=56	H n=50	I n=44	J n=31	K n=17
1	S	79,2	72,2	88,1	68,2	2,2	69,6	84,0	97,7	96,7	88,2
2	IMP	20,8	5,5	7,1	27,3	-	-	2,0	2,3	-	5,9
3	IMP, MER	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-
4	GEN, CIP, AMI, PPT, TIC, IMP, CPM, ATM	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-
6	GEN, CIP, CAZ, TIC, IMP, CPM, ATM	-	-	-	-	4,8	-	-	-	-	-
7	GEN, CIP, CAZ, TIC, IMP, CPM	-	-	-	-	9,7	-	-	-	-	-
8	GEN, CIP, CAZ, TIC, IMP	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-
10	GEN, CIP, IMP, CPM	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-
11	GEN, CIP, CAZ, TIC, IMP, CPM	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-
12	GEN, CIP, CAZ, TIC, CPM	-	-	-	-	4,8	-	-	-	-	-
13	GEN, CIP, AMI, TIC	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-
14	GEN, CIP, AMI, TIC, IMP, MER, CPM	-	-	-	-	44,0	-	-	-	-	-
17	GEN, CIP, AMI, IMP, MER	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-
18	PPT	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-
20	MER	-	22,2	-	-	-	-	-	-	-	-
21	TIC, IMP, MER, CPM, ATM	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-	-
23	GEN, CIP, AMI, CAZ, TIC, IMP, MER, CPM	-	-	-	-	-	-	6,0	-	-	-
24	GEN, CIP, AMI, CAZ, PPT, TIC, IMP, MER, CPM	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-
26	GEN	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-
27	GEN, TIC	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	-
Isolados Multirresistentes		-	-	4,8	-	85,4	-	12,0	-	-	-

S, Sensível a todos os antimicrobianos testados; GEN, gentamicina; IMP, imipenem; MER, meropenem; CIP, ciprofloxacina; CAZ, ceftazidima; TIC, ticarcilina/clavulanato; CPM, cefepime; AMI, ampicilina; PPT, piperacilina/tazobactam; ATM, aztreonam.

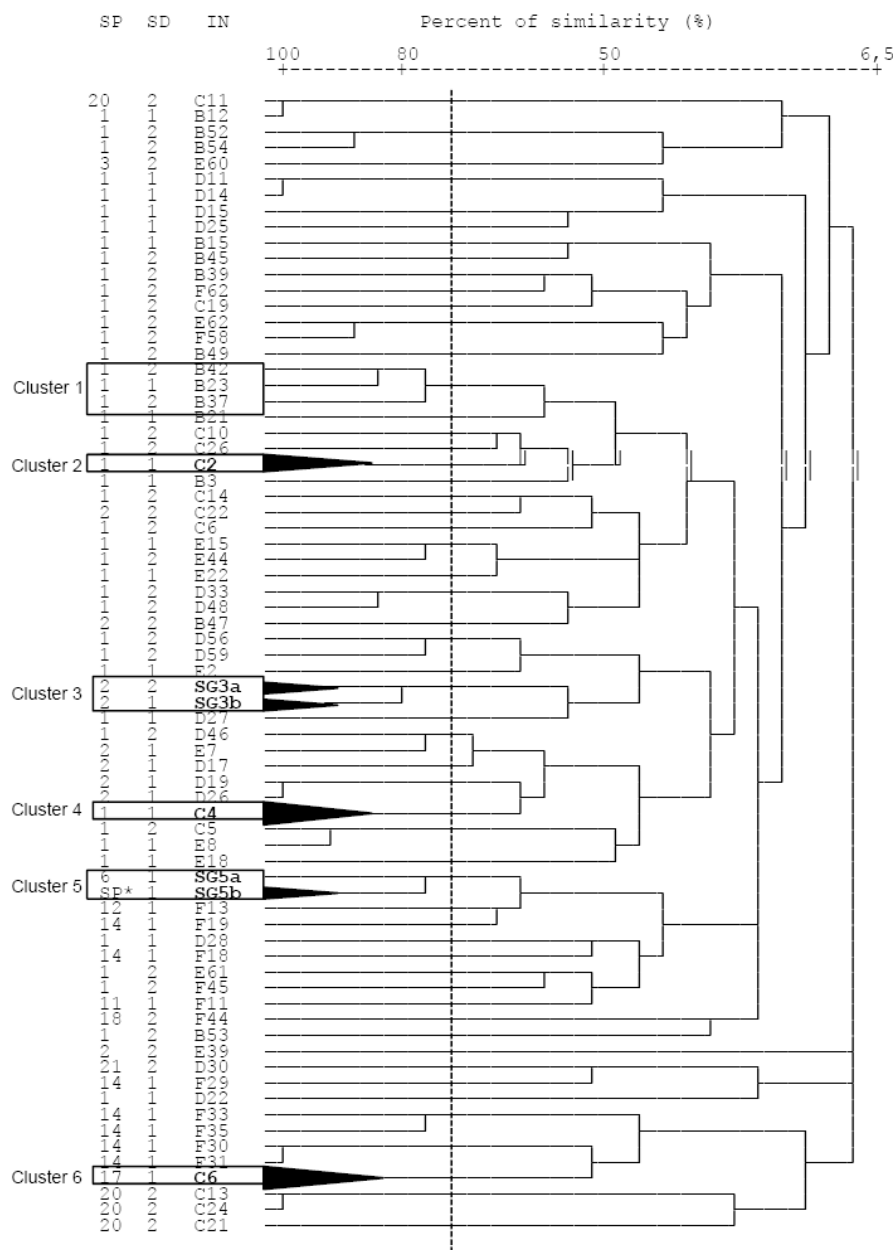


Figura 1 – Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar e água superficial do Ambiente I.

SP, Susceptibility Profile; SD, Sample Collection: 1, Coleta 1; 2, Coleta 2; IN, Isolate Number. A linha vertical indica 70% de similaridade. As letras indicam o ponto de coleta: B e C, água superficial; D, E e F, esgoto hospitalar. C2, Cluster 2; C4, Cluster 4; C6, Cluster 6. Cluster 2 formado pelos isolados D4, D6 e D8; Cluster 3 formado por 2 Sub-grupos: Sub-grupo 3a (SG3a), constituído pelos isolados B47, B36, B50, B35, B31, B33 e B56 e Sub-grupo 3b (SB3b), constituído pelos isolados E13, E14, E25, E26, E27, E28, E29 e E31. Cluster 4 formado pelos isolados E1, E4 e E5. Cluster 5 dividido em dois sub-grupos: 5a (SG5a) constituído pelo isolado F3 e 5b (SG5b) constituído pelos isolados F1, F5, F8, F9, F10, F12, F14, F15, F23 e F24, com os seguintes perfis de susceptibilidade (SP)* 4, 8, 7, 7, 7, 12, 13, 14, 14, respectivamente. Cluster 6 formado pelos isolados F21, F25, F26, F27, F28.

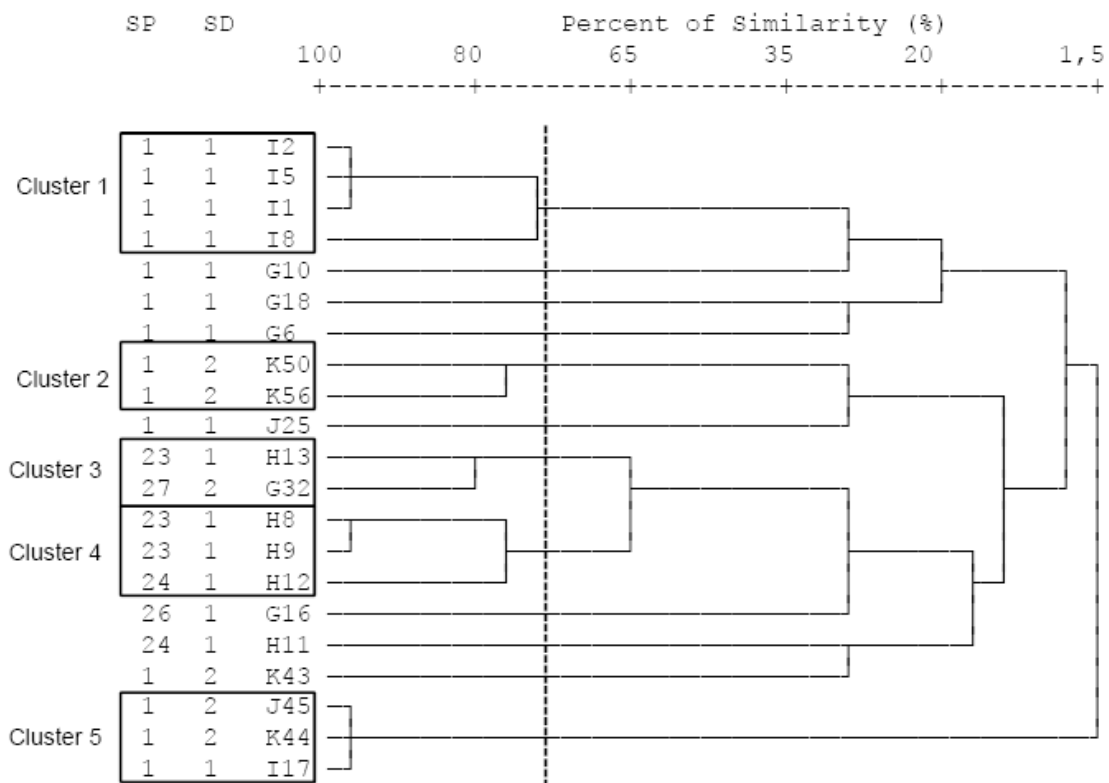


Figura 2 - Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar e água superficial do Ambiente II. SP, Susceptibility Profile; SD, Sample Collection: 1, Coleta 1; 2, Coleta 2; IN, Isolate Number. A linha vertical indica 70% de similaridade. As letras indicam o ponto de coleta: B e C, água superficial; D, E e F, esgoto hospitalar.

Artigo 4: Similaridade genética e perfil de susceptibilidade entre *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de diferentes esgotos hospitalares no Brasil

Artigo a ser submetido para publicação na revista “Journal of Applied Microbiology”.

**Similarity and susceptibility profile among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from
different hospital sewages in Brazil**

**Similaridade genética e perfil de susceptibilidade entre *Pseudomonas aeruginosa*
isoladas de diferentes esgotos hospitalares no Brasil**

Daiane Bopp Fuentesfria¹, Alessandra Einsfeld Ferreira¹, Gertrudes Corção²

¹Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA) –
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Rodapé: *P. aeruginosa* from hospital sewage

Correspondência para: Dr. Gertrudes Corção, Departamento de Microbiologia, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500. Cidade Baixa.
Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil. Tel/Fax: +55-51-3308-4111; E-mail:
corcao@ufrgs.br

RESUMO

Objetivos: A disseminação de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos através do esgoto hospitalar representa um sério risco de saúde pública, pois esta espécie é bem adaptada e capaz de sobreviver e multiplicar-se neste ambiente. Os objetivos deste estudo foram detectar a presença de isolados de *P. aeruginosa* em amostras de esgoto hospitalar em Porto Alegre, RS, Brasil, determinar seu perfil de resistência aos antimicrobianos e avaliar a similaridade genética entre os isolados.

Métodos e Resultados: Foram identificados 218 isolados de *P. aeruginosa* através de provas bioquímicas clássicas e amplificação de um fragmento do 16S rDNA. O perfil de susceptibilidade, avaliado por disco-difusão, mostrou a presença de isolados multirresistentes nas amostras de esgoto hospitalar, embora mais de 70% dos isolados tenham apresentado susceptibilidade a todos antimicrobianos testados. A genotipificação através da ERIC-PCR mostrou alta diversidade e nenhuma relação clonal entre isolados de diferentes esgotos hospitalares.

Conclusões: Embora a maioria dos isolados de esgoto hospitalar tenha apresentado susceptibilidade a todos antimicrobianos testados, isolados multirresistentes foram detectados, não excluindo a possibilidade de disseminação ambiental de resistência bacteriana através do esgoto hospitalar.

Significado e Impacto do Estudo: A presença de bactérias resistentes no esgoto hospitalar deve ser vista como um risco de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde muitas vezes os esgotos são lançados na rede municipal e estes em corpos d'água, sem tratamento prévio.

Palavras-chave: esgoto hospitalar, *Pseudomonas aeruginosa*, ERIC-PCR, resistência bacteriana, genotipificação, Brasil.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um problema constante em todo o mundo gerado principalmente pela pressão seletiva devido ao uso massivo de antimicrobianos. Muitas bactérias resistentes e diferentes genes de resistência têm sido detectados em amostras de esgoto hospitalar (Prado *et al.* 2008; Fuentefria *et al.* 2008). O ambiente hospitalar é um ambiente fortemente seletivo que leva a um aumento na frequência de bactérias resistentes (Meirelles-Pereira *et al.* 2002). A ausência de tratamento ou mesmo o descarte do esgoto hospitalar em local inadequado, podem levar a contaminação do solo e águas e permitir a disseminação de microrganismos e elementos genéticos móveis, como plasmídeos, ampliando ainda mais o problema e contribuindo para a maior incidência de bactérias multirresistentes no ambiente (Prado *et al.* 2008).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista, associado à altas taxas de morbidade e mortalidade e causa freqüente de infecções respiratórias, urinárias e de sítio cirúrgico, principalmente em pacientes de áreas de tratamento intensivo (Gaynes and Edwards 2005). Diversos estudos reportam o aumento nos índices de resistência em *P. aeruginosa* a vários antimicrobianos, mas principalmente a fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenêmicos (Jones *et al.* 2004), além de expressar resistência intrínseca a muitos antimicrobianos (Hocquet *et al.* 2003). *P. aeruginosa* é um microrganismo com características ubiqüitárias, capaz de persistir em diversos ambientes por sua capacidade de utilizar diferentes compostos orgânicos como fonte de energia e de sobreviver por longos períodos em ambientes úmidos (Tuméo *et al.* 2008). No ambiente hospitalar, os fluidos biológicos de pacientes colonizados ou infectados por *P. aeruginosa* são descartados na rede de esgoto hospitalar, o qual pode, por sua

vez, contaminar o ambiente. Nesse sentido, a disseminação de cepas resistentes a antimicrobianos pode representar um potencial risco de saúde pública, uma vez que a *P. aeruginosa* é uma espécie bem adaptada e capaz de sobreviver e multiplicar-se nesse ambiente. A caracterização e tipificação acurada de isolados ambientais de *P. aeruginosa* é necessária para fornecer dados sobre a disseminação deste patógeno no esgoto hospitalar. Diversos métodos, como análise de macrorestrição em eletroforese de campo pulsado (PFGE), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (AP-PCR) e ribotipificação estão disponíveis para a genotipificação de *P. aeruginosa* (Renders *et al.* 1996). Entretanto, estudos da reação da polimerase em cadeia (PCR) das seqüências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC), dispersas no genoma de procariotos, revelam padrões altamente específicos dentro de uma mesma espécie bacteriana (Zatkovic *et al.* 2000). Neste estudo, a similaridade genética entre isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar foi avaliada pela ERIC-PCR. Os objetivos desta análise foram detectar a presença de isolados de *P. aeruginosa* em amostras de esgoto de diferentes hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil, determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos e avaliar a similaridade genética entre os isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Coleta

As amostras de esgoto hospitalar foram coletadas em três grandes hospitais localizados em Porto Alegre, RS, Brasil. O Hospital I (HI) possui 882 leitos em uma área de 43.030 m², conta com mais de 4 mil funcionários e realiza cerca de 29 mil internações ao ano. O Hospital II (HII) possui 749 leitos, contando com 3.983 funcionários em uma área de 125.256, 38 m² e realiza cerca de 27 mil internações ao ano. O Hospital III (HIII) possui 544 leitos em uma área construída de 55.000 m², possui cerca de 2.300 funcionários e

realiza 28 mil interações ao ano. As amostras de esgoto foram coletadas no final da rede hospitalar, antes de serem lançadas na rede de esgoto municipal. As coletas foram realizadas nos meses de Novembro de 2006 e Março de 2007.

Isolamento e identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Amostras de 1L de esgoto hospitalar foram coletadas em garrafas estéreis e mantidas sob refrigeração até o processamento. Alíquotas de 100 mL foram filtradas através de membranas de ésteres mistos de 0,45 µm de porosidade. As membranas foram transferidas para o caldo seletivo asparagina e incubadas a 37 °C por 24-48 horas. O aparecimento de fluorescência verde sob luz ultravioleta indicou um resultado presuntivo positivo para *P. aeruginosa*. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para o caldo acetamida e incubadas a 37 °C por 24 horas. O desenvolvimento de coloração rosa no meio indicou a presença de *P. aeruginosa*. Alíquotas de 100 µL foram inoculadas em agar acetamida para seleção de colônias características. Os isolados foram identificados através de provas bioquímicas e morfológicas clássicas, como coloração de Gram, produção de citocromo-oxidase, oxidação e fermentação da glicose e lactose, motilidade, redução de nitrato, produção de H₂S, crescimento em caldo simples a 42 °C e produção de pioverdina. A identificação fenotípica foi confirmada pela amplificação de um fragmento do 16S rDNA (Spilker *et al.* 2004).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* foi avaliado pela técnica de disco-difusão de acordo com as normas do CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2007). Os seguintes antibióticos foram testados: amicacina (30µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg), ceftazidima (30µg), piperacilina-tazobactam (100µg/10µg), ticarcilina-ácido clavulânico (75µg/ 10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), cefepime (30µg), aztreonam (30µg) e polimixina B (300µg). Isolados resistentes a pelo menos quatro classes distintas de antimicrobianos foram

considerados multirresistentes. A cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle de qualidade dos testes de susceptibilidade.

Análise por ERIC-PCR

O DNA genômico dos isolados foi extraído pela técnica descrita por Agarwal *et al.* (2002). A região ERIC foi amplificada com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1 e ERIC2 (Versalovic *et al.* 1991). A reação da PCR foi realizada num volume final de 30 µl, consistindo de 8 µl de DNA genômico, 5,5 mM de MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 400 ng de cada primer e 2 U de Taq DNA-polimerase (Invitrogen). A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 7 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 15 minutos. Os amplicons resultantes foram visualizados em gel de agarose 2% adicionado do polímero Synergel (BioAmerica) (0,70 % agarose, 0,65% Sinergel) em Tampão Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA, pH 8.3) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

Análise dos dados

Os padrões da ERIC-PCR foram convertidos em uma matriz binária (1, presença; 0, ausência) e analisados com o programa SPSS (versão 11.5). A análise de agrupamento foi realizada pela UPGMA (*unweighted pair-group method with average linkages*) dos coeficientes de Jaccard. Isolados com perfil idêntico foram considerados com 100% de similaridade. O índice diversidade de Shannon-Weaver (H') foi calculado para amostras de esgoto hospitalar dos três hospitais estudados, utilizando a fórmula $H=C/N (N \times \log N - \sum n_i \times \log n_i)$, onde n_i corresponde ao número de isolados com o mesmo perfil ERIC-PCR, N corresponde ao número total de isolados e C uma constante com valor igual a 2.3 (Borges *et al.* 2003).

RESULTADOS

Foram recuperados 218 isolados de *P. aeruginosa* dos esgotos do HI (n=89), do HII (n=60) e do HIII (n=69). Ao todo, 70,2 % dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar apresentaram susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados. Este índice foi mais elevado entre os isolados do HIII, com 78,3 %, seguido do HII e HI com 66,6 % e 66,0 %, respectivamente. Os isolados de *P. aeruginosa* do HI apresentaram os maiores índices de resistência, com susceptibilidade reduzida principalmente a gentamicina, amicacina, ciprofloxacina, ceftazidima, cefepime, meropenem e imipenem. Em contrapartida, os isolados do HIII mostraram os menores índices de resistência, com susceptibilidade reduzida principalmente a amicacina, gentamicina e cefepime. Os isolados do HII apresentaram susceptibilidade reduzida principalmente a amicacina, meropenem e aztreonam. Não foi observada resistência a polimixina B entre os isolados deste estudo (Tabela 1). O fenótipo de multirresistência foi observado em 32,6 % (n=29) dos isolados do HI, 10,0 % (n=7) dos isolados do HIII e 5,0 % (n=3) dos isolados do HII. Ao todo, os isolados apresentaram 25 perfis de resistência diferentes. Os perfis de resistência que ocorreram com maior frequência são demonstrados na Tabela 2. Os Perfis 23, 24, 29 e 30 foram observados somente nos isolados do HI e foram aqueles com susceptibilidade reduzida ao maior número de antimicrobianos simultaneamente. Com exceção dos Perfis 1, 32 e 37, os demais perfis foram encontrados exclusivamente em isolados provenientes do mesmo esgoto hospitalar (Tabela 2).

Para a análise de similaridade genética através da ERIC-PCR, os isolados foram selecionados de maneira a representar os principais perfis de resistência encontrados. Ao todo, 84 (n=218) isolados foram genotipificados pela ERIC-PCR, sendo 34 do HI,

18 do HII e 32 do HIII. Os perfis de ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* apresentaram de 3 a 9 amplicons, com tamanhos variando de 200 a 2800 pb. A análise de similaridade genética mostrou alta diversidade entre os isolados de *P. aeruginosa* para os diferentes esgotos analisados, com índices de diversidade (H') de 3,30; 2,42 e 3,18 para os esgotos do HI, HII e HIII, respectivamente. Em um nível de 70% de similaridade os isolados formaram 16 grupos pequenos, constituídos por 2 a 4 isolados (Figura 1). Os grupos foram formados por isolados provenientes do mesmo esgoto hospitalar, com exceção do Cluster 7 (C7), formado por um isolado do HII e um do HIII, agrupados em um nível de 80% de similaridade. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de esgotos de diferentes hospitais. Os perfis de resistência 29 e 30 foram encontrados nos isolados dos Clusters 1 e 10 (C1 e C10), ambos formados entre isolados do HI e agrupados entre si em 100% de similaridade. Os perfis de resistência dos isolados não agruparam entre si, com exceção de alguns grupos constituídos somente por isolados com Perfil 1 (Figura 1).

DISCUSSÃO

O significativo aumento da ocorrência de cepas resistentes e multirresistentes no ambiente hospitalar alcançou um cenário muito preocupante, pois em muitos países em desenvolvimento como o Brasil, um número razoável de cepas é resistente a grande maioria dos antimicrobianos comercialmente disponíveis (Andrade *et al.* 2003; Cipriano *et al.* 2007). Em muitos locais, os devidos cuidados com o descarte do esgoto hospitalar não são observados e este é frequentemente lançado em corpos d'água, sem tratamento prévio. No presente estudo, mais de 70% dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar mostraram susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados, entretanto, isolados resistentes e até multirresistentes foram detectados nas diferentes

amostras avaliadas. Comparando os níveis de resistência a antimicrobianos encontrados nos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar do presente estudo com isolados clínicos de *P. aeruginosa* de hospitais de Porto Alegre, onde 63,7% dos isolados *P. aeruginosa* apresentaram susceptibilidade somente a polimixina B e aztreonam ou somente a polimixina B (Gaspareto *et al.* 2007), os isolados de esgoto hospitalar deste estudo mostram-se muito mais susceptíveis. Os índices relativamente baixos de multirresistência e os perfis de resistência encontrados, sobretudo no esgoto do HII e HIII, sugerem que estes microrganismos não são intrinsecamente resistentes a nenhuma classe particular de antimicrobiano, mas que provavelmente possuem uma predisposição para desenvolver resistência sob condições de pressão seletiva. No esgoto do HI foram encontrados os maiores índices de resistência, com taxas de mais de 30% de resistência a carbapenêmicos, cefalosporinas de terceira e quarta gerações e quinolonas e, além disso, resistência a um maior número de antimicrobianos simultaneamente. Os perfis de resistência encontrados entre esses isolados incluem a maioria dos antimicrobianos utilizados hoje em dia para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* em humanos, o que nos leva a crer que a origem dos isolados resistentes encontrados no esgoto hospitalar seja o próprio ambiente hospitalar.

As seqüências ERIC têm sido utilizadas para caracterização de várias cepas bacterianas por serem altamente conservadas entre as bactérias (Versalovic *et al.* 1991). Os perfis de ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar do presente estudo revelaram alta diversidade, mesmo entre isolados de um mesmo esgoto hospitalar, o que refletiu o baixo número de grupos formados em um nível de similaridade de 70%. Esta alta diversidade sugere que populações geneticamente distintas estão estabelecidas nos esgotos dos três hospitais estudados e que

provavelmente diferentes populações estejam circulando nos respectivos hospitais. A similaridade encontrada entre isolados de *P. aeruginosa* provenientes de esgotos de diferentes hospitais foi baixa, resultado esperado, uma vez que não há ligação física entre esses hospitais. O índice de diversidade de *Shannon-Weaver* (H') foi maior entre os isolados do HI, o que pode ser evidenciado no dendrograma pelo maior número de isolados não agrupados e, também corresponde ao maior hospital, com maior taxa de circulação de pessoas e internações ao ano. Além disso, os índices de diversidade (H') observados nos diferentes esgotos estudados embasam a teoria de que não há disseminação clonal nos esgotos hospitalares e sim, múltipla origem dos isolados de *P. aeruginosa*.

As conseqüências ecológicas associadas a disseminação de bactérias resistentes no ambiente tem sido extensivamente investigadas (Kümmerer 2004). É evidente que a contaminação ambiental com antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência afetam a biodiversidade dos ecossistemas naturais. Os antibióticos podem reduzir os níveis de diversidade microbiana pela supressão de microrganismos susceptíveis. Bactérias resistentes e elementos genéticos podem encontrar condições favoráveis para tornarem-se predominantes nos ambientes contaminados, alterando, assim, a composição original das comunidades microbianas (Guardabassi *et al.* 1998). Embora mais de 70% dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar do presente estudo tenham apresentado susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados, o esgoto hospitalar deve ser considerado como uma porta de entrada da resistência bacteriana para o ambiente. Os dados sugerem que bactérias resistentes e elementos genéticos que carregam resistência a antimicrobianos associada ao ambiente hospitalar contaminam

diariamente o ambiente através do esgoto hospitalar, isso representa um sério problema de saúde pública que necessita uma futura avaliação e controle.

Agradecimentos

Agradecemos aos hospitais estudados por permitirem a coleta das amostras de esgoto e divulgação dos resultados. Também agradecemos a CAPES-PROF pelo suporte financeiro.

Referências

Agarwal, G., Kapil, A., Kabra, S.K., Chandra, R., Diwedi, S.N. (2002) Phenotypic & genotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis in India. *Indian Journal of Medical Research* **116**, 73-81.

Andrade, S.S., Jones, R.N., Gales, A.C., Sader, H.S. (2003) Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 140–141.

Borges, L.G.A., Dalla Vecchia, V., Corção, G. (2003) Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS Microbiology Ecology* **45**, 173-180.

Centers for Disease Control and Prevention. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Cont* (2004) **32**:470–85.

Cipriano, R., Vieira, V.V., Fonseca, E.L., Rangel, K., Freitas, F.S., Vicente, A.C.P (2007) Coexistence of Epidemic Colistin-Only-Sensitive Clones of *Pseudomonas aeruginosa*, Including the *bla*-SPM Clone, Spread in Hospitals in a Brazilian Amazon City. *Microbial Drug Resistance* **13**, 142-146.

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Fuentefria, D.B., Ferreira, A.E., Gräf, T., Corção, G (2008) *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **41**, 470-473.

Gaspareto, P.B., Martins, A.F., Zavascki, A.P., Barth, A.F. (2007) Occurrence of bla_{SPM1} and bla_{IMP1} genes of metallo-β-lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**,108-109.

Gaynes, R., Edwards, J.R. (2005) National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases* **41**, 848–54.

Guardabassi, L., Petersen, A., Olsen, J., Dalsgaard, A. (1998) Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3499-3502.

Hocquet, D., Bertrand, X., Kohler, T., Talon, D., Plesiat, P. (2003) Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 1887–1894.

Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Karlowsky, J.A., Sahm, D.F., Wenzel, R.P. (2004) Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North American Surveillance study (2000–2002). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **29**, 3-14.

- Kümmerer, K. (2004) Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 311–320.
- Meirelles-Pereira, F., Pereira, A.M.S., Silva, M.C.G., Gonçalves, V.D., Brum, P.R., Castro, E.A.R., Pereira, A.A., Esteves, F.A., Pereira, J.A.A. (2002) Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to humans infections. *Brazilian Journal of Microbiology* **33**, 287-293.
- Prado, T., Pereira, W.C., Silva, D.M., Seki, L.M., Carvalho, A.P.D.A., Asensi, M.D. (2007) Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludges of a hospital sewage treatment plant. *Letters in Applied Microbiology* **46**, 136-141.
- Renders, N., Romling, Y., Verbrugh, H., Van Belkum, A. (1996) Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 3190-3195.
- Spilker, T., Coenye, T., Vandame, P., Lipuma, J.J. (2004) PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 2074-2079.
- Tuméo, E., Gbaguidi-Haore, H., Patry, I., Bertrand, X., Thouverez, M., Talon, D. (2008) Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **211**, 200–204.
- Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19**, 6823-6831.

Zatkovic, B., Molnarova, V., Kmet, V., Javorsky, P., and Pristas, P. (2000) Diversity of DNA sequences among restriction endonucleases producing *Selenomonas ruminantium* isolates detected by enterobacterial repetitive intergenic consensus based polymerase chain reaction (ERICPCR). *Anaerobe* **6**, 299-304.

Zavascki, A.P., Barth, A.L., Gonçalves, A.L.S., Moro, A.L.D., Fernandes, J. F., Martins, A.F., Ramos, F., Goldani, L.Z. (2006) The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**, 387-392.

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade reduzida dos isolados de *P. aeruginosa* de amostras de esgoto dos Hospitais I, II e III (n=218).

Antimicrobianos	Susceptibilidade reduzida (%)		
	HI (n=89)	HII (n=60)	HIII (n=69)
Gentamicina	30 (33,7)	9 (15,0)	13 (18,8)
Ciprofloxacina	29 (32,6)	9 (15,0)	3 (4,3)
Amicacina	31 (34,8)	24 (40,0)	21 (30,4)
Ceftazidima	29 (32,6)	4 (6,7)	2 (2,9)
Piperacilina/tazobactam	16 (18,0)	1 (1,7)	0 (0,0)
Ticarcilina/clavulanato	7 (7,9)	2 (3,3)	9 (13,0)
Imipenem	29 (32,6)	2 (3,3)	5 (7,2)
Meropenem	29 (32,6)	13 (21,7)	3 (4,3)
Cefepime	29 (32,6)	9 (15,0)	13 (18,8)
Polimixina B	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Aztreonam	0 (0,0)	10 (16,7)	1 (1,4)

Tabela 2 – Principais perfis de resistência encontrados entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de esgoto dos Hospitais I, II e III.

Número do Perfil	Perfil de resistência	Número de isolados		
		HI (n=89)	HII (n=60)	HIII (n=69)
1	Sensível a todos antimicrobianos testados	59	40	54
3	Imp, Mer	0	1	0
13	Gen, Cip, Ami, Tic	0	0	1
20	Mer	0	2	0
23	Gen, Cip, Ami, Caz, Tic, Imp, Mer, Cpm	4	0	0
24	Gen, Cip, Ami, Caz, Ppt, Tic, Imp, Mer, Cpm	3	0	0
26	Gen	0	1	0
27	Gen, Tic	0	0	1
29	Gen, Cip, Ami, Caz, Tic, Imp, Mer	9	0	0
30	Gen, Cip, Ami, Caz, Ppt, Imp, Mer, Cpm	13	0	0
32	Gen, Tic, Cpm	0	1	7
33	Atm	0	0	1
35	Gen, Ami, Imp	0	0	1
36	Gen, Imp	0	0	1
37	Ami	0	2	1
39	Ami, Imp	0	1	0
40	Cpm	0	1	0
41	Gen, Cip	0	7	0

HI, Hospital I; HII, Hospital II; HIII, Hospital III. Gen, gentamicina; Cip, ciprofloxacina; Ami, amicacina; Caz, ceftazidima; Ppt, piperacilina/tazobactam; Tic, ticarcilina/clavulanato; Imp, imipenem; Mer, meropenem; Cpm, cefepime; Pol, polimixina B; Atm, aztreonam.

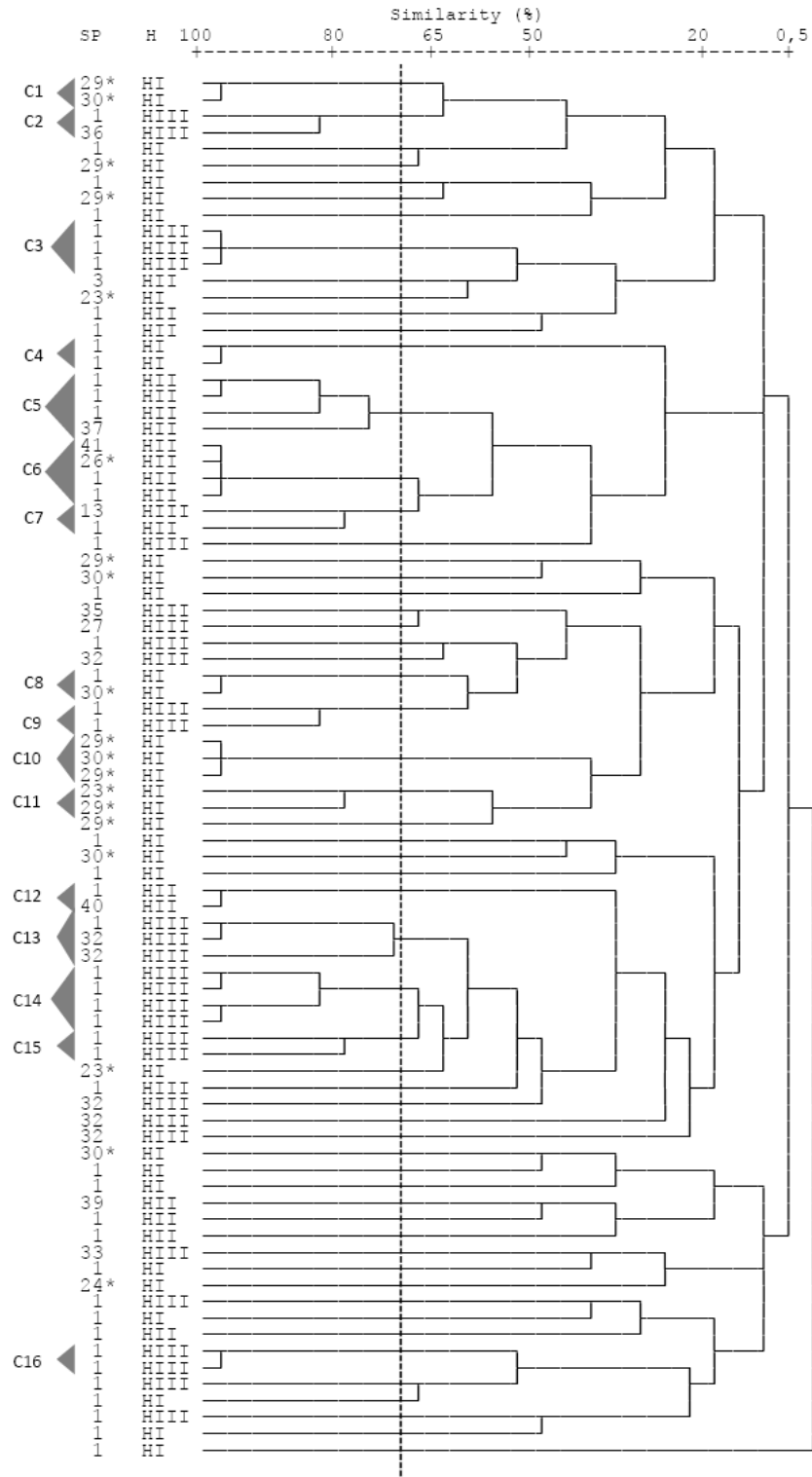


Figura 1 - Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar. SP, Susceptibility Profile Number; H, Hospital; HI, Hospital I; HII, Hospital II; HIII, Hospital III; *, isolado multirresistente. C1 to C16, Clusters 1 to 16. A linha vertical indica 70% de similaridade.

3.5. Artigo 5: Ocorrência do gene *bla*_{SPM-1} em *Pseudomonas aeruginosa* de esgoto hospitalar: perfil de susceptibilidade e tipificação molecular

Artigo a ser submetido para publicação na revista "Current Microbiology".

Ocorrência do gene *bla*_{SPM-1} em *Pseudomonas aeruginosa* de esgoto hospitalar: perfil de susceptibilidade e tipificação molecular

RESUMO

Embora isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com genes de metalo β -lactamases já tenham sido detectados fora do ambiente hospitalar, poucos estudos abordam a relação genética entre eles. O objetivo deste estudo foi detectar genes de MBLs em isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar, avaliar a relação genética entre os isolados portadores dos genes e a diversidade nos genes de MBLs encontrados. Foram analisados 451 isolados de *P. aeruginosa* de esgotos de cinco hospitais localizados em Porto Alegre e Passo Fundo, RS, Brasil. Os genes foram pesquisados por PCR e a susceptibilidade dos isolados avaliada por disco-difusão. A relação genética entre os isolados foi avaliada pela ERIC-PCR e PFGE e a diversidade nos genes avaliada pela DGGE. Ao todo, 5,1% dos isolados de esgoto hospitalar apresentaram o gene *bla*_{SPM-1}. Estes isolados apresentaram fenótipo de multirresistência, com resistência principalmente a imipenem, meropenem, gentamicina, ampicacina, ciprofloxacina, ceftazidima, e cefepime. A tipificação dos isolados pela PFGE e ERIC-PCR revelou alta diversidade, sendo que esta última técnica mostrou maior índice discriminatório ($D=0,99$). A análise de agrupamentos originou grupos formados de acordo com a origem dos isolados, não havendo relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de diferentes esgotos hospitalares, mostrando que populações geneticamente diferentes estão estabelecidas nesses esgotos hospitalares e que, provavelmente, são provenientes dos respectivos ambientes hospitalares. A ocorrência de isolados de *P. aeruginosa* com gene *bla*_{SPM-1} em três dos cinco esgotos hospitalares estudados, chama a atenção para o risco de disseminação de bactérias multirresistentes e genes de resistência a antimicrobianos através do esgoto hospitalar.

INTRODUÇÃO

A resistência através da produção de metalo β -lactamases (MBLs) foi descrita pela primeira vez em 1991 no Japão e é hoje um problema de âmbito mundial (Walsh et al., 2005). No Brasil, o gene prevalente é o *bla*_{SPM-1}, embora outros tipos já tenham sido detectados (Sader

et al., 2004; Gaspareto et al., 2007). O rápido aumento da resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* no Brasil, principalmente pela presença do gene *bla*_{SPM-1}, tem sido atribuído a emergência de cepas resistentes sob pressão seletiva de antimicrobianos e a disseminação de clones epidêmicos no ambiente hospitalar (Gales et al., 2003). Pesquisa de cepas de *P. aeruginosa* produtoras de MBLs têm sido focadas principalmente em isolados clínicos. Entretanto, a presença de MBLs já foi descrita fora do ambiente hospitalar (Quintera e Peixe, 2006; Fuentesfria et al., 2008a). Como os genes de resistência de MBLs estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, a transferência desses genes entre diferentes cepas e espécies bacterianas pode ocorrer livremente em ambientes favoráveis, como o esgoto hospitalar (Islam et al., 2008). A disseminação da resistência bacteriana através do esgoto hospitalar é causa de preocupação especialmente para bactérias hidrofílicas, como a *P. aeruginosa*, para as quais o esgoto pode ser um habitat ideal (Tuméo et al., 2008). Além disso, na maioria dos países em desenvolvimento, como o Brasil, os esgotos hospitalares são frequentemente descartados em corpos hídricos sem tratamento prévio. Sob este ponto de vista, o esgoto hospitalar pode constituir-se em um reservatório ambiental de resistência bacteriana e conseqüentemente em um foco de contaminação humana por bactérias portadoras de genes de resistência a antimicrobianos, contribuindo efetivamente para a disseminação da resistência bacteriana no ambiente.

Em vista da carência de informações sobre a presença e a disseminação de metalo β -lactamases fora do ambiente hospitalar, este estudo foi desenvolvido para detectar a presença dos principais genes de MBLs em isolados de *P. aeruginosa* de amostras de esgoto hospitalar, avaliar a relação genética entre os isolados e a diversidade nos genes de MBLs encontrados. A relação genética entre os isolados de *P. aeruginosa* de diferentes esgotos hospitalares foi avaliada pela ERIC-PCR e PFGE e a diversidade nos genes avaliada pela DGGE.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

Os isolados de *P. aeruginosa* do presente estudo foram recuperados de amostras de esgoto hospitalar coletadas de março/2006 a novembro/2007. As amostras de esgoto hospitalar foram coletadas de cinco hospitais distintos, designados de Hospitais I a V. Os Hospitais I a IV são localizados em Porto Alegre, RS, Brasil e o Hospital V é localizado em Passo Fundo, RS, Brasil. O Hospital I (HI) possui 882 leitos e realiza mais de 29 mil internações ao ano, o Hospital II (HII) possui 165 leitos e realiza 9 mil internações ao ano, o Hospital III (HIII) possui 749 leitos e realiza cerca de 27 mil internações ao ano, o Hospital IV (HIV) possui 544 leitos e realiza cerca de 28 mil internações ao ano e o Hospital V (HV) possui 635 leitos e realiza 28 mil internações ao ano. Foram analisados 451 isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar, sendo 89 do HI, 106 do HII, 60 do HIII, 69 do HIV e 127 do HV. O processamento das amostras de esgoto hospitalar e a identificação dos isolados de *P. aeruginosa* foram realizados conforme descrito anteriormente (Fuentefria et al., 2008a).

Triagem fenotípica de MBLs

A triagem fenotípica da produção de MBLs foi realizada para todos os isolados de *P. aeruginosa* pelo teste de aproximação de discos utilizando como substratos imipenem e ceftazidima e, como inibidores, o EDTA e o ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA) (Arakawa et al., 2000; Sader et al., 2004). Fitas de MBL Etest combinada (AB Biodisk, Solna, Sweden) de imipenem com EDTA foram utilizadas para confirmar os resultados do teste de aproximação de discos em isolados com susceptibilidade reduzida a carbapenêmicos. Uma cepa de *P. aeruginosa* com o gene *bla_{SPM-1}* foi utilizada como controle positivo e a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 como controle negativo.

PCR para os genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* e *bla_{GES}*

Os isolados com triagem positiva para produção de MBLs e/ou com susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos foram submetidos à pesquisa dos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, e *bla_{SPM-1}*, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos utilizados foram: IMP-5'(AAAGATACTGAAAAGTTAGT)3', IMP-5'(TCYCCAAYTTCACTRTGACT)3' (Yatsuyanagi et al., 2004), VIMF-5'(GTGGCAACGTACGCATCACC)3', VIMR-

5'(ACGAAGTCTAGACCGCCC)3', SPM1-5'(TCGGATCATGTCTGACTTGCC)3' e SPM1-5'(CCTTCGCTTCAGATCCTCGT)3', conforme descrito anteriormente (Fuentefria et al., 2008). Adicionalmente, os genes *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like, *bla*_{OXA-51}-like, *bla*_{OXA-58}-like e *bla*_{GES} foram pesquisados em isolados multirresistentes, com teste de triagem para produção de MBL positivo e nenhum gene de MBL anteriormente detectado. A PCR multiplex para pesquisa dos genes OXA foi realizada com os oligonucleotídeos e condições previamente descritos (Woodford et al., 2006). O gene *bla*_{GES} foi pesquisado com os oligonucleotídeos e condições de reação descritos por Poirel et al. (2000). As cepas utilizadas como controle positivo das reações de PCR foram cedidas pela Dra Ana Cristina Gales (Laboratório Alerta e Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Divisão de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de São Paulo) e pelo Dr Mark A. Toleman (Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, UK).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada por disco-difusão de acordo com as normas do CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, 2007), com os seguintes antibióticos: amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulânico, imipenem, meropenem, cefepime, aztreonam e polimixina B. Isolados resistentes a pelo menos quatro classes distintas de antimicrobianos foram considerados multirresistentes. Os valores de MIC (*Minimal Inibitory Concentration*) para imipenem foram avaliados por microdiluição em caldo (CLSI, 2003) somente para os isolados submetidos à genotipificação. A cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle de qualidade dos testes de susceptibilidade.

Tipificação molecular

A similaridade genética entre os isolados foi avaliada pela ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Para a ERIC-PCR, o DNA genômico foi preparado pela técnica descrita por Agarwal et al. (2002). A região adjacente ao elemento ERIC foi amplificada com os oligonucleotídeos ERIC1 e ERIC2

(Versalovic et al, 1991). A reação da PCR foi realizada num volume final de 30 µl, consistindo de 8 µl de DNA genômico, 5,5 mM de MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 400 ng de cada primer e 2 U de Taq DNA-polimerase (Invitrogen). A PCR foi realizada com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 7 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 15 minutos. Os amplicons resultantes foram visualizados em gel de agarose 2% acrescido do polímero Synergel (BioAmerica) (0,70 % agarose, 0,65 % synergel) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (89mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA, pH 8.3) corado com brometo de etídeo (0,5 µg L⁻¹).

Para a PFGE, o DNA cromossomal foi preparado pela técnica descrita por Schwarz e Liebisch (1994) e digerido com 20 U de *SpeI*, de acordo com as recomendações do fabricante (BioLabs, New England). Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1,0 % (Certified Megabase Agarose, Bio-Rad) em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x com o sistema CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 6 Vcm⁻¹ por 22 horas, com pulsos variando de 4 - 40 segundos. Os perfis obtidos foram interpretados pelo coeficiente de similaridade de Dice e a análise de agrupamento foi realizada pelo UPGMA (*Unweighted-Pair-Group Method*), com o auxílio do programa SPSS (versão 11.5).

Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE)

A DGGE foi realizada para avaliar a variabilidade na seqüência de nucleotídeos do fragmento amplificado do gene *bla*_{SPM-1}. O DNA genômico dos isolados foi extraído pela técnica descrita por Agarwal et al. (2002). O fragmento foi amplificado com os oligonucleotídeos SPMDGGE-5'(AGCCCTGCTTGGATTCATGG)3', acrescido de um grampo-GC de 40 nucleotídeos na extremidade 5', e SPMDGGE-5'(CCCGTGCCGTCCAAATGAAAG)3'. Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do programa PrimoMelt (versão 3.4). O fragmento de 400 pb amplificado foi selecionado com base no seu perfil de desnaturação, de maneira que o produto de PCR tivesse pelo menos dois domínios de desnaturação e a diferença entre as temperaturas de desnaturação dos domínios de maior e menor temperaturas fosse maior que 3 graus. A PCR foi desenvolvida nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 2

minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 65 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto; seguidos de uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. A DGGE foi realizada com o sistema DCode *Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, Richmond, CA). Alíquotas de 20 µl dos produtos de PCR foram aplicadas em géis de poliacrilamida (8,0 % [w/v] acrilamida em tampão Tris-Acetato-EDTA 0,5x) com gradiente de desnaturação de 15-50% (solução 100% desnaturante composta por uréia 7M e formamida deionizada 40%). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 0,5x por 6 horas a 100 V, a temperatura constante de 60 °C. Os géis foram corados com brometo de etídeo (solução 0,5 µg^L⁻¹) e as imagens adquiridas com o programa Kodak 1D (versão 3.5.2).

Índice Discriminatório das técnicas de tipificação

O poder discriminatório foi determinado pela fórmula generalizada de Hunter para as técnicas de ERIC-PCR e PFGE (Hunter, 1990), o qual indica a probabilidade de que dois isolados selecionados ao acaso na população estudada sejam assinalados em grupos de tipificação diferentes.

RESULTADOS

Pesquisa dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA} e *bla*_{GES}

Dos 451 isolados de *P. aeruginosa* analisados, 258 apresentaram teste de triagem fenotípica para MBLs positivo em pelo menos uma metodologia testada e/ou susceptibilidade reduzida aos carbapenênicos e foram submetidos à PCR para pesquisa dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, e *bla*_{SPM-1}. Os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} não foram detectados no presente estudo. O gene *bla*_{SPM-1} foi detectado em 5,1 % (n = 23) dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar. Este índice foi de 15,7 % (n = 14) entre os isolados do HI, de 4,7 % (n = 5) entre os isolados do HII e de 3,1 % (n = 4) entre os isolados do HV. Nenhum gene de MBL foi detectado entre os isolados dos HIII e HIV. Os genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{GES} também não foram detectados nos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar deste estudo.

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Todos os isolados de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} apresentaram fenótipo de multirresistência, com exceção do isolado F7. Os isolados *bla*_{SPM-1} positivos apresentaram 100,0 % (n = 23/23) de resistência ao imipenem, 95,6 % (n = 22/23) de resistência a gentamicina e ciprofloxacina, 86,9 % (n = 20/23) de resistência a ceftazidima e amicacina, 82,6 % (n = 19/23) de resistência ao meropenem, 65,2 % (n = 15/23) de resistência a cefepime, 60,9 % (n = 14/23) de resistência a ticarcilina/clavulanato, 30,4 % (n = 7/23) de resistência a piperacilina/tazobactam e 8,7 % (n = 2/23) de resistência ao aztreonam. Não foi observada resistência a polimixina B. Os isolados *bla*_{SPM-1} negativos também apresentaram altas taxas de resistência, 100 % a gentamicina (n = 13/13), 92,3 % (n = 12/13) a ciprofloxacina, 84,6 % (n = 11/13) ao imipenem, 76,9 % (n = 10/13) a ticarcilina/clavulanato, 69,2 % (n = 9/13) a amicacina (Tabela 1). Com exceção dos Perfis de Resistência Tipos 12 e 14, que foram observados em isolados dos Hospitais I e II, os demais perfis foram exclusivos do esgoto de um único hospital (Tabela 1). Os valores de MIC para imipenem foram maiores que 16 µg/mL para todos isolados, confirmando os resultados de resistência obtidos por disco-difusão. Todos os isolados de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} do HI apresentaram valores de MIC > 256 µg/mL, entretanto os isolados com o gene *bla*_{SPM-1} dos demais hospitais apresentaram MICs para imipenem variando de 16 a >256 µg/mL (Figura 1).

Tipificação molecular

A tipificação molecular por ERIC-PCR e PFGE foi realizada para 23 isolados de *P. aeruginosa* com gene *bla*_{SPM-1} e outros 13 isolados multirresistentes selecionados ao acaso, totalizando 36 isolados. Os padrões de ERIC-PCR originaram de 3 a 10 fragmentos, com tamanhos variando de 200 a 1530 pb. Os isolados de *P. aeruginosa* mostraram grande heterogeneidade, apresentando 32 perfis de ERIC-PCR diferentes. A análise de agrupamento por UPGMA formou seis grupos em um nível de 70% de similaridade. Não foi observada relação clonal entre isolados provenientes de diferentes amostras de esgoto hospitalar (Figura 1). O índice discriminatório (D) da ERIC-PCR foi de 0,99.

Para a tipificação molecular através da PFGE o isolado H11 não pode ser recuperado do estoque de glicerol e não foi incluído na análise, totalizando 35 isolados. Os perfis de PFGE mostraram de 12 a 17 fragmentos, com tamanhos variando de 97 a 730 Kb (Figura 2). Foram encontrados 15 perfis de PFGE diferentes. Isolados provenientes de esgotos de diferentes hospitais não apresentaram relação clonal (Figura 1). O índice discriminatório (D) da PFGE foi de 0,89.

DGGE

A DGGE foi utilizada para avaliar a diversidade na seqüência de nucleotídeos do fragmento amplificado do gene *bla*_{SPM-1} entre os 23 isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar. O fragmento amplificado corresponde a uma região de 360 pb que vai do nucleotídeo 2310 ao 6670 da seqüência de *P. aeruginosa* AY341249, correspondente a região do gene *bla*_{SPM-1} (número de acesso AY341249). Um único padrão de migração foi observado, mostrando que a seqüência de nucleotídeos do gene *bla*_{SPM-1} da região amplificada é idêntica para todos os isolados avaliados (Figura 3).

DISCUSSÃO

Diversos pesquisadores têm ressaltado a importância de ambientes naturais como reservatórios de bactérias resistentes a antimicrobianos (Henriques et al., 2006; Mesa et al., 2006; Quintera et al., 2006). No presente estudo, todos os isolados de *P. aeruginosa* com gene *bla*_{SPM-1}, com exceção do F7, apresentaram fenótipo de multirresistência, com resistência a algumas classes de antimicrobianos de uso hospitalar restrito, um forte indício da origem hospitalar dos mesmos. Mesmo porque, até o momento, não foram recuperadas cepas de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 de pacientes da comunidade, somente de pacientes hospitalizados e principalmente em unidades de tratamento intensivo. A resistência aos carbapenêmicos observada foi extremamente alta, principalmente ao imipenem, e pode ser explicada pela presença do gene *bla*_{SPM-1}, e, nos outros isolados, pode ter corrido pela perda de OprD, presença de sistemas de efluxo e β -lactamases cromossomais do tipo AmpC ou, ainda, pela ação em conjunto de múltiplos mecanismos (Pai et al., 2001). Também foram observadas altas taxas de resistência a gentamicina e amicacina. Atualmente, a resistência a esses

aminoglicosídeos em *P. aeruginosa* é muito comum, sendo a inativação enzimática o principal mecanismo de resistência (Poole, 2005). Também, a resistência aos aminoglicosídeos observada pode ser explicada pela presença não de uma, mas de múltiplas enzimas modificadoras e como resultado, observa-se resistência de amplo-espectro aos aminoglicosídeos (Rodriguez et al., 2000). Taxas de resistência acima de 90% foram observadas para a ciprofloxacina entre os isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar deste estudo, o que pode ter ocorrido pela exposição freqüente a concentrações de fluoroquinolonas, normalmente presentes no ambiente hospitalar, as quais podem induzir mutações na DNA girase ou por uma hiper-expressão de sistemas de efluxo (Nakajima et al., 2002). Por fim, também foi observada uma resistência relativamente elevada às cefalosporinas de terceira e quarta gerações, possivelmente pela presença de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), além do gene *bla*_{GES}, as quais têm sido detectadas em *P. aeruginosa* (Jiang et al., 2006). Os perfis de resistência observados foram característicos de cada esgoto hospitalar, provavelmente refletindo os diferentes esquemas terapêuticos utilizados em cada ambiente. Esses dados trazem à tona a possibilidade de transferência de genes de resistência entre bactérias em ambientes extremamente favoráveis, como o esgoto hospitalar, e o estabelecimento de reservatórios ambientais de resistência bacteriana, uma das grandes preocupações em saúde pública.

As taxas de MBLs reportadas entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* de hospitais de Porto Alegre e Passo Fundo são elevadas, com prevalência do gene *bla*_{SPM-1}. Gaspareto et al. (2007) encontraram o gene *bla*_{SPM-1} em 67,0 % e 35,71 % e o gene *bla*_{IMP-1} em 8,33% e 21,43% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos de diferentes hospitais de Porto Alegre. Gräf et al. (2008) encontraram o gene *bla*_{SPM-1} em 35% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes e resistentes a carbapenêmicos em Passo Fundo. Entretanto, a ocorrência do gene *bla*_{SPM-1} entre os isolados de *P. aeruginosa* das amostras de esgoto hospitalar deste estudo foi baixa, em torno de 5,1% e, em dois dos esgotos dos cinco hospitais estudados, não foram encontrados genes de β -lactamases. Ainda assim, esse achado revela a presença de isolados de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} em esgotos hospitalares e avança a possibilidade

desses esgotos serem uma rota de disseminação desse tipo de resistência, sem falar de outros mecanismos de resistência possivelmente presentes, que foram anteriormente discutidos.

A diversidade na sequência dos genes *bla*_{SPM-1} encontrados foi avaliada pela DGGE, onde, fragmentos com co-migração nos géis de DGGE correspondem a moléculas 100% idênticas e fragmentos com diferentes mobilidades nos géis de DGGE refletem diferenças na composição de nucleotídeos. A DGGE tem sido utilizada para avaliar a diversidade em genes de resistência (Doherty et al., 2001; McCammon et al., 2008). Henriques et al. (2006) utilizaram a DGGE para avaliar a diversidade em genes de β -lactamases de ambientes aquáticos e mostraram que a maioria das seqüências avaliadas, principalmente *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA-2}, são idênticas ou muito similares as seqüências dos genes de β -lactamases previamente caracterizadas em isolados clínicos. Até o momento, somente uma variante alélica do gene *bla*_{SPM} foi descrita em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Toleman et al., 1996). Os resultados da DGGE do gene *bla*_{SPM-1} dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar mostraram fragmentos com mesmo padrão de migração, denotando mesma seqüência de nucleotídeos. Além disso, a cepa de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 utilizada como controle da reação de PCR-DGGE é proveniente de isolado clínico e apresentou o mesmo padrão de migração no gel de DGGE.

A tipificação dos isolados revelou alta diversidade, tanto pela ERIC-PCR quanto pela PFGE. Os índices discriminatórios de ambas metodologias foram elevados. Entretanto, a ERIC-PCR (D=0,99) mostrou maior capacidade discriminatória uma vez que permitiu diferenciar isolados que não puderam ser diferenciados pela PFGE (D=0,89). Silbert et al. (2004) relataram que a ERIC-PCR mostrou resultados discriminatórios comparáveis a PFGE para bactérias não-fermentadoras, comprovando que ambas metodologias podem ser utilizadas como ferramentas na investigação epidemiológica dessas bactérias. Dentre os 36 isolados analisados, foram formados somente quatro grupos, com dois isolados cada, com perfis ERIC-PCR idênticos (Figura 1, Isolados F24 e F28; F5 e F7; F20 e F21; H8 e H9), refletindo a grande heterogeneidade encontrada entre os isolados. Desses quatro grupos, três também apresentaram

padrões de PFGE idênticos (Figura 1, Isolados F24 e F28, Isolados F5 e F7 e Isolados F20 e F21). Por terem sido indistinguíveis pela PFGE e ERIC-PCR, técnicas sabidamente discriminatórias, esses isolados provavelmente são realmente geneticamente relacionados. Outro achado revelou que os esses mesmos isolados que apresentaram padrões de ERIC-PCR e PFGE idênticos dentro de cada grupo são todos provenientes do HI, porém apresentaram perfis de resistência distintos, mostrando que esses isolados são geneticamente semelhantes mas fenotipicamente distintos. Além disso, dentre esses seis isolados, somente F7 e F20 apresentaram o gene *bla*_{SPM-1}. O gene *bla*_{SPM-1} é localizado no plasmídeo bacteriano e pode ter sido perdido por essas cepas geneticamente idênticas (Isolados F7 e F21), embora continuem a expressar fenótipo de resistência a carbapenêmicos. Independente da metodologia de tipificação utilizada, os grupamentos foram formados pela origem dos isolados, não havendo relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de diferentes esgotos hospitalares, mostrando que populações geneticamente diferentes estão estabelecidas nesses esgotos hospitalares e que, provavelmente, são provenientes dos respectivos ambientes hospitalares.

A ocorrência de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes e portadores do gene *bla*_{SPM-1} nos esgotos hospitalares estudados, chama a atenção para o risco de disseminação de bactérias multirresistentes e de genes de resistência a antimicrobianos, através do esgoto hospitalar. As bactérias multirresistentes presentes no esgoto podem contaminar rios, lagos e oceanos e a interação entre ecossistemas pode promover uma pressão seletiva capaz de alterar o ambiente de maneira a favorecer a emergência e disseminação de microrganismos resistentes.

Agradecimentos

A Dra Marisa Cardoso (Medicina Veterinária Preventiva, UFRGS) e a Dra Poli Mara Spritzer (Departamento de Fisiologia, UFRGS) por permitirem a utilização dos equipamentos para PFGE e DGGE.

Referências

Kabra, SK, Chandra R, Diwedi SN (2002) Phenotypic & genotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis in India. *Ind J Med Res* 116:73-81

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M (2000) Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by using Thiol Compounds. *J Clin Microbiol* 38: 40-43

Chee-Sanford, JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie, RI (2001) Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater. *Appl Environ Microbiol* 67:1494-1502

Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. 2003. Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S17. 2007. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Fuentefria, DB, Ferreira, AE, Gräf T, Corção G (2008) Spread of Metallo- β -lactamases: Screening reveals the presence of a *bla*_{SPM-1} gene in hospital sewage in southern Brazil. *Braz J Microbiol*. in press

Gales AC, Menezes LC, Silbert SS, Sader HS (2003) Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 52:699-702

Gaspareto PB, Martins AF, Zavascki AP, Barth AL (2007) Occurrence of *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol* 38:108-109

- Gräf T, Fuentefria DB, Corção G (2008) Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas do sul do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 41:306-308.
- Henriques I, Moura A, Alves S, Saavedraz MJ, Correia A (2006) Analysing diversity among β -lactamase encoding genes in Aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 56:418-429
- Hunter PR (1990) Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 28:1902-1905
- Islam, MJ, Uddin MS, Hakim MA, Das KK, Hasan MN (2008) Role of untreated liquid hospital waste to the development of antibiotic resistant bacteria. *J Innov Dev Strategy* 2:17-21
- Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu W (2006) Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2990-2995
- Livermore DM (2003) Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 36:S11–S23
- McCammon MT, Gillette JS, Thomas DP, Ramaswamy SV, Rosas II, Graviss EA, Vijg J, Quitugua TN (2006) Detection by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of *pncA* Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from the United States-Mexico Border Region. *Antimicrob Agents Chemother* 49:221-02217
- Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola MT, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, PratsG, Navarro F (2006) Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 58:211–215.
- Nakajima A, Sugimoto Y, Yoneyama H, Nakae T (2002) High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Due to Interplay of the MexAB-OprM Efflux Pump and the DNA Gyrase Mutation. *Microbiol Immunol* 6:391-395

- Pai H, Kim JW, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N (2001) Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 45:480-484
- Poirel L, Thomas IL, Naas T, Karim A, Nordmann P (2000) Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:622-32
- Quinteira S, Peixe L (2006) Multiniche Screening Reveals the Clinically Relevant Metallo- β -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Far from the Hospital Setting: an Ongoing Dispersion Process? *Appl Environ Microbiol* 72:3743–3745
- Rodriguez EF, Gonzalez MM, Gonzalez, LZ, Sabatelli FJ, Tejedor Junco MY (2000) Aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the Canary Islands. *Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infektkrankh Hyg Abt* 289:817–826
- Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN (2004) Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Int J Antimicrobl Agents* 25:57-612
- Schwarz S, Liebisch B (1994) Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. *Lett Appl Microbiol* 19:469-472
- Silbert S, Pfaller M, Hollins RJ, Barth, AL, Sader HS (2004) Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25(10):847-851
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR (1996) Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America:

report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 37:673-679

Tuméo E, Gbaguidi-Haore H, Patry I, Bertrand X, Thouverez M, Talon D (2008) Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *Int J Hyg Environ Health* 211:200–204

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19:6823-6831

Walsh TR, Toleman MA, Poirel LA, Nordmann P (2005) Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18:306–325

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB, Livermore DM (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrobial Agents* 27:351-353

Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, Enomoto K (2004) Class 1 Integron Metallo- β -Lactamase Gene bla_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 48:626-628

Zavascki AP, Barth AL, Gonçalves ALS, Moro ALD, Fernandes J F, Martins AF, Ramos F, Goldani LZ (2006) The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Antimicrobial Chemother* 58:387-392

Tabela 1- Perfil de susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes portadores ou não do gene *bla*_{SPM-1} provenientes de amostras dos esgotos dos Hospitais I a V (n = 36).

Isolado	Origem	PCR <i>bla</i> _{SPM-1}	Perfil de Resistência Tipo	Perfil de Resistência
F24	HV	-	1	Gen Cip Ami Tic Imp Mer Cpm
F28	HV	-	1	Gen Cip Ami Tic Imp Mer Cpm
F5	HV	-	2	Gen Cip Caz Tic Imp
F7	HV	+	3	Gen Cip Imp Cpm
F11	HV	-	4	Gen Cip Caz Tic Imp Cpm
F13	HV	-	5	Gen Cip Caz Tic Cpm
F3	HV	+	6	Gen Cip Caz Tic Imp Cpm Atm
L25	HI	-	7	Gen Cip Ami Caz Ppt Imp Mer Cpm
X60	HIV	-	8	Gen Cip Ami Tic
F20	HV	+	9	Gen Cip Ami Ppt Tic Imp Mer Cpm
F21	HV	-	1	Gen Cip Ami Tic Imp Mer Cpm
F33	HV	-	1	Gen Cip Ami Tic Imp Mer Cpm
F35	HV	-	1	Gen Cip Ami Tic Imp Mer Cpm
M20	HI	+	10	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer
X68	HIV	-	11	Gen Imp
N1	HI	+	12	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer Cpm
N4	HI	+	10	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer
N9	HI	+	10	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer
N18	HI	+	10	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer
D30	HV	+	16	Tic Imp Mer Cpm Atm
M12	HI	+	12	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer Cpm
N6	HI	+	10	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer
N5	HI	+	10	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer
L17	HI	+	13	Gen Cip Ami Caz Ppt Imp Mer Cpm
N7	HI	+	10	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer
L19	HI	+	13	Gen Cip Ami Caz Ppt Imp Mer Cpm
L12	HI	+	13	Gen Cip Ami Caz Ppt Imp Mer Cpm
L14	HI	+	13	Gen Cip Ami Caz Ppt Imp Mer Cpm
N3	HI	+	12	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer Cpm
H11	HII	+	14	Gen Cip Ami Caz Ppt Tic Imp Mer Cpm
T25	HIII	-	15	Gen Cip Ami Ppt Imp Mer
H8	HII	+	12	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer Cpm
H9	HII	+	12	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer Cpm
H12	HII	+	14	Gen Cip Ami Caz Ppt Tic Imp
H13	HII	+	12	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer Cpm
L24	HI	-	14	Gen Cip Ami Caz Ppt Tic Imp Mer Cpm

HI, Hospital I; HII, Hospital II; HIII, Hospital III; HIV, Hospital IV; HV, Hospital V. Gen, gentamicina; Cip, ciprofloxacina; Ami, amicacina; Caz, ceftazidima, Ppt, piperacilina/tazobactam; Tic, ticarciclina/clavulanato; Imp, imipenem; Mer, meropenem; Cpm, cefepime.

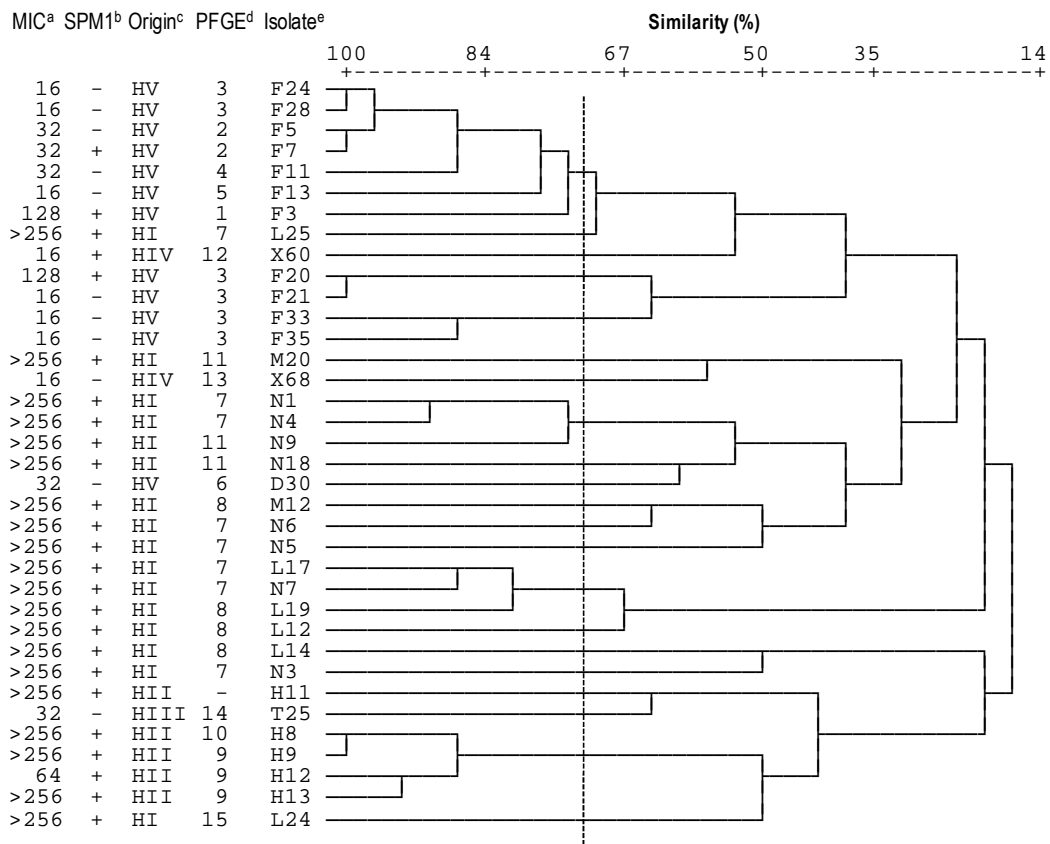


Figura 1 – Dendrograma (Dice, UPGMA) dos padrões de ERIC-PCR dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de esgoto hospitalar dos Hospitais I a V. A linha transversal indica 70% de similaridade. ^aValores de MIC para imipenem ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ^bSMP-1, gene *bla*_{SPM-1}; ^cOrigin, Origem do isolado: HI, Hospital I; HII, Hospital II; HIII, Hospital III; HIV, Hospital IV; HV, Hospital V; ^dPFGE, perfil de PFGE; ^eIsolate: isolate number.

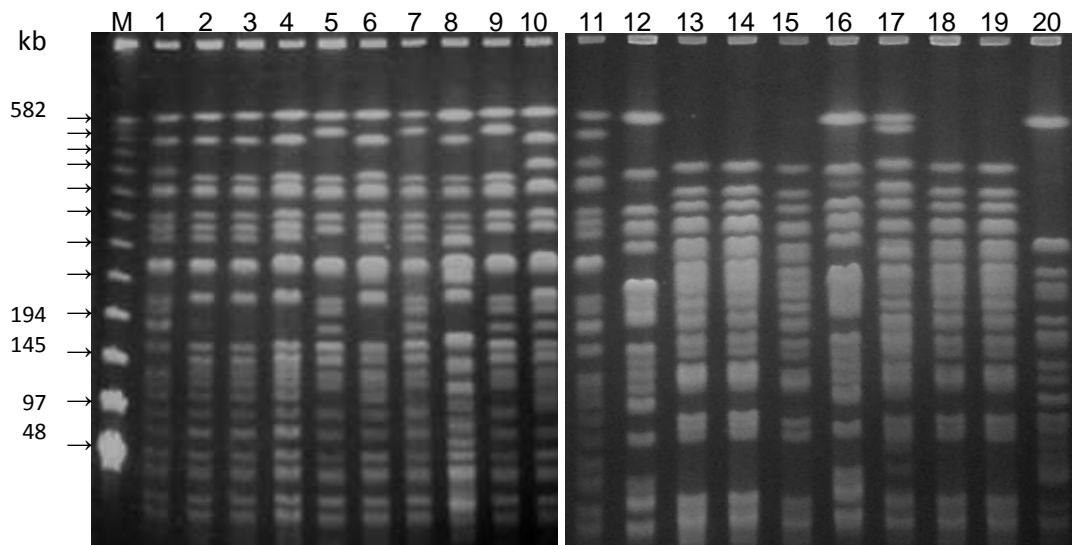


Figura 2 – Gel de agarose representativo de alguns perfis de PFGE dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar. M, marcador de tamanho molecular (Lamda Ladder PFG Marker, BioLabs, New England). As canaletas 2 a 20 mostram os perfis de PFGE descritos na Figura 1. Canaleta 1, *P. aeruginosa* ATCC 25922; Canaletas 2, 3, 4, 6, 8, Perfil PFGE Tipo 7; Canaletas 5, 7, 9, Perfil PFGE Tipo 8; Canaleta 10, Perfil PFGE tipo 9; Canaleta 11, *P. aeruginosa* ATCC 27853; Canaleta 12, Perfil PFGE Tipo 1; Canaletas 13, 14, 15, Perfil PFGE Tipo 2; Canaleta 16, Perfil PFGE Tipo 4; Canaleta 17, Perfil PFGE Tipo 5; Canaletas 18 e 19, Perfil PFGE Tipo 3 e Canaleta 20, Perfil PFGE Tipo 6.

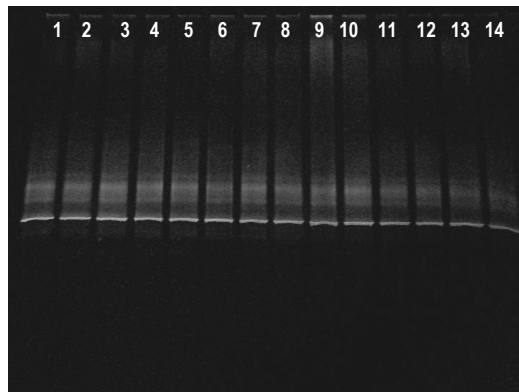


Figura 3 – Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação do fragmento de gene *bla*_{SPM-1} dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar. Poliacrilamida 8,0 %, gradiente de desnaturação de 15-50%. Canaletas: 1, fragmento amplificado do controle positivo *P. aeruginosa bla*_{SPM-1}; 2, isolado F3; 3, isolado F20; 4, isolado N1; 5, isolado N3; 6, isolado N5; 7, isolado N18; 8, isolado L14; 9, isolado L17; 10, isolado H8; 11, isolado H9; 12, isolado H11; 13, isolado H12; 14, isolado H13.

4. DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo, isolados de *P. aeruginosa* de amostras de esgoto hospitalar e água superficial foram avaliados quanto ao seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a presença e diversidade de genes de MBLs e similaridade genética por ERIC-PCR e PFGE. Para facilitar a discussão geral dos resultados, as amostras foram classificadas da seguinte maneira: Ambiente I, amostras de esgoto do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e água superficial do Rio Passo Fundo, consistindo de três pontos de água superficial do Rio Passo Fundo (Pontos A, B e C) e três pontos de esgoto hospitalar do HSVP (Pontos D, E e F); Ambiente II, amostras de esgoto do Hospital Divina Providência (HDP) e água superficial do Arroio Cascata e Riacho da Gruta, consistindo de dois pontos de esgoto hospitalar do HDP (Pontos G e H), um ponto de água do Riacho da Gruta (Ponto I) e dois pontos de água do Arroio Cascata (Pontos J e K); Hospital I, amostras de esgoto do Hospital Conceição (HC), consistindo de seis pontos de esgoto hospitalar (Pontos L, M, N, O, P e Q), Hospital II, amostras de esgoto do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), consistindo de quatro pontos de esgoto hospitalar (Pontos R, S, T e U) e Hospital III, amostras de esgoto do Hospital

São Lucas (HSL), consistindo de um ponto de esgoto hospitalar (Ponto X). Os isolados de *P. aeruginosa* deste estudo foram designados pela letra correspondente ao ponto de coleta e numerados consecutivamente com numeração arábica.

Foram analisados, 614 isolados de *P. aeruginosa*, sendo 198 do Ambiente I, 198 do Ambiente II, 89 do Hospital I, 60 do Hospital II e 69 do Hospital III. Não foram encontrados isolados de *P. aeruginosa* no Ponto A do Ambiente I em nenhuma das duas coletas realizadas. O Ponto A fica próximo à nascente do rio Passo Fundo e não recebe contribuição do esgoto da cidade de Passo Fundo, portanto é um ponto não impactado, o que pode justificar a ausência de isolados de *P. aeruginosa* nas amostras de água superficial coletadas.

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou 45 perfis de resistência diferentes entre os 614 isolados de *P. aeruginosa* deste estudo (Tabela 1), dentre estes perfis de resistência encontrados, somente 12 foram comuns a mais de um ambiente ou esgoto hospitalar, os demais foram característicos de uma única origem, mostrando que o perfil de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* está associado à origem da amostra. Em geral, os índices de resistência, e até de multirresistência, observados em isolados clínicos de *P. aeruginosa* são bastante elevados (Zavascki, et al. 2006; Gaspareto et al. 2007). No presente estudo, os isolados dos Ambientes I e II apresentaram índices de susceptibilidade de 64,1% e 85,3%, respectivamente, mostrando que mais da metade dos isolados foi sensível a todos os antimicrobianos testados, não esquecendo que nesses dois ambientes existem

pontos de água superficial com os índices de susceptibilidade mais elevados. Os Hospitais I, II e III apresentaram, respectivamente, susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados em 66,3 %, 66,6 % e 78,3 % dos isolados. Os dados de multirresistência entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* são elevados, em torno de 79,0 % (Amadi et al., 2009). Considerando isolados resistentes à pelo menos quatro classes de antimicrobianos como multirresistentes, os índices de multirresistência observados entre os isolados de *P. aeruginosa* do presente estudo foram baixos, muito inferiores aos observados entre isolados clínicos (Gaspareto et al. 2007). No Ambiente I, 17,6 % (n=35/198) dos isolados foram multirresistentes e no Ambiente II este índice foi de 3,03 % (n=6/198), não tendo sido observado o fenótipo de multirresistência entre isolados de água superficial. Já entre os isolados de esgoto hospitalar, os índices de multirresistência foram de 32,6 % (n= 29/89), 5,0 % (n=3/60) e 10,0 % (n=7/69) para os Hospitais I, II e III, respectivamente. Entretanto, apesar do baixo índice de multirresistência encontrado entre os isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar, bactérias resistentes, mesmo em pequena quantidade, podem encontrar condições favoráveis para tornarem-se predominantes em ambientes contaminados por antimicrobianos, como o esgoto hospitalar, alterando, assim, a composição original das comunidades microbianas e contribuindo para a disseminação da resistência bacteriana (Guardabassi et al., 1998).

Tabela 1 – Perfis de Resistência encontrados entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de esgoto hospitalar e água superficial dos Ambientes I e II e Hospitais I, II e III (n=614).

N° do Perfil	Resistência	Número de isolados				
		Ambiente I (n=198)	Ambiente II (n=198)	Hospital I (n=89)	Hospital II (n=60)	Hospital III (n=69)
1*	Sensível a todos antimicrobianos testados	127	169	59	40	54
2*	Imp	27	3	0	0	0
3	Imp Mer	2	0	0	1	0
4	Gen Cip Ami Ppt Tic Imp Cpm Atm	1	0	0	0	0
5	Gen Ami Ppt Tic Mer Pol	0	0	0	0	0
6	Gen Cip Caz Tic Imp Cpm Atm	2	0	0	0	0
7	Gen Cip Caz Tic Imp Cpm	4	0	0	0	0
8	Gen Cip Caz Tic Imp	1	0	0	0	0
9	Gen Cip Caz Tic Imp Atm	1	0	0	0	0
10	Gen Cip Imp Cpm	1	0	0	0	0
11	Gen Cip Caz Tic Imp Cpm	1	0	0	0	0
12	Gen Cip Caz Tic Cpm	2	0	0	0	0
13*	Gen Cip Ami Tic	1	0	0	0	1
14	Gen Cip Ami Tic Imp Mer Cpm	18	0	0	0	0
15	Gen Cip Ami Ppt Tic Imp Mer Cpm	1	0	0	0	0
16	Gen Cip Ami Tic Imp Mer	1	0	0	0	0
17	Gen Cip Ami Imp Mer	1	0	0	0	0
18	Ppt	1	0	0	0	0
19	Tic Imp Mer Cpm	1	0	0	0	0
20*	Mer	4	0	0	2	0
21	Tic Imp Mer Cpm Atm	1	0	0	0	0
22*	Cip Ami	0	1	0	1	0
23*	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer Cpm	0	3	4	0	0
24*	Gen Cip Ami Caz Ppt Tic Imp Mer Cpm	0	2	3	0	0
25	Cip	0	1	0	0	0
26*	Gen	0	8	0	1	0
27*	Gen Tic	0	8	0	0	1
28	Tic	0	1	0	0	0
29*	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer	0	1	9	0	0
30	Gen Cip Ami Caz Ppt Imp Mer Cpm	0	0	13	0	0
31	Gen Ami	0	0	1	0	0
32*	Gen,Tic Cpm	0	0	0	1	7
33	Atm	0	0	0	0	1
34	Gen Cip Ami Caz Imp Mer Cpm	0	0	0	0	1
35	Gen Ami Imp	0	0	0	0	1
36	Gen Imp	0	0	0	0	1
37*	Ami	0	0	0	2	1
38	Gen Cip Caz Imp Mer Cpm	0	0	0	0	1
39	Ami Imp	0	0	0	1	0
40	Cpm	0	0	0	1	0
41	Gen Cip	0	0	0	7	0
42	Caz	0	0	0	1	0
43	Gen Cip Ami Ppt Imp Mer	0	0	0	1	0
44	Caz Ppt	0	0	0	1	0
45	Gen Ami Cpm Atm	0	1	0	0	0

*, perfis comuns a mais de uma origem; Gen, gentamicina; Imp, imipenem; Mer, meropenem; Cip, ciprofloxacina; Caz, ceftazidima; Tic, ticarcilina/clavulanato; Cpm, cefepime; Ami, amicacina; Ppt, piperacilina/tazobactam; Atm, aztreonam.

O tipo de resistência observado também variou entre os diferentes ambientes estudados. No Ambiente I, foi observada susceptibilidade reduzida principalmente a imipenem, meropenem, cefepime, ticarcilina/clavulanato, gentamicina e ciprofloxacina; ocorrendo principalmente entre os isolados de esgoto hospitalar, uma vez que os isolados de *P. aeruginosa* do Rio Passo Fundo foram, na sua maioria, sensíveis a todos os antimicrobianos testados. No Ambiente II, os índices de resistência foram inferiores e foi observada susceptibilidade reduzida principalmente a gentamicina e ticarcilina/clavulanato. No Hospital I foram encontrados os maiores índices de susceptibilidade reduzida do presente estudo para a gentamicina, ciprofloxacina, amicacina, ceftazidima, imipenem, meropenem e cefepime; enquanto que no Hospital II, para a amicacina, meropenem e aztreonam, e no Hospital III, para amicacina, gentamicina, cefepime e ticarcilina/clavulanato. Independente do tipo de resistência observado, os perfis de resistência encontrados entre esses isolados incluem a maioria dos antimicrobianos utilizados atualmente para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* em seres humanos, o que nos leva a crer que a origem dos isolados resistentes encontrados no esgoto hospitalar seja o próprio ambiente hospitalar e que, provavelmente, os diferentes hospitais estudados adotam diferentes esquemas terapêuticos, os quais resultaram em diferentes padrões de resistência encontrados nos isolados de *P. aeruginosa* dos respectivos esgotos hospitalares. Além disso, os tipos de resistência observados entre os isolados de *P. aeruginosa* deste estudo são comumente observados entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*, mais um indício da origem dos isolados

resistentes encontrados nas amostras de esgoto hospitalar (Pai et al., 2001; Nakajima et al., 2002; Poole, 2005; Jiang et al., 2006).

As taxas de MBLs relatadas entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* de hospitais de Porto Alegre e Passo Fundo são freqüentemente elevadas e o gene *bla*_{SPM-1} é o mais comum (Zavascki et al., 2006; Gaspareto et al., 2007; Gräf et al., 2008). A ocorrência do gene *bla*_{SPM-1} entre os isolados de *P. aeruginosa* das amostras de esgoto hospitalar deste estudo foi em torno de 5,0 % e foi encontrada somente em isolados de três esgotos dos cinco hospitais estudados. O gene *bla*_{SPM-1} foi encontrado em quatro isolados de esgoto hospitalar do Ambiente I, cinco isolados de esgoto hospitalar do Ambiente II e 14 isolados do Hospital I. Outros genes de MBLs, ESBLs e OXAs pesquisados não foram detectados. Mesmo com essa baixa freqüência, esse achado revela a presença de isolados de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} em esgotos hospitalares e não descarta a possibilidade de constituírem uma forma de disseminação desse tipo de resistência, sem falar de outros mecanismos de resistência que também podem estar presentes e são freqüentemente associados a plasmídeos e transposons. Todos os isolados de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} do presente estudo, com exceção do isolado F7, apresentaram fenótipo de multirresistência e somente dois isolados do Ambiente I apresentaram resistência a aztreonam. Não foi observada resistência a polimixina B entre os isolados com o gene *bla*_{SPM-1}. No teste de microdiluição em caldo para o imipenem, todos os isolados com gene *bla*_{SPM-1} apresentaram um valor de MIC \geq 16 μ g/mL, sendo que a maioria

apresentou valores de MIC \geq 256 $\mu\text{g/mL}$, confirmando o tipo de resistência encontrado.

A diversidade na seqüência dos genes *bla*_{SPM-1} encontrados foi avaliada pela DGGE, técnica que tem sido muito útil para avaliação de diversidade em diferentes genes de resistência (Chee-Sanford et al., 2001; McCammon et al., 2005). Henriques et al. (2006) avaliaram a diversidade em genes de β -lactamases de ambientes aquáticos através da DGGE-PCR e mostraram que a maioria das seqüências avaliadas é idêntica ou muito similar as seqüências de genes de β -lactamases de isolados clínicos. Chee-Sanford et al. (2001) estudaram, através da DGGE-PCR, os genes de resistência a tetraciclina de populações bacterianas de lagoas e águas subterrâneas de duas fazendas de suínos e observaram que os genes de resistência a tetraciclina dos isolados bacterianos de águas subterrâneas possuíam o gene *tetM*, que não era predominante no ambiente, e era idêntico ao gene *tetM* recuperado das lagoas, sugerindo que a disseminação, nesse caso, não está limitada a cepas de origem gastrointestinal.

O gene de metalo β -lactamase *bla*_{SPM-1} apresenta uma única variante alélica descrita até hoje, sendo a mesma encontrada em isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa*, indicando uma origem comum (Toleman et al., 1996; Fuentesfria et al., 2008b). Os resultados da DGGE-PCR do gene *bla*_{SPM-1} dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar do presente estudo indicam que os fragmentos amplificados apresentam a mesma seqüência de nucleotídeos por apresentarem a mesma mobilidade eletroforética em géis de 8% de poliacrilamida com gradiente de desnaturaçã

de 15-50%. Além disso, o seqüenciamento do fragmento de PCR amplificado para pesquisa do gene *bla*_{SPM-1}, embora seja outra região, mostrou tratar-se da mesma seqüência de nucleotídeos, com 100% de similaridade com a seqüência de *Pseudomonas aeruginosa* DQ145284 (Fuentefria et al., 2008b) contribuindo para os resultados encontrados com a DGGE.

A tipificação dos isolados pela ERIC-PCR foi realizada com dois objetivos principais: avaliar se isolados de *P. aeruginosa* do esgoto hospitalar apresentam similaridade genética com isolados recuperados de amostras de água superficial, nas quais o respectivo esgoto é descartado (Ambientes I e II) e se há relação genética entre isolados de *P. aeruginosa* oriundos de amostras de esgoto hospitalar de diferentes hospitais (Hospitais I, II e III).

A tipificação por ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* dos Ambientes I e II mostrou grande diversidade, indicando múltiplas origens dos isolados. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de diferentes pontos de coleta de esgoto hospitalar nos Ambientes I e II, indicando que uma disseminação clonal está ocorrendo somente entre cepas de um mesmo ponto de coleta. A presença de isolados geneticamente idênticos em um mesmo ponto de coleta, amostrados em diferentes ocasiões é indício de que cepas estão persistindo ou sendo continuamente lançadas no esgoto hospitalar. Com o mesmo enfoque, Tuméo et al. (2008) não puderam relacionar geneticamente isolados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes com isolados de *P. aeruginosa* de amostras de esgoto hospitalar. No presente estudo, a análise de grupamentos pela ERIC-PCR indicou que outras fontes, que não os esgotos hospitalares em questão podem estar contribuindo para a

presença de *P. aeruginosa* nas amostras de água superficial estudadas ou, que estas amostras estejam muito diluídas e os isolados não possam ser detectados. Os isolados de *P. aeruginosa* de amostras de água superficial do Ambiente I (Pontos B e C) mostraram menor similaridade entre si, contribuindo para a hipótese de múltiplas origens desses isolados, pois sabe-se que o solo e a vegetação são grandes contribuintes para a presença de bactérias no ambiente aquático.

A tipificação por ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* dos Hospitais I, II e III também mostrou alta diversidade, mesmo entre isolados de mesma origem. Estes dados sugerem que populações geneticamente distintas estão circulando nos ambientes hospitalares estudados e, conseqüentemente, populações também geneticamente distintas são recuperadas dos respectivos esgotos hospitalares. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de diferentes esgotos hospitalares, pelo contrário, a similaridade entre estes isolados foi baixa.

A PFGE foi realizada com 36 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes e/ou com o gene *bla*_{SPM-1}, provenientes de amostras de esgoto dos cinco hospitais estudados. Em estudos que utilizam esta metodologia para isolados clínicos de *P. aeruginosa*, é comum encontrar cepas com pouca ou nenhuma diversidade, revelando relação clonal entre eles (Agarwal et al., 2002; Freitas & Barth, 2002; Gales et al., 2003; Gales et al., 2004). No presente estudo, 15 perfis diferentes foram encontrados, mostrando alta diversidade.

A análise de agrupamentos pela PFGE não mostrou relação clonal entre isolados de diferentes esgotos hospitalares e, ao contrário, os grupos

foram formados de acordo com a origem dos isolados, indicando, novamente, que populações geneticamente distintas estão estabelecidas nos diferentes esgotos hospitalares e que, provavelmente, são provenientes dos respectivos ambientes hospitalares. Seis isolados de *P. aeruginosa* foram indistinguíveis pelas metodologias de ERIC-PCR e PFGE, indicando que estes isolados são realmente geneticamente relacionados. Além disso, alguns isolados que não puderam ser diferenciados pela PFGE, puderam ser diferenciados pela ERIC-PCR, comprovando o maior poder discriminatório desta metodologia encontrado neste estudo.

5. CONCLUSÕES

1. Isolados de *P. aeruginosa* foram recuperados de todos os pontos de coleta estudados, com exceção do Ponto A, próximo à nascente do Rio Passo Fundo.

2. Isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar apresentaram maiores índices de resistência do que isolados de água superficial e o fenótipo de multirresistência foi observado somente entre isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar, correspondendo a 32,6%, 5,0% e 10,0% para os Hospitais II, II e III, respectivamente.

3. O gene *bla*_{SPM-1} foi encontrado em quatro isolados de esgoto hospitalar do Ambiente I, cinco isolados de esgoto hospitalar do Ambiente II e 14 isolados do Hospital I, correspondendo a 3,7 % de todos os isolados analisados; a DGGE revelou que todos os fragmentos do gene *bla*_{SPM-1} amplificados apresentaram o mesmo padrão de migração, indicando uma mesma seqüência de nucleotídeos nos respectivos fragmentos.

4. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar e água superficial através da ERIC-PCR e os

grupamentos foram formados de acordo com a origem dos isolados; os perfis de resistência aos antimicrobianos puderam ser relacionados aos perfis de ERIC-PCR encontrados nos isolados de *P. aeruginosa* dos Ambientes I e II.

5. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de amostras de diferentes esgotos hospitalares, pois uma alta diversidade foi encontrada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AENDEKERK, S.; GHYSELS, B.; CORNELIS, P. et al. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2371-2381, 2002.

AGARWAL, G. ; KAPIL, A. ; KABRA, S.K. et al. Phenotypic & genotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis in India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 11, p. 73-81, 2002.

AMADI, E.S.; UZOARU, P.N.; ORJI, I. et al. Antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Enugu and Abakaliki, Nigeria. **The Internet Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, 2009.

AVISON, M. B.; HIGGINS, C. S.; VON HELDREICH, C. J. et al. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β -lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 413-419, 2001.

AVRAHAMI, S.; LIESACK, W.; CONRAD, R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 691–705, 2003.

BANO, N.; HOLLIBAUGH, J.T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 505–518, 2002.

BENNETT, P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 1-4, 1999.

BENZ, R.; HANCOCK, R.E. Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 646, n. 2, p. 298-308, 1981.

BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C. et al. VanA-Type *Enterococci* from Humans, Animals, and Food: Species Distribution, Population Structure, Tn1546 Typing and Location, and Virulence Determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3307-3319, 2007.

BOYD, A.; CHAKRABARTY, A.M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2355-2359, 1994.

BURTON, J.P.; CADIEUX, P.A.; REID, G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic Instillation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 97–101, 2003.

BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 32, p.1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G.A; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.1211-1233, 1995.

CAMPBELL, S.J.; DESHMUKH, H.S.; NELSON, C.L. et al. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 678-684, 2008.

CARVALHO, A.P.; ALBANO, R.M.; DE OLIVEIRA, D.N. et al. Characterization of an epidemic carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial and Drug Resistance**, v. 12, p. 103-108, 2006.

CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; WALSH, T.R.; GALES, A.C.; JONES, R.N. Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: Report from the sentry antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2344-2345, 2004a.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A; JONES, R.N. et al. Molecular characterization of a β -Lactamase Gene, bla_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4654-4661, 2004.

CHEE-SANFORD, J.C.; AMINOV, R.I.; KRAPAC, I.J. et al. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1494-1502, 2001.

COSTANZO, S.D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p. 218-223, 2005.

CRESPO, M. P.; WOODFORD, N.; SINCLAIR, A. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo- β -Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5094-5101, 2004.

CRUMP, B.C.; KLING, G.W.; BAHAR, M. et al. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2253– 2268, 2003.

DAI, Y.; GARCIA, D.O.; ADAMS, J. et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant

Pseudomonas aeruginosa isolated from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 852-856, 2007.

FREITAS, A.L.P.; BARTH, A.L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2002.

FUENTEFRIA, D.B.; FERREIRA, A.E.; GRÄF, T. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 470-473, 2008a.

FUENTEFRIA, D.B.; FERREIRA, A.E.; GRÄF, T. et al. Spread of Metallo- β -lactamases: Screening reveals the presence of a *bla*_{SPM-1} gene in hospital sewage in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2008b, in press.

GALES, A.C.; MENEZES, I.C.; SILBERT, S. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 699-702, 2003.

GALES, A.C.; TORRES, P.L.; VILARINHO, D.S.O. et al. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in an Intensive Care Unit of a Teaching Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 267-271, 2004.

GARZA-RAMOS, U.; MORFIN-OTERO, R.; SADER, H.S. et al. Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-15} in a Class 1 Integron, *In95*, from *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital in Mexico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2943-2946, 2008.

GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P. et al. Occurrence of *bla*_{SPM1} and *bla*_{IMP1} genes of metallo- β -lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.108-109, 2007.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A. Antipseudomonal antibiotics. 2001. **Medical Clinics of North America**, v. 85, n. 1, p.19-42, 2001.

GILLIGAN, P.H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 35-51, 1991.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 3941-3952, 1990.

GOÑI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C. et al. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 125-132, 2000.

GRÄF, T.; FUENTEFRIA, D.B.; CORÇÃO, G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas do sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 306-308, 2008.

GUARDABASSI, L.; PETERSEN, A.; OLSEN, J. et al. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3499-3502, 1998.

GUPTA, V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 2, p. 131-143, 2008.

GURTLER, V.; GARRIE, H.D.; MAYALL, B.C. Denaturing gradient gel electrophoretic multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3310– 3320, 2002.

HAMZEHPOUR, M.; PECHÀRE, J. C.; PLÉSIAT, P.; et al. OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2392–2396, 1995.

HENRIQUES, I.; MOURA, A.; ALVES, S.; SAAVEDRAZ, M.J. et al. Analysing diversity among β -lactamase encoding genes in Aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 418-429, 2006.

HERBERT, S.; HALVORSEN, D.S.; LEONG, T. et al. Large outbreak of infection and colonization with gram-negative pathogens carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP-4} at a 320-bed tertiary hospital in Australia. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 98-101, 2007.

HIGGINS, C.F.; AMES, G.F.L.; BARNES, W.M. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, v. 298, p. 760-762, 1982.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 825-834, 1991.

IVERSEN, A.; KÜHN, I.; FRANKLIN, A. et al. High Prevalence of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Swedish Sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2838-2842, 2002.

IYOBE, S.; KUSADOKORO, H.; OZAKI, J. et al. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 824-829, 2000.

IYOBE, S.; KUSADOKORO, H.; TAKAHASHI, A. et al. Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2023-2027, 2002.

JIANG, X.; ZHANG, Z.; LI, M. et al. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2990-2995, 2006.

KERSTERS, K.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M. et al. Recent changes in the classification of the Pseudomonads: an overview. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 465-477, 1996.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KOH, T.H.; WANG, G.C.Y.; SNG, L. IMP-1 and a Novel Metallo- β -Lactamase, VIM-6, in Fluorescent Pseudomonads Isolated in Singapore. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2334-2336, 2004.

KÖHLER, T.; KOK, M.; HAMZEHPUR, M.M. et al. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2288-2290, 1996.

KÖHLER, T.; MICHEA-HAMZEHPUR, M.; EPP, S.F. et al. Carbapenem Activities against *Pseudomonas aeruginosa*: Respective Contributions of OprD and Efflux Systems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 424-427, 1999.

LANG, A. B.; HORN, M. P.; IMBODEN, M. A. et al. Prophylaxis and therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. **Vaccine**, v. 22, p. 44-48, 2004.

LAING, C.; PEGG, C.; YAWNEY, D. et al. Rapid Determination of *Escherichia coli* O157:H7 Lineage Types and Molecular Subtypes by Using Comparative Genomic Fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6606-6615, 2008.

LARAKI, N.; FRANCESCHINI, N.; ROSSOLINI, G.M. et al. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 902-906, 1999.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A. et al. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1584-1590, 1999.

LE THOMAS, I.; COUETDIC, G.; CLERMONT, O. et al. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 48, p. 553–555, 2001.

LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D. et al. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolate from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4485-4491, 2005.

LI, X.; MA, Z.D.; LIVERMORE, D.M. et al. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1742–1752, 1994.

LI, X.Z.; SRIKUMAR, R.; POOLE, K. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 399–403, 1998.

LI, X.Z.; BARRE, N.; POOLE, K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 885-93, 2000.

LIVERMORE, D.M. Role of β-lactamase and impermeability in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics and Chemotherapy**, v. 42, p. 257-63, 1989.

LIVERMORE, D.M. Interplay of Impermeability and Chromosomal 1B-Lactamase Activity in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 2046-2048, 1992.

LIVERMORE, D.M. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical and Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 634-40, 2002.

LUZZARO, F.; MANTENGOLI, E.; PERILLI, M. et al. Dynamics of a Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β-Lactamase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1865-1870, 2001.

MASUDA, N.; OHYA, S. Cross-resistance to meropenem, cepheems and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 1847–1851, 1992.

MC BAIN, A.J.; BARTOLO, R.G.; CATRENICH, C.E. et al. Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 655–664, 2003.

MCCAMMON, M.T.; GILLETTE, J.S.; THOMAS, D.P. et al. Detection by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of *pncA* Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from the United States-Mexico Border Region. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2210-2217, 2005.

MEIRELLES-PEREIRA, F.; PEREIRA, A.M.S.; SILVA, M.C.G. et al. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to humans infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 287-293, 2002.

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.; GALES, A.C. Metallo-Beta-Lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MENDES, R.E.; KIYOTA, K.A.; MONTEIRO, J. et al. Rapid detection and identification of Metallo- β -Lactamases-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 544-547, 2007.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727-737, 1999.

MOUNEIMNÈ, H.; ROBERT, J.; JARLIER, V. et al. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 62–66, 1999.

MURAMATSU, H.; HORII, T.; MORITA, M. et al. Effect of basic amino acids on susceptibility to carbapenems in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, p. 194–197, 2003.

MURATA, T.; GOTOH, N.; NISHINO, T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, p. 57-63, 2002.

MURPHY, T.A.; SIMM, A.M.; TOLEMAN, M.A. et al. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from

Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 582-587, 2003.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127–141, 1998.

NAKAJIMA, A.; SUGIMOTO, Y.; YONEYAMA, H. et al. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 6, p. 391-395, 2002.

NEWBURY, S.F.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C. et al. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell**, v. 48, p. 297-310, 1987.

NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. The impact grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 152– 162, 2003.

NORDMANN, P.; GUIBERT, M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 128-31, 1998.

OLIVE, D.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

OLIVER, A.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1641–1650, 2002.

OLIVER, A.; CANTON, R.; CAMPO, P. et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. **Science**, v. 288, p. 1251–1254, 2000.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 71-78, 1994.

PAI, H.; KIM, J.W.; KIM, J. et al. Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 480-48, 2001.

PALLERONI, N.J. Family I. *Pseudomonadaceae*. In Krieg, N.R.; Holt, J.G.; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.1, p.141-219. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.

PALLERONI, N.J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R. et al. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, p. 333-339, 1973.

PASTERAN, F.; FACCONI, D.; PETRONI, A. et al. Novel variant (bla_{VIM-11}) of the metallo-β-lactamase bla_{VIM} family in a GES-1 Extended-spectrum-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 474-475, 2005.

PELEG, A.Y.; FRANKLIN, C.; BELL, J.M. Dissemination of the metallo-β-lactamase gene bla_{IMP-4} among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 49, p. 4485-4491, 2005.

POIREL, L.; MAGALHÃES, M.; LOPES, M. et al. Molecular Analysis of Metallo-β-Lactamase Gene bla_{SPM-1}-Surrounding Sequences from Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1406-1406, 2004.

POIREL, L.; NAAS, D.; NICOLAS, D. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and its plasmid and integron-born gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 891-897, 2000.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G.F.; NAAS, T. et al. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2598-603, 2001.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 56, p. 20-51, 2005.

POOLE, K.; KREBES, K.; MCNALLY, C. et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **The Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7363-7372. 1993.

POOLE, K.; TETRO, K.; ZHAO, Q. et al. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2021-2028, 1996.

- PRADO, T.; PEREIRA, W.C.; SILVA, D.M. et al. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge os a hospital sewage tretament plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 136-141, 2008.
- QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J. et al. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agentsa nd Chemoterapy**, v. 50, p. 1633-1641, 2006.
- QUINTERA, S.; FERREIRA, H.; PEIXE, L. First isolation of bla_{VIM-2} in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2140-2141, 2005.
- QUINTERA, S.; PEIXE, L. Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3743-3745, 2006.
- RADMAN, M.; TADDEI, F.; MATIC, I. Evolution-driving genes. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 91–95, 2000.
- RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 223-232, 1997.
- RATJEN, F.; DÖRING, G. Cystic fibrosis. **The Lancet** , v. 361, p. 681–689, 2003.
- REINTHALER, F.F.; POSCH, J.; FEIERL, G. et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. **Water Research**, v. 37, p. 1685-1690, 2003.
- ROSSOLINI, G.M.; FRANCESCHINI, N.; RICCIO, M.L. et al. Characterization and sequece of the *Cryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: A new molecular class B β -lactamase showing a broad substrate profile. **Biochemistry Journal**, v. 332, p. 145-152, 1998.
- SAAVEDRA, M.J.; PEIXE, L.; SOUSA, J.C. et al. SFH-1, a subclass B2 metallo- β -lactamase from *Serratia fonticola* environmental isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2330-2333, 2003.
- SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal and Infectious Diseases**, v. 5, p. 200-214, 2001.
- SCHNEIDER, I.; KEULEYAN, E.; RASSHOFER, R. et al. VIM-15 and VIM-16, Two New VIM-2-Like Metallo- β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*

Isolates from Bulgaria and Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2977-2979, 2008.

SEKIGUCHI, H.; WATANABE, M.; NAKAHARA, T. et al. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5142– 5150, 2002.

SEKIGUCHI, J.; MORITA, K.; KITAO, T. et al. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194-4197, 2008.

SHIBATA, N.; DOI, Y.; YAMANE, K. et al. PCR Typing of genetics determinats for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the Class 3 Integron. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5407-5413, 2003.

SHYAMALA, V.; SCHNEIDER, E.; AMES, G.F.L. Tandem chromosomal duplications: role of REP sequences in the recombination event at the joint-point. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 3, p. 939-946, 1990.

SILBERT, S.; PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 847-851, 2004.

SIMM, A.M.; HIGGINS, C.S.; PULLAN, S.T. et al. A novel metallo- β -lactamase, Mbl1b, produced by environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. **FEBS Letters**, v. 509, p. 350-354, 2001.

SIMPSON, D.A.; RAMPHAL, R.; LORY, S. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* adherence: distinct genetic loci control attachment to epithelial cells and mucins. **Infectious Immunology**, v. 60, p. 3771-3779, 1992.

SINGH, A.; GOERING, R.V.; SIMJEE, S; et al. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SPENCER, J.; CLARKE, A.R.; WALSH, T.R. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic β -lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo- β -lactamase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 33638-33644, 2001.

STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J.; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 159-271, 1966.

STOCZKO, M.; FRÈRE, J.M.; ROSSOLINI, G.M. et al. Functional Diversity among Metallo- β -Lactamases: Characterization of the CAR-1 Enzyme of

Erwinia carotovora. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2473–2479, 2008.

TENNSTEDT, T. ; SZCZEPANOWSKI, R. ; BRAUN, S. et al. Occurrence of integron associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 239-252, 2003.

THOMPSON, J.S.; MALAMY, M.H. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* β -lactamase II. **The Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 2584-2593, 1990.

TOLEMAN, M.A.; ROLSTON, K.; JONES, R.N. et al. bla_{VIM-7}, an evolutionary distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 329-332, 2004.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 37, p. 673-679, 1996.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 50, p. 673-679, 2002.

TSAKRIS, A.; POURNARAS, S.; WOODFORD, N. et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1290-1292, 2000.

TUMÉO, E.; GBAGUIDI-HAORE, H.; PATRY, I. et al. Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, p. 200–204, 2008.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F.J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Methods in Cellular and Molecular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; OLIVERA, M.R. et al. First detection of metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 226-229, 2006.

WALSH, T.R.; BOLMSTRÖM, A.; OWÄRNSTROM, A. et al. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2755-2759, 2002.

WALSH, T.R.; NEVILLE, W.A.; HARAN, M.H. et al. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo- β -lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 436-439, 1998.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 306-325, 2005.

WANG, H.; GUO, P.; SUN, H. et al. Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 4022-4028, 2007.

YAMAMOTO, S.; KASAI, H.; ARNOLD, D.A. et al. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. **Microbiology**, v. 146, p. 2385-2394, 2000.

YAN, J.J.; HSUEH, P.R.; KO, W.C. et al. Metallo- β -Lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1343-1348, 2001.

YANG, Y.; AMES, G.F.L. DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 85, p. 8850-8854, 1988.

YANO, H.; KUGA, A.; OKAMOTO, R. et al. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1343-1348, 2001.

YONG D. A novel subgroup metallo-beta-lactamase, NDM-1 emerges in *Klebsiella pneumoniae* from India. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy - ICAAC (Abstract C1-105), 2008.

ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; GONÇALVES, A.L.S. et al. The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 387-392, 2006.

ZHANEL, G.G.; HOBAN, D.J.; SCHUREK, K. et al. Role of efflux mechanisms on fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 529-535, 2004.

VITA

Dados pessoais

Nome: Daiane Bopp Fuentefria

Nascimento: 06/06/ 1979, Passo Fundo, RS, Brasil

Filiação: Sérgio Roberto Riccardi Fuentefria

Véra Regina Bopp Fuentefria

Email: dfuente@tpo.com.br

Formação Acadêmica / Titulação

2005 - 2009 Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

2002 – 2004 Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

1997 – 2001 Graduação em Farmácia Farmacêutico Bioquímico
Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brasil.

1994 – 1996 Ensino Médio (2º grau).
Colégio Nossa Senhora da Conceição, Passo Fundo, RS, Brasil

Atuação profissional

2007 Colaborador da Disciplina de Marcadores Moleculares no estudo de Microrganismos (MAA00120) do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Professor da disciplina: Gertrudes Corção

2006 Colaborador da Disciplina de Marcadores Moleculares no estudo de Microrganismos (MAA00120) do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Professor da disciplina: Gertrudes Corção

2005 Colaborador da Disciplina de Marcadores Moleculares no estudo de Microrganismos (MAA00120) do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Professor da disciplina: Gertrudes Corção

2004 - 2005 Farmacêutica Bioquímica – Laboratório de Análises Clínicas, Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, Brasil.

2001 - 2001 Estágio Curricular em Laboratório de Análises Clínicas, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, Brasil.

São Lucas (HSL), consistindo de um ponto de esgoto hospitalar (Ponto X). Os isolados de *P. aeruginosa* deste estudo foram designados pela letra correspondente ao ponto de coleta e numerados consecutivamente com numeração arábica.

Foram analisados, 614 isolados de *P. aeruginosa*, sendo 198 do Ambiente I, 198 do Ambiente II, 89 do Hospital I, 60 do Hospital II e 69 do Hospital III. Não foram encontrados isolados de *P. aeruginosa* no Ponto A do Ambiente I em nenhuma das duas coletas realizadas. O Ponto A fica próximo à nascente do rio Passo Fundo e não recebe contribuição do esgoto da cidade de Passo Fundo, portanto é um ponto não impactado, o que pode justificar a ausência de isolados de *P. aeruginosa* nas amostras de água superficial coletadas.

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou 45 perfis de resistência diferentes entre os 614 isolados de *P. aeruginosa* deste estudo (Tabela 1), dentre estes perfis de resistência encontrados, somente 12 foram comuns a mais de um ambiente ou esgoto hospitalar, os demais foram característicos de uma única origem, mostrando que o perfil de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* está associado à origem da amostra. Em geral, os índices de resistência, e até de multirresistência, observados em isolados clínicos de *P. aeruginosa* são bastante elevados (Zavascki, et al. 2006; Gaspareto et al. 2007). No presente estudo, os isolados dos Ambientes I e II apresentaram índices de susceptibilidade de 64,1% e 85,3%, respectivamente, mostrando que mais da metade dos isolados foi sensível a todos os antimicrobianos testados, não esquecendo que nesses dois ambientes existem

pontos de água superficial com os índices de susceptibilidade mais elevados. Os Hospitais I, II e III apresentaram, respectivamente, susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados em 66,3 %, 66,6 % e 78,3 % dos isolados. Os dados de multirresistência entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* são elevados, em torno de 79,0 % (Amadi et al., 2009). Considerando isolados resistentes à pelo menos quatro classes de antimicrobianos como multirresistentes, os índices de multirresistência observados entre os isolados de *P. aeruginosa* do presente estudo foram baixos, muito inferiores aos observados entre isolados clínicos (Gaspareto et al. 2007). No Ambiente I, 17,6 % (n=35/198) dos isolados foram multirresistentes e no Ambiente II este índice foi de 3,03 % (n=6/198), não tendo sido observado o fenótipo de multirresistência entre isolados de água superficial. Já entre os isolados de esgoto hospitalar, os índices de multirresistência foram de 32,6 % (n= 29/89), 5,0 % (n=3/60) e 10,0 % (n=7/69) para os Hospitais I, II e III, respectivamente. Entretanto, apesar do baixo índice de multirresistência encontrado entre os isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar, bactérias resistentes, mesmo em pequena quantidade, podem encontrar condições favoráveis para tornarem-se predominantes em ambientes contaminados por antimicrobianos, como o esgoto hospitalar, alterando, assim, a composição original das comunidades microbianas e contribuindo para a disseminação da resistência bacteriana (Guardabassi et al., 1998).

Tabela 1 – Perfis de Resistência encontrados entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de esgoto hospitalar e água superficial dos Ambientes I e II e Hospitais I, II e III (n=614).

N° do Perfil	Resistência	Número de isolados				
		Ambiente I (n=198)	Ambiente II (n=198)	Hospital I (n=89)	Hospital II (n=60)	Hospital III (n=69)
1*	Sensível a todos antimicrobianos testados	127	169	59	40	54
2*	Imp	27	3	0	0	0
3	Imp Mer	2	0	0	1	0
4	Gen Cip Ami Ppt Tic Imp Cpm Atm	1	0	0	0	0
5	Gen Ami Ppt Tic Mer Pol	0	0	0	0	0
6	Gen Cip Caz Tic Imp Cpm Atm	2	0	0	0	0
7	Gen Cip Caz Tic Imp Cpm	4	0	0	0	0
8	Gen Cip Caz Tic Imp	1	0	0	0	0
9	Gen Cip Caz Tic Imp Atm	1	0	0	0	0
10	Gen Cip Imp Cpm	1	0	0	0	0
11	Gen Cip Caz Tic Imp Cpm	1	0	0	0	0
12	Gen Cip Caz Tic Cpm	2	0	0	0	0
13*	Gen Cip Ami Tic	1	0	0	0	1
14	Gen Cip Ami Tic Imp Mer Cpm	18	0	0	0	0
15	Gen Cip Ami Ppt Tic Imp Mer Cpm	1	0	0	0	0
16	Gen Cip Ami Tic Imp Mer	1	0	0	0	0
17	Gen Cip Ami Imp Mer	1	0	0	0	0
18	Ppt	1	0	0	0	0
19	Tic Imp Mer Cpm	1	0	0	0	0
20*	Mer	4	0	0	2	0
21	Tic Imp Mer Cpm Atm	1	0	0	0	0
22*	Cip Ami	0	1	0	1	0
23*	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer Cpm	0	3	4	0	0
24*	Gen Cip Ami Caz Ppt Tic Imp Mer Cpm	0	2	3	0	0
25	Cip	0	1	0	0	0
26*	Gen	0	8	0	1	0
27*	Gen Tic	0	8	0	0	1
28	Tic	0	1	0	0	0
29*	Gen Cip Ami Caz Tic Imp Mer	0	1	9	0	0
30	Gen Cip Ami Caz Ppt Imp Mer Cpm	0	0	13	0	0
31	Gen Ami	0	0	1	0	0
32*	Gen,Tic Cpm	0	0	0	1	7
33	Atm	0	0	0	0	1
34	Gen Cip Ami Caz Imp Mer Cpm	0	0	0	0	1
35	Gen Ami Imp	0	0	0	0	1
36	Gen Imp	0	0	0	0	1
37*	Ami	0	0	0	2	1
38	Gen Cip Caz Imp Mer Cpm	0	0	0	0	1
39	Ami Imp	0	0	0	1	0
40	Cpm	0	0	0	1	0
41	Gen Cip	0	0	0	7	0
42	Caz	0	0	0	1	0
43	Gen Cip Ami Ppt Imp Mer	0	0	0	1	0
44	Caz Ppt	0	0	0	1	0
45	Gen Ami Cpm Atm	0	1	0	0	0

*, perfis comuns a mais de uma origem; Gen, gentamicina; Imp, imipenem; Mer, meropenem; Cip, ciprofloxacina; Caz, ceftazidima; Tic, ticarcilina/clavulanato; Cpm, cefepime; Ami, amicacina; Ppt, piperacilina/tazobactam; Atm, aztreonam.

O tipo de resistência observado também variou entre os diferentes ambientes estudados. No Ambiente I, foi observada susceptibilidade reduzida principalmente a imipenem, meropenem, cefepime, ticarcilina/clavulanato, gentamicina e ciprofloxacina; ocorrendo principalmente entre os isolados de esgoto hospitalar, uma vez que os isolados de *P. aeruginosa* do Rio Passo Fundo foram, na sua maioria, sensíveis a todos os antimicrobianos testados. No Ambiente II, os índices de resistência foram inferiores e foi observada susceptibilidade reduzida principalmente a gentamicina e ticarcilina/clavulanato. No Hospital I foram encontrados os maiores índices de susceptibilidade reduzida do presente estudo para a gentamicina, ciprofloxacina, amicacina, ceftazidima, imipenem, meropenem e cefepime; enquanto que no Hospital II, para a amicacina, meropenem e aztreonam, e no Hospital III, para amicacina, gentamicina, cefepime e ticarcilina/clavulanato. Independente do tipo de resistência observado, os perfis de resistência encontrados entre esses isolados incluem a maioria dos antimicrobianos utilizados atualmente para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* em seres humanos, o que nos leva a crer que a origem dos isolados resistentes encontrados no esgoto hospitalar seja o próprio ambiente hospitalar e que, provavelmente, os diferentes hospitais estudados adotam diferentes esquemas terapêuticos, os quais resultaram em diferentes padrões de resistência encontrados nos isolados de *P. aeruginosa* dos respectivos esgotos hospitalares. Além disso, os tipos de resistência observados entre os isolados de *P. aeruginosa* deste estudo são comumente observados entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*, mais um indício da origem dos isolados

resistentes encontrados nas amostras de esgoto hospitalar (Pai et al., 2001; Nakajima et al., 2002; Poole, 2005; Jiang et al., 2006).

As taxas de MBLs relatadas entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* de hospitais de Porto Alegre e Passo Fundo são freqüentemente elevadas e o gene *bla*_{SPM-1} é o mais comum (Zavascki et al., 2006; Gaspareto et al., 2007; Gräf et al., 2008). A ocorrência do gene *bla*_{SPM-1} entre os isolados de *P. aeruginosa* das amostras de esgoto hospitalar deste estudo foi em torno de 5,0 % e foi encontrada somente em isolados de três esgotos dos cinco hospitais estudados. O gene *bla*_{SPM-1} foi encontrado em quatro isolados de esgoto hospitalar do Ambiente I, cinco isolados de esgoto hospitalar do Ambiente II e 14 isolados do Hospital I. Outros genes de MBLs, ESBLs e OXAs pesquisados não foram detectados. Mesmo com essa baixa freqüência, esse achado revela a presença de isolados de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} em esgotos hospitalares e não descarta a possibilidade de constituírem uma forma de disseminação desse tipo de resistência, sem falar de outros mecanismos de resistência que também podem estar presentes e são freqüentemente associados a plasmídeos e transposons. Todos os isolados de *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1} do presente estudo, com exceção do isolado F7, apresentaram fenótipo de multirresistência e somente dois isolados do Ambiente I apresentaram resistência a aztreonam. Não foi observada resistência a polimixina B entre os isolados com o gene *bla*_{SPM-1}. No teste de microdiluição em caldo para o imipenem, todos os isolados com gene *bla*_{SPM-1} apresentaram um valor de MIC \geq 16 μ g/mL, sendo que a maioria

apresentou valores de MIC \geq 256 $\mu\text{g/mL}$, confirmando o tipo de resistência encontrado.

A diversidade na seqüência dos genes *bla*_{SPM-1} encontrados foi avaliada pela DGGE, técnica que tem sido muito útil para avaliação de diversidade em diferentes genes de resistência (Chee-Sanford et al., 2001; McCammon et al., 2005). Henriques et al. (2006) avaliaram a diversidade em genes de β -lactamases de ambientes aquáticos através da DGGE-PCR e mostraram que a maioria das seqüências avaliadas é idêntica ou muito similar as seqüências de genes de β -lactamases de isolados clínicos. Chee-Sanford et al. (2001) estudaram, através da DGGE-PCR, os genes de resistência a tetraciclina de populações bacterianas de lagoas e águas subterrâneas de duas fazendas de suínos e observaram que os genes de resistência a tetraciclina dos isolados bacterianos de águas subterrâneas possuíam o gene *tetM*, que não era predominante no ambiente, e era idêntico ao gene *tetM* recuperado das lagoas, sugerindo que a disseminação, nesse caso, não está limitada a cepas de origem gastrointestinal.

O gene de metalo β -lactamase *bla*_{SPM-1} apresenta uma única variante alélica descrita até hoje, sendo a mesma encontrada em isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa*, indicando uma origem comum (Toleman et al., 1996; Fuentesfria et al., 2008b). Os resultados da DGGE-PCR do gene *bla*_{SPM-1} dos isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar do presente estudo indicam que os fragmentos amplificados apresentam a mesma seqüência de nucleotídeos por apresentarem a mesma mobilidade eletroforética em géis de 8% de poliacrilamida com gradiente de desnaturação

de 15-50%. Além disso, o seqüenciamento do fragmento de PCR amplificado para pesquisa do gene *bla*_{SPM-1}, embora seja outra região, mostrou tratar-se da mesma seqüência de nucleotídeos, com 100% de similaridade com a seqüência de *Pseudomonas aeruginosa* DQ145284 (Fuentefria et al., 2008b) contribuindo para os resultados encontrados com a DGGE.

A tipificação dos isolados pela ERIC-PCR foi realizada com dois objetivos principais: avaliar se isolados de *P. aeruginosa* do esgoto hospitalar apresentam similaridade genética com isolados recuperados de amostras de água superficial, nas quais o respectivo esgoto é descartado (Ambientes I e II) e se há relação genética entre isolados de *P. aeruginosa* oriundos de amostras de esgoto hospitalar de diferentes hospitais (Hospitais I, II e III).

A tipificação por ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* dos Ambientes I e II mostrou grande diversidade, indicando múltiplas origens dos isolados. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de diferentes pontos de coleta de esgoto hospitalar nos Ambientes I e II, indicando que uma disseminação clonal está ocorrendo somente entre cepas de um mesmo ponto de coleta. A presença de isolados geneticamente idênticos em um mesmo ponto de coleta, amostrados em diferentes ocasiões é indício de que cepas estão persistindo ou sendo continuamente lançadas no esgoto hospitalar. Com o mesmo enfoque, Tuméo et al. (2008) não puderam relacionar geneticamente isolados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes com isolados de *P. aeruginosa* de amostras de esgoto hospitalar. No presente estudo, a análise de grupamentos pela ERIC-PCR indicou que outras fontes, que não os esgotos hospitalares em questão podem estar contribuindo para a

presença de *P. aeruginosa* nas amostras de água superficial estudadas ou, que estas amostras estejam muito diluídas e os isolados não possam ser detectados. Os isolados de *P. aeruginosa* de amostras de água superficial do Ambiente I (Pontos B e C) mostraram menor similaridade entre si, contribuindo para a hipótese de múltiplas origens desses isolados, pois sabe-se que o solo e a vegetação são grandes contribuintes para a presença de bactérias no ambiente aquático.

A tipificação por ERIC-PCR dos isolados de *P. aeruginosa* dos Hospitais I, II e III também mostrou alta diversidade, mesmo entre isolados de mesma origem. Estes dados sugerem que populações geneticamente distintas estão circulando nos ambientes hospitalares estudados e, conseqüentemente, populações também geneticamente distintas são recuperadas dos respectivos esgotos hospitalares. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de diferentes esgotos hospitalares, pelo contrário, a similaridade entre estes isolados foi baixa.

A PFGE foi realizada com 36 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes e/ou com o gene *bla*_{SPM-1}, provenientes de amostras de esgoto dos cinco hospitais estudados. Em estudos que utilizam esta metodologia para isolados clínicos de *P. aeruginosa*, é comum encontrar cepas com pouca ou nenhuma diversidade, revelando relação clonal entre eles (Agarwal et al., 2002; Freitas & Barth, 2002; Gales et al., 2003; Gales et al., 2004). No presente estudo, 15 perfis diferentes foram encontrados, mostrando alta diversidade.

A análise de agrupamentos pela PFGE não mostrou relação clonal entre isolados de diferentes esgotos hospitalares e, ao contrário, os grupos

foram formados de acordo com a origem dos isolados, indicando, novamente, que populações geneticamente distintas estão estabelecidas nos diferentes esgotos hospitalares e que, provavelmente, são provenientes dos respectivos ambientes hospitalares. Seis isolados de *P. aeruginosa* foram indistinguíveis pelas metodologias de ERIC-PCR e PFGE, indicando que estes isolados são realmente geneticamente relacionados. Além disso, alguns isolados que não puderam ser diferenciados pela PFGE, puderam ser diferenciados pela ERIC-PCR, comprovando o maior poder discriminatório desta metodologia encontrado neste estudo.

5. CONCLUSÕES

1. Isolados de *P. aeruginosa* foram recuperados de todos os pontos de coleta estudados, com exceção do Ponto A, próximo à nascente do Rio Passo Fundo.

2. Isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar apresentaram maiores índices de resistência do que isolados de água superficial e o fenótipo de multirresistência foi observado somente entre isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar, correspondendo a 32,6%, 5,0% e 10,0% para os Hospitais II, II e III, respectivamente.

3. O gene *bla*_{SPM-1} foi encontrado em quatro isolados de esgoto hospitalar do Ambiente I, cinco isolados de esgoto hospitalar do Ambiente II e 14 isolados do Hospital I, correspondendo a 3,7 % de todos os isolados analisados; a DGGE revelou que todos os fragmentos do gene *bla*_{SPM-1} amplificados apresentaram o mesmo padrão de migração, indicando uma mesma seqüência de nucleotídeos nos respectivos fragmentos.

4. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de esgoto hospitalar e água superficial através da ERIC-PCR e os

grupamentos foram formados de acordo com a origem dos isolados; os perfis de resistência aos antimicrobianos puderam ser relacionados aos perfis de ERIC-PCR encontrados nos isolados de *P. aeruginosa* dos Ambientes I e II.

5. Não foi observada relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de amostras de diferentes esgotos hospitalares, pois uma alta diversidade foi encontrada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AENDEKERK, S.; GHYSELS, B.; CORNELIS, P. et al. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2371-2381, 2002.

AGARWAL, G. ; KAPIL, A. ; KABRA, S.K. et al. Phenotypic & genotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis in India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 11, p. 73-81, 2002.

AMADI, E.S.; UZOARU, P.N.; ORJI, I. et al. Antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Enugu and Abakaliki, Nigeria. **The Internet Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, 2009.

AVISON, M. B.; HIGGINS, C. S.; VON HELDREICH, C. J. et al. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β -lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 413-419, 2001.

AVRAHAMI, S.; LIESACK, W.; CONRAD, R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 691–705, 2003.

BANO, N.; HOLLIBAUGH, J.T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 505–518, 2002.

BENNETT, P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 1-4, 1999.

BENZ, R.; HANCOCK, R.E. Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 646, n. 2, p. 298-308, 1981.

BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C. et al. VanA-Type *Enterococci* from Humans, Animals, and Food: Species Distribution, Population Structure, Tn1546 Typing and Location, and Virulence Determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3307-3319, 2007.

BOYD, A.; CHAKRABARTY, A.M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2355-2359, 1994.

BURTON, J.P.; CADIEUX, P.A.; REID, G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic Instillation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 97–101, 2003.

BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 32, p.1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G.A; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.1211-1233, 1995.

CAMPBELL, S.J.; DESHMUKH, H.S.; NELSON, C.L. et al. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 678-684, 2008.

CARVALHO, A.P.; ALBANO, R.M.; DE OLIVEIRA, D.N. et al. Characterization of an epidemic carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial and Drug Resistance**, v. 12, p. 103-108, 2006.

CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; WALSH, T.R.; GALES, A.C.; JONES, R.N. Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: Report from the sentry antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2344-2345, 2004a.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A; JONES, R.N. et al. Molecular characterization of a β -Lactamase Gene, bla_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4654-4661, 2004.

CHEE-SANFORD, J.C.; AMINOV, R.I.; KRAPAC, I.J. et al. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1494-1502, 2001.

COSTANZO, S.D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p. 218-223, 2005.

CRESPO, M. P.; WOODFORD, N.; SINCLAIR, A. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo- β -Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5094-5101, 2004.

CRUMP, B.C.; KLING, G.W.; BAHAR, M. et al. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2253– 2268, 2003.

DAI, Y.; GARCIA, D.O.; ADAMS, J. et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant

Pseudomonas aeruginosa isolated from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 852-856, 2007.

FREITAS, A.L.P.; BARTH, A.L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2002.

FUENTEFRIA, D.B.; FERREIRA, A.E.; GRÄF, T. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 470-473, 2008a.

FUENTEFRIA, D.B.; FERREIRA, A.E.; GRÄF, T. et al. Spread of Metallo- β -lactamases: Screening reveals the presence of a *bla*_{SPM-1} gene in hospital sewage in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2008b, in press.

GALES, A.C.; MENEZES, I.C.; SILBERT, S. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 699-702, 2003.

GALES, A.C.; TORRES, P.L.; VILARINHO, D.S.O. et al. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in an Intensive Care Unit of a Teaching Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 267-271, 2004.

GARZA-RAMOS, U.; MORFIN-OTERO, R.; SADER, H.S. et al. Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-15} in a Class 1 Integron, *In95*, from *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital in Mexico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2943-2946, 2008.

GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P. et al. Occurrence of *bla*_{SPM1} and *bla*_{IMP1} genes of metallo- β -lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.108-109, 2007.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A. Antipseudomonal antibiotics. 2001. **Medical Clinics of North America**, v. 85, n. 1, p.19-42, 2001.

GILLIGAN, P.H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 35-51, 1991.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 3941-3952, 1990.

GOÑI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C. et al. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 125-132, 2000.

GRÄF, T.; FUENTEFRIA, D.B.; CORÇÃO, G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas do sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 306-308, 2008.

GUARDABASSI, L.; PETERSEN, A.; OLSEN, J. et al. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3499-3502, 1998.

GUPTA, V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 2, p. 131-143, 2008.

GURTLER, V.; GARRIE, H.D.; MAYALL, B.C. Denaturing gradient gel electrophoretic multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3310– 3320, 2002.

HAMZEHPOUR, M.; PECHÀRE, J. C.; PLÉSIAT, P.; et al. OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2392–2396, 1995.

HENRIQUES, I.; MOURA, A.; ALVES, S.; SAAVEDRAZ, M.J. et al. Analysing diversity among β -lactamase encoding genes in Aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 418-429, 2006.

HERBERT, S.; HALVORSEN, D.S.; LEONG, T. et al. Large outbreak of infection and colonization with gram-negative pathogens carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP-4} at a 320-bed tertiary hospital in Australia. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 98-101, 2007.

HIGGINS, C.F.; AMES, G.F.L.; BARNES, W.M. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, v. 298, p. 760-762, 1982.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 825-834, 1991.

IVERSEN, A.; KÜHN, I.; FRANKLIN, A. et al. High Prevalence of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Swedish Sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2838-2842, 2002.

IYOBE, S.; KUSADOKORO, H.; OZAKI, J. et al. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 824-829, 2000.

IYOBE, S.; KUSADOKORO, H.; TAKAHASHI, A. et al. Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2023-2027, 2002.

JIANG, X.; ZHANG, Z.; LI, M. et al. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2990-2995, 2006.

KERSTERS, K.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M. et al. Recent changes in the classification of the Pseudomonads: an overview. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 465-477, 1996.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KOH, T.H.; WANG, G.C.Y.; SNG, L. IMP-1 and a Novel Metallo- β -Lactamase, VIM-6, in Fluorescent Pseudomonads Isolated in Singapore. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2334-2336, 2004.

KÖHLER, T.; KOK, M.; HAMZEHPUR, M.M. et al. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2288-2290, 1996.

KÖHLER, T.; MICHEA-HAMZEHPUR, M.; EPP, S.F. et al. Carbapenem Activities against *Pseudomonas aeruginosa*: Respective Contributions of OprD and Efflux Systems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 424-427, 1999.

LANG, A. B.; HORN, M. P.; IMBODEN, M. A. et al. Prophylaxis and therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. **Vaccine**, v. 22, p. 44-48, 2004.

LAING, C.; PEGG, C.; YAWNEY, D. et al. Rapid Determination of *Escherichia coli* O157:H7 Lineage Types and Molecular Subtypes by Using Comparative Genomic Fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6606-6615, 2008.

LARAKI, N.; FRANSCSCHINI, N.; ROSSOLINI, G.M. et al. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 902-906, 1999.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A. et al. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1584-1590, 1999.

LE THOMAS, I.; COUETDIC, G.; CLERMONT, O. et al. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 48, p. 553–555, 2001.

LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D. et al. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolate from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4485-4491, 2005.

LI, X.; MA, Z.D.; LIVERMORE, D.M. et al. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1742–1752, 1994.

LI, X.Z.; SRIKUMAR, R.; POOLE, K. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 399–403, 1998.

LI, X.Z.; BARRE, N.; POOLE, K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 885-93, 2000.

LIVERMORE, D.M. Role of β-lactamase and impermeability in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics and Chemotherapy**, v. 42, p. 257-63, 1989.

LIVERMORE, D.M. Interplay of Impermeability and Chromosomal 1B-Lactamase Activity in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 2046-2048, 1992.

LIVERMORE, D.M. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical and Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 634-40, 2002.

LUZZARO, F.; MANTENGOLI, E.; PERILLI, M. et al. Dynamics of a Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β-Lactamase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1865-1870, 2001.

MASUDA, N.; OHYA, S. Cross-resistance to meropenem, cepheems and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 1847–1851, 1992.

MC BAIN, A.J.; BARTOLO, R.G.; CATRENICH, C.E. et al. Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 655–664, 2003.

MCCAMMON, M.T.; GILLETTE, J.S.; THOMAS, D.P. et al. Detection by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of *pncA* Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from the United States-Mexico Border Region. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2210-2217, 2005.

MEIRELLES-PEREIRA, F.; PEREIRA, A.M.S.; SILVA, M.C.G. et al. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to humans infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 287-293, 2002.

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.; GALES, A.C. Metallo-Beta-Lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MENDES, R.E.; KIYOTA, K.A.; MONTEIRO, J. et al. Rapid detection and identification of Metallo- β -Lactamases-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 544-547, 2007.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727-737, 1999.

MOUNEIMNÈ, H.; ROBERT, J.; JARLIER, V. et al. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 62–66, 1999.

MURAMATSU, H.; HORII, T.; MORITA, M. et al. Effect of basic amino acids on susceptibility to carbapenems in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, p. 194–197, 2003.

MURATA, T.; GOTOH, N.; NISHINO, T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, p. 57-63, 2002.

MURPHY, T.A.; SIMM, A.M.; TOLEMAN, M.A. et al. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from

Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 582-587, 2003.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127–141, 1998.

NAKAJIMA, A.; SUGIMOTO, Y.; YONEYAMA, H. et al. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 6, p. 391-395, 2002.

NEWBURY, S.F.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C. et al. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell**, v. 48, p. 297-310, 1987.

NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. The impact grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 152– 162, 2003.

NORDMANN, P.; GUIBERT, M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 128-31, 1998.

OLIVE, D.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

OLIVER, A.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1641–1650, 2002.

OLIVER, A.; CANTON, R.; CAMPO, P. et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. **Science**, v. 288, p. 1251–1254, 2000.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 71-78, 1994.

PAI, H.; KIM, J.W.; KIM, J. et al. Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 480-48, 2001.

PALLERONI, N.J. Family I. *Pseudomonadaceae*. In Krieg, N.R.; Holt, J.G.; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.1, p.141-219. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.

PALLERONI, N.J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R. et al. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, p. 333-339, 1973.

PASTERAN, F.; FACCONI, D.; PETRONI, A. et al. Novel variant (bla_{VIM-11}) of the metallo-β-lactamase bla_{VIM} family in a GES-1 Extended-spectrum-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 474-475, 2005.

PELEG, A.Y.; FRANKLIN, C.; BELL, J.M. Dissemination of the metallo-β-lactamase gene bla_{IMP-4} among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 49, p. 4485-4491, 2005.

POIREL, L.; MAGALHÃES, M.; LOPES, M. et al. Molecular Analysis of Metallo-β-Lactamase Gene bla_{SPM-1}-Surrounding Sequences from Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1406-1406, 2004.

POIREL, L.; NAAS, D.; NICOLAS, D. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and its plasmid and integron-born gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 891-897, 2000.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G.F.; NAAS, T. et al. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2598-603, 2001.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 56, p. 20-51, 2005.

POOLE, K.; KREBES, K.; MCNALLY, C. et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **The Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7363-7372. 1993.

POOLE, K.; TETRO, K.; ZHAO, Q. et al. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2021-2028, 1996.

- PRADO, T.; PEREIRA, W.C.; SILVA, D.M. et al. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge as a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 136-141, 2008.
- QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J. et al. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1633-1641, 2006.
- QUINTERA, S.; FERREIRA, H.; PEIXE, L. First isolation of bla_{VIM-2} in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2140-2141, 2005.
- QUINTERA, S.; PEIXE, L. Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3743-3745, 2006.
- RADMAN, M.; TADDEI, F.; MATIC, I. Evolution-driving genes. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 91-95, 2000.
- RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 223-232, 1997.
- RATJEN, F.; DÖRING, G. Cystic fibrosis. **The Lancet**, v. 361, p. 681-689, 2003.
- REINTHALER, F.F.; POSCH, J.; FEIERL, G. et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. **Water Research**, v. 37, p. 1685-1690, 2003.
- ROSSOLINI, G.M.; FRANCESCHINI, N.; RICCIO, M.L. et al. Characterization and sequence of the *Cryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: A new molecular class B β -lactamase showing a broad substrate profile. **Biochemistry Journal**, v. 332, p. 145-152, 1998.
- SAAVEDRA, M.J.; PEIXE, L.; SOUSA, J.C. et al. SFH-1, a subclass B2 metallo- β -lactamase from *Serratia fonticola* environmental isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2330-2333, 2003.
- SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal and Infectious Diseases**, v. 5, p. 200-214, 2001.
- SCHNEIDER, I.; KEULEYAN, E.; RASSHOFER, R. et al. VIM-15 and VIM-16, Two New VIM-2-Like Metallo- β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*

Isolates from Bulgaria and Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2977-2979, 2008.

SEKIGUCHI, H.; WATANABE, M.; NAKAHARA, T. et al. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5142– 5150, 2002.

SEKIGUCHI, J.; MORITA, K.; KITAO, T. et al. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194-4197, 2008.

SHIBATA, N.; DOI, Y.; YAMANE, K. et al. PCR Typing of genetics determinats for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the Class 3 Integron. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5407-5413, 2003.

SHYAMALA, V.; SCHNEIDER, E.; AMES, G.F.L. Tandem chromosomal duplications: role of REP sequences in the recombination event at the joint-point. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 3, p. 939-946, 1990.

SILBERT, S.; PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 847-851, 2004.

SIMM, A.M.; HIGGINS, C.S.; PULLAN, S.T. et al. A novel metallo- β -lactamase, Mbl1b, produced by environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. **FEBS Letters**, v. 509, p. 350-354, 2001.

SIMPSON, D.A.; RAMPHAL, R.; LORY, S. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* adherence: distinct genetic loci control attachment to epithelial cells and mucins. **Infectious Immunology**, v. 60, p. 3771-3779, 1992.

SINGH, A.; GOERING, R.V.; SIMJEE, S; et al. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SPENCER, J.; CLARKE, A.R.; WALSH, T.R. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic β -lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo- β -lactamase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 33638-33644, 2001.

STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J.; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 159-271, 1966.

STOCZKO, M.; FRÈRE, J.M.; ROSSOLINI, G.M. et al. Functional Diversity among Metallo- β -Lactamases: Characterization of the CAR-1 Enzyme of

Erwinia carotovora. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2473–2479, 2008.

TENNSTEDT, T. ; SZCZEPANOWSKI, R. ; BRAUN, S. et al. Occurrence of integron associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 239-252, 2003.

THOMPSON, J.S.; MALAMY, M.H. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* β -lactamase II. **The Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 2584-2593, 1990.

TOLEMAN, M.A.; ROLSTON, K.; JONES, R.N. et al. bla_{VIM-7}, an evolutionary distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 329-332, 2004.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 37, p. 673-679, 1996.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 50, p. 673-679, 2002.

TSAKRIS, A.; POURNARAS, S.; WOODFORD, N. et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1290-1292, 2000.

TUMÉO, E.; GBAGUIDI-HAORE, H.; PATRY, I. et al. Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, p. 200–204, 2008.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F.J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Methods in Cellular and Molecular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; OLIVERA, M.R. et al. First detection of metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 226-229, 2006.

WALSH, T.R.; BOLMSTRÖM, A.; OWÄRNSTROM, A. et al. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2755-2759, 2002.

WALSH, T.R.; NEVILLE, W.A.; HARAN, M.H. et al. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo- β -lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 436-439, 1998.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 306-325, 2005.

WANG, H.; GUO, P.; SUN, H. et al. Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 4022-4028, 2007.

YAMAMOTO, S.; KASAI, H.; ARNOLD, D.A. et al. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. **Microbiology**, v. 146, p. 2385-2394, 2000.

YAN, J.J.; HSUEH, P.R.; KO, W.C. et al. Metallo- β -Lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1343-1348, 2001.

YANG, Y.; AMES, G.F.L. DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 85, p. 8850-8854, 1988.

YANO, H.; KUGA, A.; OKAMOTO, R. et al. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1343-1348, 2001.

YONG D. A novel subgroup metallo-beta-lactamase, NDM-1 emerges in *Klebsiella pneumoniae* from India. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy - ICAAC (Abstract C1-105), 2008.

ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; GONÇALVES, A.L.S. et al. The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 387-392, 2006.

ZHANEL, G.G.; HOBAN, D.J.; SCHUREK, K. et al. Role of efflux mechanisms on fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 529-535, 2004.

VITA

Dados pessoais

Nome: Daiane Bopp Fuentefria

Nascimento: 06/06/ 1979, Passo Fundo, RS, Brasil

Filiação: Sérgio Roberto Riccardi Fuentefria

Véra Regina Bopp Fuentefria

Email: dfuente@tpo.com.br

Formação Acadêmica / Titulação

2005 - 2009 Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

2002 – 2004 Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

1997 – 2001 Graduação em Farmácia Farmacêutico Bioquímico
Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brasil.

1994 – 1996 Ensino Médio (2º grau).
Colégio Nossa Senhora da Conceição, Passo Fundo, RS, Brasil

Atuação profissional

2007 Colaborador da Disciplina de Marcadores Moleculares no estudo de Microrganismos (MAA00120) do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Professor da disciplina: Gertrudes Corção

2006 Colaborador da Disciplina de Marcadores Moleculares no estudo de Microrganismos (MAA00120) do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Professor da disciplina: Gertrudes Corção

2005 Colaborador da Disciplina de Marcadores Moleculares no estudo de Microrganismos (MAA00120) do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Professor da disciplina: Gertrudes Corção

2004 - 2005 Farmacêutica Bioquímica – Laboratório de Análises Clínicas, Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, Brasil.

2001 - 2001 Estágio Curricular em Laboratório de Análises Clínicas, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, Brasil.