

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

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Pseudomonas* spp ISOLADAS DE
EFLUENTE HOSPITALAR NÃO TRATADO: RESISTÊNCIA A BETA-
LACTÂMICOS E PRESENÇA DE INTEGRONS**

Aline Spindler
Biomédica – Centro Universitário FEEVALE

Porto Alegre, 2009

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

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Pseudomonas* spp ISOLADAS DE
EFLUENTE HOSPITALAR NÃO TRATADO: RESISTÊNCIA A BETA-
LACTÂMICOS E PRESENÇA DE INTEGRONS**

Aline Spindler
Biomédica – Centro Universitário FEEVALE

Dissertação apresentada como pré-requisito para a obtenção de grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Orientador: Prof^a Dr^a Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Abril, 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram e tornaram possível a realização deste trabalho. Em especial, gostaria de destacar:

Minha orientadora, Professora Doutora Gertrudes Corção, por ter me acompanhado com motivação e grande paciência durante as diversas fases deste mestrado. Agradeço à UFRGS, por ter contribuído de diversas formas para a minha formação profissional e acadêmica, incluindo também o corpo docente do PPGMAA, sempre instigando meu espírito científico. Aqui, gostaria de chamar a atenção para as Professoras Doutoras Marisa da Costa e Sueli Teresinha Van Der Sand, pela dedicação e por terem sempre procurado criar situações para a troca de experiências e desenvolvimento “da forma de pensar” de um pesquisador.

Agradeço minha mãe Janice Vergínia Beilner, meu pai Marco Antônio Spindler e meu irmão Fernando Spindler, cuja presença e apoio foram imprescindíveis, bem como o carinho de toda família, que sempre torceu muito pelo meu sucesso, me incentivando a superar os desafios encontrados pelo caminho. Agradeço a todos os amigos, que me apoiaram tanto nas horas de diversão, quanto nas horas em que necessitei de auxílio, em especial a Viviane Müller, Juliana Fernandes Lorenzoni, Paula Maria Santiago Caputo, Manoelle do Nascimento e André Roman Marinho.

Aos colegas de aula, mas também aos colegas de laboratório, sem os quais este trabalho não teria sido tão prazeroso de realizar. Em especial, às minhas estagiárias do coração Clarissa Branco Haas, Letícia Muner Otton e Lyvia Moreira de Oliveira

Agradeço também a Dr^a Ana Cristina Gales por ceder as cepas utilizadas como controle neste trabalho.

E finalmente, agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Pseudomonas* spp ISOLADAS DE EFLUENTE HOSPITALAR NÃO TRATADO: RESISTÊNCIA A BETA-LACTÂMICOS E PRESENÇA DE INTEGRONS¹.

Autor: Aline Spindler

Orientadora: Prof^a Dr^a Gertrudes Corção

RESUMO

O gênero *Pseudomonas*, amplamente distribuído no ambiente, está frequentemente associado a características de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos e presença de integrons. Os objetivos do presente trabalho foram verificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Pseudomonas* spp obtidos a partir do efluente hospitalar não tratado, bem como a presença de genes de resistência a beta-lactâmicos e integrons, nas diversas espécies encontradas. As amostras de efluente foram provenientes de quatro hospitais de Porto Alegre, RS. As colônias de bactérias não fermentadoras foram isoladas a partir de Agar Mac Conkey, e sua identificação foi confirmada utilizando PCR do 16S rRNA. A susceptibilidade dos isolados foi testada pela metodologia de difusão em ágar, sendo utilizados 11 antimicrobianos beta-lactâmicos. A pesquisa de genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{GES-like} e integrons foi realizada através de PCR. Foram obtidos 124 isolados, dentre eles 8 espécies diferentes, sendo que a mais freqüente foi *P. pseudoalcaligenes*. A taxa de resistência encontrada foi considerada alta, sendo que 62 (50%) dos isolados foram multi-resistentes. Nenhum isolado foi positivo para os genes pesquisados. Foram encontrados 68 isolados positivos para integron, destes, 52 foram identificados como pertencentes à classe 1. Não pode ser estabelecida a presença de integrons de classe 2 e 3. Efluente hospitalar não tratado pode servir como fonte de contaminação ambiental, pois implica no descarte de bactérias resistentes aos antimicrobianos e, no presente trabalho, positivas para integrons. As bactérias contendo este elemento de mobilidade genética podem contribuir para a disseminação de determinantes de resistência, bem como servir de reservatório em potencial para estes genes.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101p) Abril, 2009.

CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas* spp STRAINS ISOLATED FROM UNTREATED HOSPITAL EFFLUENTS: BETA-LACTAMS RESISTANCE AND PRESENCE OF INTEGRONS¹.

Author: Aline Spindler

Advisor: Gertrudes Corção

ABSTRACT

Pseudomonas genus, widely distributed in the environment, is often found associated to determinants of beta-lactams resistance and presence of integrons. The present study was conducted to investigate the resistance profile of *Pseudomonas* spp strains isolated from untreated hospital effluents, likewise beta-lactamase genes and integrons. Untreated hospital effluents were collected from four hospitals in Porto Alegre, RS. Non-fermenter bacteria were isolated; the identification was confirmed by 16S rRNA PCR. Susceptibility testing was determined by the disk-diffusion method using 11 different beta-lactams antimicrobials. The beta-lactamase genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like} and *bla*_{GES-like} genes and the integrons genes *intl1*, *intl2* and *intl3* were determined by PCR using specific primers. One hundred and twenty-eight isolates were recovered; the most common species was *P. pseudoalcaligenes*. The resistance level found was considered high, 62 (50%) isolates were multi-resistant. No isolate carrying the beta-lactamase genes tested was found among the strains. Of 68 isolates considered positives for integrons, 52 were identified as carrying the class 1 integron gene, *intl1*. No isolate carrying class 1 or class 2 integrons was found among the strains. Untreated hospital effluents could be a source of environmental contamination due to discharge of antimicrobial resistant bacteria, in the case of the present study, also integron positives. Bacteria carrying this genetic mobile element can contribute for the dissemination of resistance determinants and also act like a potential reservoir for many types of resistance genes.

¹Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (101p) April, 2009.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 13 |
| 2.1 Gênero <i>Pseudomonas</i> | 13 |
| 2.2 Resistência a beta-lactâmicos..... | 14 |
| 2.2.1 Beta-lactamases..... | 15 |
| 2.2.1.1 ESBLs, penicilinas e carbenicilinas | 16 |
| 2.2.1.2 MBLs..... | 19 |
| 2.2.1.3 Cefalosporinas cromossômicas e plasmidiais..... | 26 |
| 2.2.1.4 Oxacilinas (OXAs) | 28 |
| 2.2.2 Bombas de efluxo..... | 30 |
| 2.2.3 Porinas..... | 33 |
| 2.3 Leitura interpretada do antibiograma..... | 35 |
| 2.4 Contexto genético de genes de resistência | 38 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 44 |
| 3.1 Meios de cultura, soluções e equipamentos | 44 |
| 3.2 Coletas de amostras de efluente hospitalar não tratado, isolamento e identificação de isolados bacterianos..... | 44 |
| 3.2.1 Extração de DNA dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp..... | 46 |
| 3.2.2 Identificação do gênero bacteriano | 47 |
| 3.2.3 Identificação da espécie bacteriana..... | 48 |
| 3.2.4 Visualização dos produtos de PCR | 49 |
| 3.3 Susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos | 49 |
| 3.4 Leitura interpretada do perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados | 51 |
| 3.5 Amplificação de genes MBL pela reação de PCR..... | 51 |
| 3.6 Amplificação de genes OXA pela reação de PCR..... | 53 |
| 3.7 Amplificação de genes GES pela reação de PCR..... | 56 |
| 3.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ao imipenem..... | 57 |
| 3.9 Caracterização dos isolados quanto à presença de integrons | 58 |
| 3.9.1 Identificação dos integrons de classe 1 | 58 |
| 3.9.2 Clivagem com endonuclease de restrição do produto de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores hep35 e hep 36 | 59 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 4.1 Distribuição de espécies de <i>Pseudomonas</i> | 61 |
| 4.2 Susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados..... | 64 |
| 4.3 Leitura interpretada do perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados | 70 |
| 4.4 Amplificação de genes de resistência aos beta-lactâmicos | 73 |
| 4.5 Determinação da CIM ao imipenem | 74 |
| 4.6 Caracterização dos isolados quanto à presença de integrons | 76 |
| 4.6.1 Identificação dos integrons de classe 1 | 79 |
| 4.6.2 Clivagem com endonuclease de restrição do produto de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores hep35 e hep 36 | 81 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 82 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 84 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 86 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - Caracterização de quatro hospitais de Porto Alegre onde amostras de efluente foram coletadas no ano de 2007 | 45 |
| TABELA 2 - Agentes antimicrobianos testados nos antibiogramas, com respectiva concentração de discos e siglas | 50 |
| TABELA 3 - Divisão dos antimicrobianos testados, de acordo com as subclasses de beta-lactâmicos..... | 51 |
| TABELA 4 - Número e tamanho de fragmentos esperados com a digestão com endonuclease de restrição <i>RsaI</i> para classificação dos isolados quanto às classes de integrons..... | 60 |
| TABELA 5 - Porcentagem de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp sensíveis e com susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos testados | 65 |
| TABELA 6 – Perfis de susceptibilidade por isolados de <i>Pseudomonas</i> spp provenientes de efluente hospitalar não tratado | 66 |
| TABELA 7 - Distribuição de perfis de susceptibilidade distintos e ocorrência de isolados MDR entre as espécies de <i>Pseudomonas</i> spp isoladas de efluente hospitalar não tratado..... | 70 |
| TABELA 8 – Mecanismos de resistência deduzidos a partir de leitura interpretada do antibiograma em isolados de <i>Pseudomonas</i> sp obtidos a partir de efluentes hospitalares não tratados. | 71 |
| TABELA 9 – Concentração inibitória mínima de <i>Pseudomonas</i> sp, distribuídos de acordo com a espécie e presença de multi-resistência | 76 |

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentual
-: negativo
+: positivo
®: marca registrada
µg/mL: microgramas por mililitro
µg: microgramas
µL: microlitro
µm: micrômetro
µM: micromolar
ATCC: American Type Culture Collection
be: elementos de base
BHI: ágar cérebro-coração
CIM: concentração inibitória mínima
CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute
cm: centímetro
cm: centímetro
cm²: centímetro quadrado
CR: região comum
DNA: ácido desoxirribonucléico
EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético
ESBL: beta-lactamase de espectro ampliado
et al.: e colaboradores
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Kb: quilo base
MBL: metalo-beta-lactamase
MDR: multi-resistente
mg: miligramas
mL: mililitro
mM: milimolar
NaCl: cloreto de sódio

ng/ml: nanogramas por mililitro
nm: nanômetro
°C: graus Celsius
OF: oxidação-fermentação
OXA: oxacilinase
pb: pares de base
PCR: reação em cadeia da polimerase
pH: logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio
numa solução
RNA: ácido ribonucléico
RND: resistência-nodulação-divisão
rpm: rotações por minuto
rRNA: ácido ribonucléico ribossomal
RS: Rio Grande do Sul
sp: espécie
spp: espécies
TAE: Tris-Ácido Acético-EDTA
TBE: Tris-Ácido Bórico-EDTA
TE: Tris-EDTA
Tris: tris (hidroximetil) aminometano
TSA: ágar triptose de soja
TSB: caldo triptose de soja
U: unidade
ufc/ml: unidades formadoras de colônia por mililitro
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V/cm: volts por centímetro

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos tem causado preocupação aos órgãos de saúde pública em todo o mundo. O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos pode promover o aparecimento de bactérias resistentes, propiciando que genes de resistência sejam disseminados no meio ambiente.

Os hospitais, ambientes altamente seletivos, contribuem para o aumento de bactérias resistentes aos antimicrobianos e a frequência de genes de resistência. Estudos têm demonstrado que efluentes hospitalares não tratados contêm maiores quantidades de bactérias entéricas resistentes aos antimicrobianos em comparação aos efluentes derivados de outras fontes. A concentração de antimicrobianos neste ambiente já foi descrita como sendo superior, o que pode causar uma pressão seletiva no corpo d'água onde o efluente hospitalar não tratado é lançado.

A introdução dos antimicrobianos na clínica médica representou um grande avanço no tratamento de infecções bacterianas graves. Ao longo dos últimos anos, a resistência à praticamente todos os antimicrobianos disponíveis

para tratamento tem aumentado consideravelmente, sendo esta descrita em várias partes do mundo. Isso vem sendo observado principalmente em espécies não fermentadoras, tais como *Pseudomonas* spp.

Este gênero apresenta vários mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, sendo a produção de beta-lactamases o mais comum. Também tem sido observada a existência de resistência mediada por hiper-expressão de bombas de efluxo multi-drogas e perda ou diminuição de expressão de porinas. A resistência a beta-lactâmicos devido à produção de enzimas beta-lactamases é particularmente preocupante, uma vez que a maioria dos genes para produção destas enzimas reside em regiões móveis do DNA bacteriano, tornando-os transferíveis para outras bactérias.

Muitos genes de resistência aos antimicrobianos são encontrados em plasmídeos e em transposons de bactérias gram negativas, também podendo estar localizados em integrons. A maior parte dos genes para produção de beta-lactamases são encontrados como cassetes gênicos em integrons classe 1, embora alguns genes de resistência também possam ser encontrados em integrons pertencentes às classes 2 e 3.

O gênero *Pseudomonas* está amplamente distribuído no ambiente, sendo encontrado na água, no solo e eventualmente em alimentos. Possui a capacidade de permanecer viável em ambientes aquáticos por longos períodos, também apresentando habilidade de desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos. Por estas características, este gênero é ideal para o monitoramento da resistência aos antimicrobianos no ambiente. Apesar da maioria dos estudos darem ênfase a *Pseudomonas aeruginosa*, já foi

demonstrada a relevância de outras espécies pertencentes a este gênero, tendo em vista que também podem ser encontradas no ambiente e causar infecções em humanos, bem como carrear genes de resistência e integrons. Além de *P. aeruginosa*, destacam-se, dentre outras, as espécies *P. putida* e *P. fluorescens*, principalmente por estarem relacionadas a infecções oportunistas.

Até o momento, poucos estudos têm sido realizados sobre a resistência a beta-lactâmicos associada aos integrons na microbiota do efluente hospitalar não tratado. Neste efluente hospitalar não tratado, podem estar presentes microrganismos patogênicos, incluindo carreadores de genes de resistência, sendo capazes, por sua vez, ao servirem como reservatório destes genes, de transferir essa característica para outros microrganismos, podendo estes, por sua vez, tornarem-se causadores de infecção humana.

Por esta razão, este trabalho visou verificar a existência de bactérias não-fermentadoras, em específico as pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, no efluente hospitalar não tratado, relacionando a presença destas à resistência aos antimicrobianos e presença de integrons, tendo em vista o risco de disseminação destas bactérias no ambiente aquático. Este projeto tem como objetivos específicos: 1) Verificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de efluente hospitalar não tratado, nas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*; 2) Verificar a presença de genes de resistência a beta-lactâmicos nestes isolados e 3) Verificar a presença e diversidade das diferentes classes de integrons nestes isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Pseudomonas*

Pseudomonas é um gênero das gama-proteobactérias, pertencente à família das Pseudomonadaceae, tendo por características comuns: gram negativas; aeróbias estritas (atualmente algumas espécies já foram identificadas como sendo anaeróbias facultativas); em forma de bastonete; não formadoras de esporos e possuindo um ou mais flagelos polares para motilidade. Apesar de muitas espécies terem sido inicialmente classificadas neste gênero, a análise de seqüências de rRNA 16S re-classificou muitas delas em outros gêneros, principalmente *Burkholderia* e *Ralstonia* (Garrity, 1984; Anzai *et al.*, 2000).

Algumas características que costumam ser associadas às espécies de *Pseudomonas*, com algumas exceções, incluem a secreção de pioverdina ou compostos similares, como piocianina e piomelanina, que agem como sideróforos em condições de crescimento onde o ferro é um fator limitante. Também tipicamente são oxidase positivas, negativas para a formação de gás a partir de glicose; em sua maioria oxidam, mas não fermentam glicose a partir

da utilização do meio de cultura OF; são beta-hemolíticas em ágar sangue, negativas para indol e citrato positivas (Garrity, 1984).

As espécies deste gênero demonstram uma grande capacidade de diversidade metabólica, o que as torna capazes de colonizar uma variedade enorme de nichos. Sua capacidade de fácil cultivo em laboratório e a disponibilidade de diversas espécies com genoma inteiramente seqüenciado tornaram este gênero um grande alvo de estudos. Citando exemplos, observa-se estudos baseando-se no papel de *P. aeruginosa* como patógeno humano em infecções oportunistas, *P. syringae* como patógeno de plantas, *P. putida* e *P. mendocina* encontradas freqüentemente no solo e estando relacionadas a processos de biodegradação, e *P. fluorescens* principalmente pela sua característica de promover vantagens de crescimento em plantas (Palleroni, 2003).

Também relacionado à sua diversidade metabólica, está a capacidade de formação de biofilmes. Esses fatores, quando concomitantemente presentes, fornecem a habilidade de crescerem em uma variedade de ambientes inesperados, como sola interna de sapatos, resíduos de sabão, certos tipos de pomada, água utilizada para diálise, torneiras, cateteres, água mineral engarrafada, dentre outros (Madigan, 2005).

2.2 Resistência a beta-lactâmicos

A comunidade médica tem testemunhado uma epidemia crescente de infecções devido a bactérias gram negativas não-fermentadoras resistentes a diversas classes de antimicrobianos em diversos países do mundo. Por esta

razão, a prevalência e epidemiologia dessas bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos tem sido foco de diversos estudos de vigilância ao redor de todo o mundo (Chen & Wang, 2003).

O gênero *Pseudomonas* expressa resistência natural aos diversos antimicrobianos, também possuindo a capacidade de adquirir diversos mecanismos de resistência (Tuméo *et al.*, 2008). Além da resistência natural, a resistência adquirida em isolados pertencentes a este gênero é de grande importância clínica, uma vez que isto acarreta um aumento do custo do tratamento, duração da hospitalização e mortalidade. Muitas vezes, o acúmulo de determinantes de resistência resulta do fato de terapia antimicrobiana inicial inapropriada (Poole *et al.*, 2005).

A maior parte da resistência a beta-lactâmicos ocorre devido à presença de genes de beta-lactamases adquiridas ou cromossômicas, mas bombas de efluxo e diminuição da permeabilidade celular devido às porinas são também extremamente importantes no gênero *Pseudomonas*. Esses mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos não mediados por beta-lactamases, na maior parte das vezes, conferem uma resistência de nível baixo a moderado, mas de amplo espectro, incluindo as quinolonas além dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

2.2.1 Beta-lactamases

Um dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos é a síntese de beta-lactamases, as quais inativam os antimicrobianos beta-lactâmicos pela quebra do anel beta-lactâmico. Diferentes

tipos de beta-lactamases já foram descritas e inúmeras tentativas de estabelecer um sistema de classificação para estas enzimas foram propostas ao longo dos anos. Atualmente, duas classificações têm sido consideradas como de maior importância: a de Ambler e a de Bush-Jacoby-Medeiros, sendo a de Ambler a mais amplamente aceita e utilizada (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995).

A classificação de Ambler, utilizada neste estudo, foi proposta com base na estrutura molecular das beta-lactamases, de acordo com sua seqüência de aminoácidos. Somente quatro classes moleculares principais de beta-lactamases foram descritas: a) Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs), penicilinasas e carbenicilinasas; b) Metallo-beta-lactamases (MBLs); c) Cefalosporinasas cromossomais e plasmidiais e d) Oxacilinasas (Ambler, 1980).

Já a classificação de Bush foi a primeira a correlacionar o substrato preferencial e as propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima (Bush, 1989). Em 1995, uma atualização da classificação de Bush que combina características estruturais e funcionais das beta-lactamases foi proposta (Bush *et al.*, 1995).

2.2.1.1 ESBLs, penicilinasas e carbenicilinasas

As enzimas beta-lactamases deste grupo são bastante diversas e numerosas, em razão disso, aqui são relatadas as suas principais características, bem como os representantes mais expressivamente encontrados no gênero *Pseudomonas*. Estas enzimas são quase em sua

totalidade inibidas por ácido clavulânico e conferem resistência a pelo menos diversas cefalosporinas de amplo espectro, mas podendo ter uma atividade hidrolítica mais ampla, inclusive com o envolvimento da hidrólise de carbapenêmicos. Essas enzimas têm sido reportadas extensivamente em membros da família Enterobacteriaceae desde o início dos anos 80, mas nos últimos anos têm aumentado sua frequência, principalmente em isolados de *P. aeruginosa*. Estas enzimas podem ser do tipo TEM ou SHV, bem conhecidas na família Enterobacteriaceae; do tipo PER, a maior parte delas originária da região da Turquia; do tipo VEB, encontrada majoritariamente no sudeste da Ásia; e do tipo GES, esta já sendo encontrada em um maior número de locais. De um ponto de vista genético, são remotamente relacionadas, mas compartilham perfis hidrolíticos semelhantes e freqüentemente estão associadas à plasmídeos e integrons (Weldhagen *et al.*, 2003).

Em *P. aeruginosa*, a primeira ESBL da classe A de Ambler a ser caracterizada foi a enzima PER-1, proveniente da Turquia, sendo que até o momento já foi descrita em diversas outras partes da Europa. Uma enzima relacionada, PER-2, com 86% de homologia em nível de aminoácido, foi encontrada em isolados de *S. enterica* serovar Typhimurium na Argentina. Até o momento, os dois tipos de enzimas são restritos aos locais descritos acima, sendo que PER-2 ainda não foi descrita no gênero *Pseudomonas*. Existe relato de um isolado clínico de *P. aeruginosa* carregando em um plasmídeo, além da enzima PER-1, a MBL VIM-2, demonstrando que múltiplos fatores de resistência podem ser disseminados através do mesmo plasmídeo (Picão & Gales, 2007).

Já enzimas do tipo TEM (130 variantes descritas) e SHV (50 variantes descritas) foram inicialmente identificadas e amplamente estudadas em enterobactérias, sendo que o primeiro caso descrito envolvendo a bactéria não-fermentadora *P. aeruginosa* ocorreu em 1996. Até o momento, ambos os tipos são descritos com maior frequência na Europa, já tendo sido relacionadas a plasmídeos, o que as torna relevantes ao se considerar sua disseminação. Basicamente, conferem resistência a uma variedade ampla de cefalosporinas, sendo que algumas têm a capacidade de hidrolisar ceftazidima de forma mais eficiente do que cefotaxima (Jacoby & Munoz-Price, 2005).

A enzima GES, que também pertence a esse grupo de beta-lactamases, já foi isolada em *P. aeruginosa* e também é capaz de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro. Já foram descritas 11 variantes desta enzima até o momento, sendo que as variantes GES-2, -4, -5 e -6, além das cefalosporinas de amplo espectro, também possuem a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos (www.lahey.org/studies/other.asp; Picão & Gales, 2007). Já foram descritos isolados de *P. aeruginosa* produtoras de GES de variantes diferentes em vários locais da Europa, China e África do Sul. No Brasil, existe o relato de isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtoras de GES-1 e GES-5, esta última sendo uma das variantes que confere resistência aos carbapenêmicos (Picão & Gales, 2007).

Já a enzima VEB, inicialmente isolada em *E. coli*, também já foi descrita em *P. aeruginosa*, atualmente já existindo sete variantes relatadas (www.lahey.org/studies/other.asp). Essa enzima confere resistência a cefepime, cefotaxima, cefpiroma, cefpodoxima, ceftazidima, ceftriaxona e

cefuroxima, mas especialmente preocupante é sua alta capacidade de hidrólise da ceftazidima e do aztreonam (Bradford, 2001). Também infreqüente, as enzimas do tipo PER conferem resistência semelhante à VEB e também já foram relacionadas a isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Weldhagen *et al.*, 2003; Picão & Gales, 2007).

2.2.1.2 MBLs

O principal fator que distingue o grupo de MBLs é que estas enzimas são universalmente inibidas por EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético), bem como por outros agentes queladores de íons divalentes, como derivados de ésteres de tiol (ácidos mercaptoacético, mercaptocarboxílico, mercaptopropiônico e mercaptoetanol), p-clorometilbenzoato, metais pesados, como Hg(II), Fe(II), Fe(III), Cu(II), e ácido succínico (Bush *et al.*, 1995). Conferem resistência a virtualmente todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos, imipenem e meropenem (Mendes *et al.*, 2006).

Em meados de 1960, a primeira MBL foi descrita como sendo uma enzima dependente de zinco produzida por *Bacillus cereus*, um microrganismo não considerado como importante patógeno clínico (Lim *et al.*, 1988). Mas, desde o início de 1990, uma grande diversidade de novos genes que codificam MBLs tem sido descritos em patógenos clinicamente importantes, como os não fermentadores *P. aeruginosa*, *P. putida* e *Acinetobacter spp.*, e membros da família Enterobacteriaceae (Toleman *et al.*, 2002; Docquier *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). As MBLs podem ser divididas em dois grupos: 1) MBLs cromossômicas (codificadas por genes cromossômicos) e 2) MBLs adquiridas

(localizadas em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, integrons e transposons) (Walsh *et al.*, 2005).

Algumas bactérias freqüentemente isoladas do ambiente têm sido reportadas como possuidoras de genes para MBLs cromossômicas. Um argumento para a ocorrência ubíqua destes genes entre certas espécies é o de que por um período considerável de tempo, essas bactérias foram expostas aos antimicrobianos beta-lactâmicos ou a compostos semelhantes à beta-lactâmicos, sendo levadas a adquirir e manter esses genes e seus respectivos produtos. Outra hipótese propõe que estas enzimas seriam responsáveis por funções celulares normais, que ainda estariam por serem elucidadas. A despeito destas hipóteses, um grande número destes genes para produção de MBLs são induzíveis e a maioria das bactérias carreadoras destes genes são ou podem tornar-se altamente resistentes aos beta-lactâmicos. Felizmente, a maioria destes microrganismos são patógenos oportunistas e, com exceção de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus anthracis*, produtores da enzima L1, poucos são capazes de causar infecções sérias (Walsh *et al.*, 1994; Chen & Wang, 2003).

Primariamente, em razão do seqüenciamento genômico, um número maior de genes diferentes para produção de MBLs cromossômicas têm sido descobertos, mas usualmente são encontrados em bactérias ambientais. Dentre estes, podem ser citados: *B. cereus*, produtor da enzima BCII; *Aeromonas hydrophilia*, produtor da enzima CphA; *Myroides* spp, produtor das enzimas TUS-1 e MUS-1; *Flavobacterium johnsoniae*, produtor da enzima

JOHN-1, dentre outros (Lim *et al.*, 1988; Massidda *et al.*, 1991; Mammeri *et al.*, 2002; Naas *et al.*, 2003).

No outro grupo de MBLs, estão as MBLs adquiridas ou móveis. Estas foram assim denominadas pois a maior parte dos genes produtores de MBLs pertencentes a este grupo encontram-se inseridos em estruturas genéticas móveis, como plasmídeos, integrons ou transposons, que fornecem mobilidade ao gene, causando grande preocupação pelo risco de disseminação para outras cepas de mesma espécie, ou mesmo para outras espécies bacterianas (Walsh *et al.*, 2002).

Além desta característica, virtualmente toda MBL aparece em um microrganismo que produz pelo menos outra classe de beta-lactamase não relacionada (Rasmussen & Bush, 1997). Como exemplo, pode ser citado uma cepa clínica de *P. aeruginosa* isolada em Portugal, que produzia dois genes de resistência a aminoglicosídeos (*aacA4* e *aadA2*), uma carbenicilinase do grupo A (*bla_{P1b}*), além do gene para MBL do grupo B (*bla_{VIM-2}*) (Quinteira *et al.*, 2005).

Atualmente, são conhecidas cinco subclasses de MBLs adquiridas: IMP (imipenemase) (Osano *et al.*, 1994), VIM (Verona imipenemase) (Lauretti *et al.*, 1999), SPM (São Paulo metalo-beta-lactamase) (Toleman *et al.*, 2002), GIM (German imipenemase) (Castanheira *et al.*, 2004) e, mais recentemente, SIM-1 (Seoul imipenemase) (Lee *et al.*, 2005).

O estabelecimento de novas variantes dentro das subclasses das MBLs baseia-se principalmente em: diferença na seqüência de nucleotídeos, diferença na seqüência de aminoácidos, mudança na atividade de hidrólise de

certos antimicrobianos e localização do gene (cromossômica ou plasmidial). Muitas vezes é considerada uma combinação destes fatores e, em alguns casos, outras características são levadas em conta para a classificação (Walsh *et al.*, 2005).

Atualmente, já estão descritos 24 tipos de enzimas IMP (IMP-1 a IMP-24) e 22 do tipo VIM (VIM-1 a VIM-22), demonstrando um aumento na diversidade de MBLs nos últimos anos (www.lahey.org/studies/other.asp). No Brasil, existe a descrição de ocorrência de isolados de *P. aeruginosa* carregando genes das MBLs *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-16}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-2} (Mendes *et al.*, 2004; Zavascki *et al.*, 2005; Sader *et al.*, 2005; Marra *et al.*, 2006; Graf *et al.*, 2008).

Apesar de não haver no Brasil relatos de ocorrência de MBLs associadas a outras espécies do gênero *Pseudomonas* que não *P. aeruginosa*, já existem casos de *P. putida* produtora de IMP-12 na Itália (Docquier *et al.*, 2003), do tipo IMP-1 em Taiwan e Singapura (Yan *et al.*, 2001; Koh *et al.*, 2004), VIM-1 na Itália (Lombardi *et al.*, 2002), VIM-2 em Taiwan, Coreia e França (Yan *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2006); do tipo VIM-4 na Hungria (Libisch *et al.*, 2006), VIM-6 em Singapura (Koh *et al.*, 2004); *P. pseudoalcaligenes* produtora de VIM-2 em Portugal (Quinteira *et al.*, 2005); *Pseudomonas stutzeri* produtora de VIM-2 e IMP-1 em Taiwan (Yan *et al.*, 2001) e *Pseudomonas fluorescens* produtora de IMP-1 em Singapura (Koh *et al.*, 2004).

As variantes pertencentes à classe IMP parecem ser mais freqüentes na Ásia, sendo que, desde que a primeira enzima do tipo IMP foi descrita no Japão em 1988, enzimas idênticas ou semelhantes têm sido

encontradas em outras partes do mundo. Os genes para as enzimas do tipo IMP geralmente estão em cassetes gênicos em integrons das classes 1 e 3, tanto no cromossomo como em plasmídeos. Frequentemente, em adição a MBLs, podem ser encontrados no cassete gênico, genes de resistência aos compostos de amônio quaternário e biguanidinas e diversos genes conferindo resistência a aminoglicosídeos (Walsh *et al.*, 2005).

O segundo grupo dominante de MBLs adquiridas são as enzimas do tipo VIM, descritas pela primeira vez em Verona, Itália, em 1999, a partir de um isolado clínico de *P. aeruginosa* (Lauretti *et al.*, 1999). As variantes de VIM são encontradas tanto em microrganismos fermentadores quanto naqueles que não são fermentadores de glicose e são mais prevalentes na Europa. No entanto, variantes de VIM também já foram encontradas na Ásia, Estados Unidos da América, Chile, Brasil, Venezuela e Colômbia, dentre outros países, demonstrando a sua ocorrência mundial (Yan *et al.*, 2001; Yum *et al.*, 2002; Toleman *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004). Os genes para as enzimas do tipo VIM geralmente estão no mesmo contexto genético que as do tipo IMP, como descrito acima. Frequentemente, juntamente com a MBL, podem ser encontrados no cassete gênico genes de resistência a sulfonamidas e diversos genes conferindo resistência a aminoglicosídeos (Walsh *et al.*, 2005).

A terceira subclasse de MBL adquirida foi identificada em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* em São Paulo, em 1999, sendo denominada de SPM-1 (Toleman *et al.*, 2002). A seqüência de aminoácidos encontrada em SPM-1 difere significativamente daquelas encontradas tanto em enzimas do tipo IMP quanto do tipo VIM, em razão da presença de uma inserção de 24

aminoácidos logo após o sítio ativo da enzima. Essa inserção foi demonstrada como sendo bastante flexível, agindo como um “loop” e provavelmente aumentando a força de ligação e hidrólise dos beta-lactâmicos. O contexto genético de *bla*_{SPM-1} é único, pois este gene está associado a elementos comuns de certa região gênica, e não com transposons ou integrons. Esse contexto genético foi demonstrado como sendo semelhante a genes altamente relacionados à *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Interessantemente, *bla*_{SPM-1} e os genes que o cercam são parte de uma ilha de patogenicidade genômica móvel, sendo encontrados em um plasmídeo de aproximadamente 180 kb. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella* têm sido associadas com regiões móveis comuns e também com outros elementos móveis denominados de regiões SXT, sendo que estas são mobilizadas sob estresse bacteriano (Poirel *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2005).

O gene que codifica a proteína SPM-1 parece estar especificamente relacionado à *P. aeruginosa*, uma vez que, até o momento, não foi detectado em nenhum outro microrganismo, bem como sua ocorrência ainda é restrita ao Brasil (Mendes *et al.*, 2006).

Mais recentemente, a quarta subclasse de MBL adquirida, denominada GIM-1, foi identificada em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* isolada na Alemanha, em 2002. A seqüência de aminoácidos de GIM-1 demonstrou baixa identidade com outros genes de MBLs clinicamente significantes (Castanheira *et al.*, 2004). Demonstrou-se que GIM-1 contém dois motivos de ligação ao zinco, bem como um perfil hidrolítico similar àquele

encontrado para IMP-1, no entanto, GIM-1 é uma enzima notavelmente mais fraca, como demonstrado por Walsh *et al.* (2005).

Como na maioria dos genes de MBLs, *bla*_{GIM-1} está presente em um cassete gênico em integrons de classe 1, carregado em um plasmídeo. Juntamente com o gene *bla*_{GIM-1}, já foram encontrados também dois genes de resistência para aminoglicosídeos, um gene codificando uma oxacilinase e uma fusão de genes determinando resistência a compostos de amônio quaternário e sulfonamidas (Castanheira *et al.*, 2004).

A quinta e última subclasse de MBL, SIM-1, foi descoberta na Coréia, em 2003, a partir de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* (Lee *et al.*, 2005). Esta enzima possui 69% de identidade com IMP-12 e 64% de identidade com IMP-9, enquanto que a relação de identidade com outras MBLs é bastante divergente. O gene para esta enzima foi encontrado em um integron de classe 1, em um cassete gênico contendo também um gene de resistência para cloranfenicol e um gene de resistência para rifampicina, estes sendo raramente encontrados em integrons codificando para MBLs (Houang *et al.*, 2003). Foi sugerido por Lee *et al.* (2005), que este gene estaria no cromossomo, mas caracterizações adicionais são sugeridas pelo autor. Até o presente momento, a enzima SIM-1 é encontrada exclusivamente em cepas de *A. baumannii* na Coréia (Lee *et al.*, 2005).

Análises adicionais dos isolados brasileiros de *P. aeruginosa* demonstraram que o DNA na região à montante ao gene contém regiões comuns ou elementos CR, neste caso, CR4. Comparado a integrons e

transposons, pouco conhecimento se tem sobre elementos CR, particularmente a forma como eles facilitam a mobilização de genes (Poirel *et al.*, 2004).

Genes SPM-1 em *P. aeruginosa* provenientes de São Paulo também contêm essas regiões comuns, embora elas apresentem grande diferença quando comparadas aos isolados de Recife, sugerindo uma origem genética distinta. No presente momento, a região genética imediatamente ao redor do gene *bla*_{SPM-1} não está associada com a co-resistência a outros antimicrobianos (Walsh *et al.*, 2005).

A maioria dos genes codificando para as variantes do tipo IMP e VIM, bem como para GIM-1 e SIM-1, são encontrados em cassetes gênicos localizados em plasmídeo ou cromossomo bacteriano. Esses cassetes gênicos estão inseridos em integrons, sendo encontrados principalmente em integrons da classe 1, embora genes para MBLs do tipo IMP também possam ser encontrados em integrons da classe 3 (Walsh *et al.*, 2005).

2.2.1.3 Cefalosporinases cromossômicas e plasmidiais

Pertencem a este grupo as enzimas beta-lactamases do tipo AmpC, sendo elas cefalosporinases codificadas em genes cromossômicos, ou mais recentemente, identificados em genes plasmidiais. Existem mais de 20 tipos diferentes de beta-lactamases do tipo AmpC codificadas em genes plasmidiais. Algumas das que são codificadas por genes cromossomais são acompanhadas por genes regulatórios e são induzíveis. Ambas podem mediar resistência à cefalotina, cefazolina, cefoxitina, a maior parte das penicilinas, bem como combinações de beta-lactâmicos/inibidores de beta-lactamase, ou seja,

demonstram resistência à inibição por ácido clavulânico, um inibidor comercial de beta-lactamases. Como dito anteriormente, na maior parte das vezes, AmpC é induzível e pode ser expressa em altos níveis em caso de mutações. A hiperexpressão pode conferir resistência a cefalosporinas de amplo espectro, incluindo cefotaxima, ceftazidima, cefepime e ceftriaxona. Esse tipo de enzima pode se tornar problemático, uma vez que um isolado inicialmente susceptível a estes agentes pode tornar-se resistente após o início da terapia, através de sua indução (Livermore, 1995).

Plasmídeos transferíveis podem adquirir genes para enzimas do tipo AmpC, tornando possível o aparecimento desta resistência em bactérias que não possuem esta enzima ou mesmo em bactérias que as possuam, mas que expressam fracamente o gene cromossômico *bla*_{AmpC}. A resistência devido a AmpC plasmidial é menos freqüente do que a produção de ESBLs na maior parte do mundo, mas AmpC pode ser mais difícil de detectar, bem como conferir resistência a um espectro mais amplo de antimicrobianos do que as ESBLs. As enzimas AmpC codificadas por genes cromossômicos ou plasmidiais estão evoluindo para hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro de uma forma mais eficaz, sendo que isso e a dificuldade de diagnóstico são os aspectos mais preocupantes no aparecimento destas enzimas em isolados clínicos. O fato de serem de difícil diagnóstico laboratorial, pois normalmente não podem ser identificadas com testes laboratoriais de rotina, bem como sua dificuldade de identificação quando a presença de outro tipo de enzima é concomitante, também podem fazer com que a identificação deste tipo de resistência seja subestimada. Os antimicrobianos carbapenêmicos

normalmente são utilizados para tratar infecções causadas por bactérias produtoras de AmpC, mas a resistência aos carbapenêmicos, neste caso, pode surgir devido à ativação de bombas de efluxo ou pelo influxo diminuído (Jacoby, 2009).

Já foram descritos vários casos de cepas clínicas de *P. aeruginosa* com indução da enzima AmpC, apesar de não existirem relatos dessa enzima acarretando resistência aos antimicrobianos em outras espécies do gênero (Dunne & Hardin, 2005; Juan *et al.*, 2005; Wolter *et al.*, 2007). Outro fator preocupante é que o gene codificando este tipo de enzima de resistência pode estar presente em integrons, sendo que o contexto genético deste pode acarretar um risco de disseminação importante (Philippon *et al.*, 2002; Jacoby & Munoz-Price, 2005).

2.2.1.4 Oxacilinases (OXAs)

Beta-lactamases do tipo OXA são determinantes de resistência com uma importância clínica cada vez maior, devido à sua atividade em potencial contra carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro (este é o caso das enzimas do tipo OXA ESBLs, ou beta-lactamases de espectro ampliado). Também têm importância devido à sua baixa susceptibilidade geral a inibidores comerciais de beta-lactamases (ácido clavulânico) e a habilidade que alguns genes *bla*_{OXA} exibem em disseminar-se entre patógenos gram negativos importantes, como *P. aeruginosa*, através de integrons, transposons e plasmídeos conjugativos. Elas são um grupo de enzimas com resíduos de serina, estruturalmente relacionadas, que tipicamente demonstram-se

fracamente inibidas por ácido clavulânico, exibindo uma ótima atividade hidrolítica contra oxacilina e compostos relacionados (Walther-Rasmussen & Høiby, 2006).

Atualmente, existem 143 variantes desta enzima identificados a nível molecular, sendo que a maior parte delas são beta-lactamases de espectro estreito, geralmente conferindo resistência a aminopenicilinas (amoxicilina, ampicilina, mezlocilina e piperacilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) e cefalosporinas de primeira (cefalexina, cefalotina, cefazolina e cefradina) e segunda gerações (cefamandole, cefaclor e cefuroxima) (<http://www.lahey.org/studies/other.asp>). Cerca de 12 destas enzimas OXA são consideradas beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs), possuindo uma atividade de hidrólise ampliada para ceftazidima, e/ou cefotaxima, cefepime, cefpiroma e aztreonam. Elas são em sua maior parte mutantes pontuais derivativas, como por exemplo, OXA-15 (derivada de OXA-2) ou OXA-11, -13, -14, -15, -16, -17 e -19 (derivadas de OXA-10), com exceção de OXA-18. A atividade destas beta-lactamases com resíduos de serina não é inibida significativamente por inibidores comerciais de beta-lactamases, neste caso o ácido clavulânico, com exceção de OXA-18. Existem vários casos descritos de OXA ESBLs, sendo que a maior parte delas se restringe a isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Bradford, 2001). Entre as 143 descritas, tanto de espectro estreito quanto ESBLs, 45 delas também demonstram atividade hidrolítica contra carbapenêmicos (Queenan & Bush, 2007).

O contexto genético das enzimas OXA geralmente pode ser identificado pela presença de integrons, transposons ou plasmídeos. Também deve-se considerar o fato de que muitas destas enzimas estão presentes em cassetes gênicos de integrons, o que pode acarretar na disseminação de mais de um gene de resistência. Pode ser citado, como exemplo, um isolado clínico de *P. aeruginosa* carreando, além de OXA-46, o gene de MBL *bla*_{VIM-1} em um cassette gênico em integron de classe 1 (Giuliani *et al.*, 2005, Walther-Rasmussen & Høiby, 2006).

2.2.2 Bombas de efluxo

Os genes e proteínas das bombas de efluxo estão presentes tanto em bactérias resistentes aos antimicrobianos quanto em bactérias susceptíveis a estes. Alguns sistemas podem ser induzidos por seus substratos específicos, fazendo com que um isolado aparentemente susceptível hiper-produza uma bomba de efluxo, assim tornando-se resistente. Esta resistência aos antimicrobianos causada por um sistema de efluxo pode ocorrer devido a um desses mecanismos: hiper-expressão de bomba de efluxo ou se a proteína produzida contiver substituições de aminoácidos, fazendo com que esta se torne mais eficiente na exportação do substrato. Em qualquer um dos casos, a concentração intracelular do antimicrobiano servindo de substrato é diminuída, fazendo com que o microrganismo torne-se menos susceptível àquele agente antimicrobiano específico (Piddock, 2006).

As bombas de efluxo podem ter especificidade por um substrato ou podem transportar uma diversidade de compostos estruturalmente não

relacionados, incluindo antimicrobianos de classes diferentes. Normalmente este tipo de bomba de efluxo pode ser associado à multi-resistência aos antimicrobianos. Os membros da família RND (resistência-nodulação-divisão) são considerados os mais relevantes quando se trata da resistência em patógenos clinicamente relevantes. Em microrganismos gram negativos, este tipo de transportador trabalha como um conjunto de uma proteína de membrana periplasmática fusionada e uma proteína de membrana externa (Terán *et al.*, 2003).

As bombas de efluxo do tipo Mex pertencem à família RND e são cromossômicamente codificadas em quase sua totalidade. Em *P. aeruginosa* são particularmente interessantes neste contexto, pois têm uma ampla especificidade de substratos. Enquanto 12 sistemas de efluxo em potencial foram identificados no genoma desta bactéria, principalmente 4 deles (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM) são bem caracterizados quanto ao transporte de antimicrobianos (Mesaros *et al.*, 2007).

P. aeruginosa é freqüentemente considerada como resistente a vários antimicrobianos e, historicamente, isso era atribuído a uma baixa permeabilidade da membrana externa. Poole e colaboradores (1993) descreveram um operon de bomba de efluxo, MexAB-OprM, em *P. aeruginosa*; demonstrando que a deleção de certos componentes deste sistema conferia hiper-susceptibilidade para uma variedade de agentes antimicrobianos.

Assim como MexAB-OprM, o sistema MexXY-OprM é constitutivamente expresso em cepas selvagens, conferindo multi-resistência intrínseca, mas também podendo ser responsável por resistência adquirida ao

acumular mutações. Entretanto, MexCD-OprJ e MexEF-OprN são induzíveis por alguns de seus substratos contribuindo para a resistência adquirida, mas não para a resistência intrínseca deste patógeno aos antimicrobianos (Jeannot *et al.*, 2008).

Estudos com mutantes demonstraram que a superprodução de MexAB-OprM é capaz de exportar quinolonas, cloranfenicol, macrolídeos, tetraciclina, novobiocina e a maioria dos beta-lactâmicos, mas não o imipenem. Já estudos com mutantes que hiper-produzem MexCD-OprJ demonstraram que este sistema de efluxo pode exportar quinolonas, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e os beta-lactâmicos cefpiroma, ceftazidima e cefoperazona, mas não são capazes de exportar carbenicilina e aztreonam. Também já foi demonstrado que o sistema de efluxo MexXY-OprM pode exportar aminoglicosídeos, tetraciclina e eritromicina, contribuindo para a resistência intrínseca deste microrganismo a estes agentes antimicrobianos. Esta expressão não é observada em cepas selvagens, necessitando para sua indução concentrações sub-inibitórias de seus substratos (Masuda *et al.*, 2000).

Embora bombas de efluxo confirmam um nível de resistência de baixo a moderado, seu impacto no tratamento clínico pode ser de suma importância, visto que pode levar à ineficiência de antimicrobianos em sítios de infecção onde as concentrações do agente são menores do que a desejável. Esse sistema de bombas de efluxo também é muito importante, pois normalmente causam resistência cruzada aos antimicrobianos de classes não-relacionadas em bactérias gram negativas, além disso, pode ser difícil identificar a

resistência mediada pelas bombas de efluxo baseado somente em testes de susceptibilidade padrão (Mesaros *et al.*, 2007).

Esta variedade de bombas de efluxo da família RND, quando associadas à multi-resistência aos antimicrobianos devido ao seu efluxo, não têm sido associadas com outras espécies do gênero *Pseudomonas*. Apesar de já terem sido descritas relacionadas a elementos passíveis de disseminação, como por exemplo, plasmídeos e transposons, ainda não há relato de sua associação direta com integrons (Piddock, 2006).

2.2.3 Porinas

Porinas são responsáveis pela entrada de diversos substratos na célula bacteriana. No caso de *P. aeruginosa*, sabe-se que esta possui uma permeabilidade celular de membrana de 12 a 100 vezes menor a vários compostos quando comparada a *Escherichia coli*, uma característica central quando se leva em conta a resistência intrínseca aos antimicrobianos. Enquanto a característica de permeabilidade diminuída deste organismo torna-o capaz de resistir a diversos compostos nocivos de seu habitat, incluindo antibióticos produzidos por competidores em seu ambiente natural, ela é responsável por um problema em potencial quando se considera os isolados responsáveis por infecções, pois acarreta influxo em concentrações diminuídas de determinados compostos antimicrobianos sintéticos, de acordo com a porina em questão (Tamber *et al.*, 2006)

A principal porina expressa por bactérias do gênero *Pseudomonas* é a OprF, sendo que a maioria dos estudos publicados dão ênfase à

Pseudomonas aeruginosa. Sendo uma porina inespecífica, pode ser utilizada no transporte para o interior da célula de diversos substratos, incluindo alguns tipos de antimicrobianos. Está principalmente relacionada com a resistência intrínseca, pois fornece taxas de difusão diminuída destes compostos (Nikaido, 2003).

Em estudos realizados com *P. aeruginosa*, destacam-se entre as porinas específicas, ou seja, utilizadas especificamente por certos antimicrobianos, a porina OprD e OprE, relacionadas à resistência (Wang *et al.*, 2003). Destas, OprD é a mais relevante, sendo que sua perda ou expressão diminuída relaciona-se com desenvolvimento de resistência ao imipenem e sensibilidade diminuída ao meropenem, do grupo dos antimicrobianos carbapenêmicos. Esta resistência ou sensibilidade diminuída a estes antimicrobianos ocorre quando, durante o tratamento, surgem mutantes com déficit da produção deste tipo de proteína, ou mesmo perda de sua expressão, sendo que esta última não compromete a viabilidade celular, uma vez que este tipo de porina não é indispensável para a entrada da maioria dos nutrientes (Trias & Nikaido, 1990). A perda ou diminuição da expressão deste tipo de proteína já foi relacionada a surtos envolvendo cepas de *P. aeruginosa* multi-resistentes em diversos países, sendo que a ocorrência desta característica relacionada à resistência até o presente momento, se restringe à espécie *P. aeruginosa* (Gutierrez *et al.*, 2007; Henrichfreise *et al.*, 2007).

A porina OprE, apesar de ser homóloga à OprD, é específica para a entrada de cefalosporinas na célula bacteriana, sendo que os mutantes

deficientes desta proteína estão relacionados, desta forma, à resistência ou sensibilidade diminuída a este tipo de compostos (Yamano *et al.*, 1990).

Até o momento, o mecanismo de resistência em consequência de perda ou expressão diminuída de porinas não foi relacionado a integrons ou outros elementos de mobilidade genética.

2.3 Leitura interpretada do antibiograma

Os resultados de provas de susceptibilidade em bactérias são convencionalmente reportados e categorizados individualmente, como “sensível a esta droga”, “resistente a esta droga”, ou mesmo “intermediário a esta droga”. Esta estratégia não utiliza todo o potencial dos dados obtidos, pois ignora o fato de que a resistência aos antimicrobianos relacionados, freqüentemente, acontece devido a mecanismos de resistência únicos (Livermore *et al.*, 2004).

A leitura interpretada do antibiograma tem por objetivo analisar como um todo o perfil de susceptibilidade, não somente os resultados para os antimicrobianos de forma individual. Desta maneira, prevê ou mesmo direciona a identificação dos mecanismos de resistência existentes em cada caso analisado. Para que a leitura interpretada possa ser utilizada, é necessário que o isolado seja identificado corretamente até o nível de espécie, como também é necessária a utilização de um número amplo de antimicrobianos para que os mecanismos de resistência, possivelmente presentes, possam ser identificados. Esta prática já é realizada em muitos laboratórios clínicos do mundo, inclusive no Brasil (Moreno, 2002; Picão & Gales, 2007).

Uma das vantagens da leitura interpretada é o fato dela reconhecer perfis de resistência infreqüentes ou mesmo impossíveis para o microrganismo testado. Tanto na primeira hipótese quanto na segunda, é necessário repetir a identificação do microrganismo até o nível de espécie, bem como realizar novamente o antibiograma. Se ambos os resultados forem confirmados, existe a necessidade de enviar tais cepas para um laboratório de referência para que os dados sejam confirmados (Moreno, 2002). Caso o mecanismo de resistência em questão seja confirmado para este microrganismo específico, medidas cabíveis podem ser tomadas, como o relato da ocorrência deste microrganismo e seu perfil de resistência, para os órgãos responsáveis. Estes, então, podem fazer com que medidas de cautela ou mesmo estudos em relação ao novo mecanismo de resistência da bactéria em questão possam ser monitorados e as ações cabíveis para a realização do tratamento adequado sejam tomadas (Livermore *et al.*, 2004).

Existem também alguns casos em que reportar um resultado de “sensível” para uma determinada bactéria é anômalo, pois certas bactérias possuem fenótipos naturais (inerentes) de resistência a certos antimicrobianos. Desta forma, se uma destas combinações é encontrada, através da leitura interpretada do antibiograma é possível que esta ocorrência seja detectada e os resultados confirmados, pois na maioria dos casos em que isso ocorre, a causa é um erro humano na realização de um dos testes (Moreno, 2002).

Além das características descritas acima, é possível, ao utilizar a leitura interpretada dos perfis de susceptibilidade do antibiograma em sua forma plena, predizer os mecanismos de resistência existentes através deste

perfil. Considerando a leitura interpretada sob este ângulo, é possível que ela seja utilizada para: direcionar a pesquisa de certos mecanismos através de testes fenotípicos específicos ou mesmo testes genotípicos, como a pesquisa de genes possivelmente envolvidos com o mecanismo de resistência identificado; estimar a disseminação desses mecanismos de resistência; identificar, a partir destes mecanismos determinados, certos perfis de susceptibilidades anômalos; bem como selecionar antimicrobianos que não são utilizados comumente, mas que podem ser essenciais em casos de mecanismos de resistência identificados em microrganismos-problema (Vila & Marco, 2002).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são as drogas ideais para a leitura interpretada, uma vez que existem muitos mecanismos de resistência a esses, incluindo mais de 300 tipos de beta-lactamases, bombas de efluxo e diminuição da permeabilidade celular devido às porinas, bem como em razão de que mecanismos de resistência diferentes freqüentemente resultam em padrões fenotípicos distintos (Livermore *et al.*, 2004).

Como qualquer outro método, a leitura interpretada tem suas limitações. Ela não deve ser utilizada como um método diagnóstico, mas sim como uma forma de direcionar a pesquisa com o intuito de identificar os mecanismos de resistência através de investigação fenotípica ou genotípica. Deve ser levado em consideração que mecanismos de resistência diversos que afetam o mesmo grupo de antimicrobianos são cada vez mais comuns de serem encontrados em um mesmo isolado, desta forma a leitura interpretada pode ser mais difícil de ser realizada, ou mesmo apontar em uma direção

incorreta. Também pode acontecer de a leitura interpretada direcionar a um provável mecanismo de resistência, quando na verdade existem dois ou mais mecanismos resultando em um mesmo fenótipo de resistência. Também deve ser considerado que a leitura interpretada falhará em identificar novos mecanismos de resistência se esses produzirem um fenótipo de resistência idêntico àqueles já descritos anteriormente (Vila & Marco, 2002; Livermore *et al.*, 2004).

Apesar disso, não existem dúvidas de que se forem adotadas práticas responsáveis de identificação posterior, a leitura interpretada serve como ferramenta útil adicional na prática comum com o objetivo de direcionar a pesquisa de mecanismos de resistência responsáveis pelos perfis de susceptibilidade obtidos somente com a realização do antibiograma (Moreno, 2002).

2.4 Contexto genético de genes de resistência

Pelo menos 8 classes de integrons são conhecidas atualmente, sendo que as classes 1, 2 e 3 estão freqüentemente envolvidas na expressão de multi-resistência a drogas e têm uma ocorrência alta quando comparadas a outras classes. Cada classe de integron é distinguida através de diferenças na seqüência de seus genes de integrases (*int11*, *int12* e *int13*), as quais compartilham similaridade entre 35% e 94% (Barlow *et al.*, 2004).

A classe 1 agrega a maior parte dos integrons encontrados em isolados clínicos, sendo que os membros deste grupo foram os que originalmente foram caracterizados como integrons e até hoje constituem a

classe mais estudada. Integrons da classe 2 incluem um sistema encontrado no transposon Tn7 e elementos relacionados, possuindo uma integrase defeituosa. Integrons da classe 3 são semelhantes aos da classe 1, embora sejam muito menos freqüentes (Bennet, 1999).

Integrons de classe 1 residem, embora não exclusivamente, em transposons e plasmídeos conjugativos, fato este que contribui para sua ampla distribuição e sua significativa associação com fenótipos de multi-resistência. Elementos genéticos pertencentes a esta classe constituem-se de uma região conservada 5' (5-CS), formada por um gene *intl1*, uma região promotora e um sítio de recombinação (*attI1*); e uma região conservada 3' (3-CS). Essa última região é geralmente composta pelo gene *qacEΔ1* conjugado ao gene *sul1*, sendo que esses genes codificam resistência a compostos de amônio quaternário e sulfonamidas, respectivamente (Michael *et al.*, 2004).

Na região 5' do gene *intl1*, responsável pela produção da enzima integrase, estes integrons apresentam uma região promotora, a qual é responsável pela expressão dos cassetes gênicos inseridos entre as regiões conservadas 5' e 3'. Essa região é formada por um promotor denominado P_c , constituído por duas seqüências de seis bases nas posições -35 e -10, respectivamente, sendo elas intercaladas por exatos 17 bp. Variações dessas seqüências já foram encontradas e podem ocasionar diferenças nas taxas de transcrição dos cassetes gênicos, sendo que alguns integrons de classe 1 podem também apresentar um segundo promotor, localizado 119 bp à jusante de P_c (Boschi *et al.*, 2000).

Assim como diferentes promotores apresentam distinções nas taxas de transcrição do gene, a posição onde o cassete gênico encontra-se inserido entre as regiões conservadas 5' e 3' também influencia a taxa de transcrição dos genes presentes no cassete. Experimentos evidenciaram que a transcrição dá-se de forma mais eficiente à medida que o gene no cassete encontra-se mais próximo à região promotora do integron. Sendo assim, genes localizados nas primeiras posições apresentam maiores taxas de transcrição (Boschi *et al.*, 2000).

Entre as regiões conservadas 5' e 3', os integrons podem apresentar quantidade variável de cassetes gênicos, que são pequenas seqüências de DNA circular tendo aproximadamente entre 500 e 1.000 bp. Os cassetes gênicos em si são constituídos por dois componentes funcionais: um gene, responsável pela codificação de alguma proteína, e um sítio de recombinação, conhecido como 59 elementos de base (59 be). Os genes encontrados nesses cassetes não possuem um promotor, sendo, portanto, o evento de expressão gênica dependente do promotor presente no integron no qual o cassete gênico se encontra inserido (Mendes *et al.*, 2006).

Os sítios 59 be abrangem uma família de elementos que, enquanto possuem similaridades estruturais e seqüenciais, podem variar amplamente, inclusive entre cassetes gênicos adjacentes. A orientação de um cassete gênico em relação ao integron é especificamente controlada durante a inserção, de forma que o gene a ser associado possa ser transcrito pelo P_c . A especificidade desta orientação é determinada pelo 59 be (Stokes *et al.*, 1997).

A integrase 1, enzima codificada pelo gene *int1*, é uma recombinase sítio-específico e possui como substrato preferencial dois sítios de ação, um na porção do 59 be, pertencente ao cassete gênico, e outro no receptor do cassete gênico ou *att1*, localizado no integron. Usualmente as reações de recombinação ocorrem entre *att1* (localizado no integron) e 59 be (localizado no cassete gênico) (Collis & Hall, 1995, Partridge *et al.*, 2000).

O arranjo de cassetes gênicos associados a integrons pode variar de 0 (isto é, nenhum cassete) a grandes arranjos onde mais de 100 cassetes gênicos podem ser encontrados em integrons cromossômicos (Clark *et al.*, 2000).

Paralelamente à disseminação de uma beta-lactamase em particular, pode ser observada também a ocorrência da disseminação de mais de um determinante de resistência, pois freqüentemente os cassetes gênicos possuem mais de um gene. Até o momento, mais de 70 cassetes gênicos de resistência já foram descritos, conferindo resistência a todos os beta-lactâmicos, todos os aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptomicina, rifampicina, eritromicina, bem como resistência a antissépticos, biguanidinas e compostos de amônio quaternário. A mobilização genética presente na integração de diferentes cassetes gênicos acontece de forma aleatória (Bennett, 1999; Mazel, 2004).

Já os integrons de classe 2 são caracterizados pela presença do gene *int2*, que codifica uma integrase não funcional devido à presença de um códon de terminação interno, sendo que este gene possui menos de 50% de homologia com a integrase *int1*. Estão associados principalmente com a

família de transposons *Tn7*, diferentemente do que ocorre em integrons da classe 1, que estão freqüentemente associados com a família de transposons *Tn21* (Biskri & Mazel, 2003; Ramírez *et al.*, 2005). Eles têm sido relacionados com a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos na família Enterobacteriaceae, sendo que existem relatos de sua presença em *Shigella sonnei* biotipo g, *Salmonella enterica*, *E. coli* O145, dentre outros (Mammìna *et al.*, 2005; Peirano *et al.*, 2006; Vali *et al.*, 2007). Em bacilos gram negativos não fermentadores de glicose, sua presença é restrita a cepas de *Burkholderia cenocepacia* e *Acinetobacter* spp multi-resistentes (Ramírez *et al.*, 2005).

Os integrons de classe 2 podem estar presentes tanto em plasmídeos como no cromossomo bacteriano. Usualmente, este tipo de integron carrega três cassetes gênicos clássicos: *dfrA1*, *sat1* e *aadA1*, que conferem resistência ao trimetoprim, estreptomicina e estreptomicina/espectinomicina, respectivamente (Ahmed *et al.*, 2005).

No entanto, já houve relatos de *Salmonella enterica* serovar Virchow, carreando um integron de classe 2 com o gene *ereA*, conferindo resistência a eritromicina, substituindo *dfrA1*, como também *Salmonella* Typhimurium contendo um integron de classe 2 onde o gene *dfrA1* foi substituído por outro gene *sat* (Ahmed *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2006). Recentemente, foi relatado um isolado de *Shigella sonnei* com integron classe 2 carregando somente dois cassetes gênicos, *dfrA1* e *sat1* (Ahmed *et al.*, 2005).

Biskri & Mazel (2003) sugeriram que integrons de classe 2 carregam um forte promotor, uma vez que ele permite a expressão fenotípica de virtualmente todos os genes no cassete. Este promotor ainda não foi

identificado com precisão, mas de acordo com Hansson *et al.* (2002), ele está localizado à montante ao gene *intl2*, e não na parte 5' do gene *intl1* como acontece nos integrons de classe 1.

No caso de integrons de classe 3, sua caracterização revelou a presença de um gene *intl3*, um sítio *attI3* e um promotor P_c , sendo que esta configuração é a mesma encontrada em integrons da classe 1. O sítio *attI3* foi localizado à montante do gene *intl3* e o promotor P_c foi localizado dentro do gene *intl3*. Também foi sugerido que integrons da classe 3 fariam parte de um transposon, pois sua estrutura foi claramente relacionada com *Tn402* (Collis *et al.*, 2002).

Até o momento, só existem três exemplos de integrons de classe 3 carreando genes de resistência: IMP-1 (beta-lactamase de classe B) em uma cepa de *S. marcescens* isolada no Japão, GES-1 (beta-lactamase de classe A) em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada em Portugal e IMP-1 em uma cepa de *P. putida* isolada no Japão (Ito *et al.*, 1995; Correia *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste estudo foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia 166 do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1 Meios de cultura, soluções e equipamentos

A listagem das soluções, meios de cultura e identificação, e equipamentos utilizados na parte prática desta dissertação estão descritos nos Apêndices, bem como seus respectivos fabricantes.

3.2 Coletas de amostras de efluente hospitalar não tratado, isolamento e identificação de isolados bacterianos

Para o isolamento de *Pseudomonas* spp, as coletas das amostras de efluente hospitalar não tratado foram realizadas de forma intencional, sem regularidade pré-definida ou relação sazonal. As amostras de efluente hospitalar não tratado de quatro hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul

(RS) (TABELA 1) foram coletadas e mantidas sob refrigeração até o momento do processamento, realizado em até 24 horas após a coleta.

TABELA 1 - Caracterização de quatro hospitais de Porto Alegre onde amostras de efluente foram coletadas no ano de 2007

| Hospital | Nº de leitos | Área (m ²) | Nº de Funcionários | Internações/ano |
|----------|--------------|------------------------|--------------------|-----------------|
| 1 | 165 | 25.000 | 650 | 9.000 |
| 2 | 882 | 43.000 | 4115 | 30.000 |
| 3 | 749 | 125.200 | 3983 | 27.000 |
| 4 | 544 | 55.000 | 3055 | 28.000 |

As amostras foram coletadas em frasco estéril, 1 litro de amostra para cada ponto de cada hospital, sendo que cada uma foi processada separadamente. Alíquotas de 100 mL de cada amostra foram inicialmente concentradas pela técnica de membrana filtrante, utilizando suporte para filtração com filtro de poro 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. Após a filtração, os filtros foram colocados em tubos contendo 10 mL de água peptonada, agitados em vórtex por 30 segundos e deixados em repouso por 1 hora para permitir que as bactérias se eluíssem do filtro. A seguir, foi realizada diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) a partir da suspensão, sendo que 100 µl de cada uma das diluições foram semeados, com auxílio de alça Drigalski, em placas de ágar MacConkey. A semeadura nas placas foi realizada em triplicata. Após incubação a 35°C por 24 horas, foram selecionadas todas colônias não fermentadoras, inclusive aquelas com características morfológicas distintas, as quais foram semeadas em ágar TSA (Tryptic Soy Agar), sendo posteriormente re-isoladas neste mesmo meio de cultura e condições para garantir que crescimento puro fosse armazenado em ágar TSA inclinado para posterior identificação de gênero e espécie.

Os isolados não fermentadores retirados do ágar MacConkey foram submetidos a uma triagem inicial, permanecendo no estudo aqueles caracterizados como bacilos gram negativos, negativos para a fermentação da glicose em meio OF e catalase positivos. Estes então foram submetidos à reação de PCR do 16S rRNA para a confirmação do gênero *Pseudomonas* (Spilker *et al.*, 2004). Não houve restrição de isolados, sendo que participaram do estudo todos aqueles identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* através desta reação. Após esta confirmação de gênero, os isolados foram preservados em duplicata, em meio BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de 15% de glicerol, e armazenados a -18°C.

3.2.1 Extração de DNA dos isolados de *Pseudomonas* spp

Para a extração do DNA bacteriano, foi utilizado o kit Whatman® FTA® Elute. Sucintamente, foram retiradas três colônias isoladas de ágar TSA, semeadas em caldo BHI e cultivadas por 24 horas a 35°C. Após, 100 µl desta suspensão bacteriana foram aplicados em cartões fornecidos pelo kit. Após secagem à temperatura ambiente durante 24 horas, foi retirado com um cortador estéril um disco de 3 mm de diâmetro deste cartão, e este armazenado em um microtubo estéril. Foi acrescentado a este microtubo 500 µl de água deionizada estéril para lavagem, sendo agitado 3 vezes por 10 segundos em vórtex. O líquido foi retirado, centrifugou-se a 10000 rpm durante 1 minuto, retirando-se o excesso restante deste. Ao disco do cartão já lavado, foram acrescentados 50 µl de água destilada estéril e colocado em termociclador a 95°C durante 30 minutos, para a extração do DNA contido no

cartão. O DNA extraído foi estocado neste mesmo microtubo a -18°C até sua utilização. Todas as amostras de DNA utilizadas no trabalho foram extraídas por esta metodologia.

3.2.2 Identificação do gênero bacteriano

A reação de PCR para confirmação do gênero *Pseudomonas* foi realizada com um volume final de 25 μl , cada reação contendo 5 μl do DNA bacteriano extraído como descrito em 3.2.1; 2,8 mM de MgCl_2 ; 1 μM de cada oligonucleotídeo iniciador: PA-GS-F (5'GAC GGG TGA GTA ATG CCT A3') e PA-GS-R (5'CAC TGG TGT TCC TTC CTA TA3') (Spilker *et al.*, 2004); 1U de enzima DNA *Taq* Polimerase; 0,3 mM de solução de dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP e 1X de tampão da enzima DNA *Taq* Polimerase.

As condições de amplificação foram as seguintes: dois minutos a 95°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 54°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de cinco minutos a 72°C .

Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento amplificado de aproximadamente 618 pares de bases (pb). Como controles positivos e negativos foram utilizados DNAs de *P. putida* ATCC (American Type Culture Collection) 15175 e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente.

3.2.3 Identificação da espécie bacteriana

Todos isolados positivos para a reação de PCR do gênero *Pseudomonas* spp foram posteriormente submetidos à reação de PCR específica para *Pseudomonas aeruginosa*.

A reação de PCR para identificação da espécie *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada com um volume final de 25 µl, cada reação contendo 5 µl do DNA bacteriano extraído como descrito em 3.2.1; 2,0 mM de MgCl₂; 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador: PA-SS-F (5'GGG GGA TCT TCG GAC CTC A3') e PA-SS-R (5'TCC TTA GAG TGC CCA CCC G3') (Spilker *et al.*, 2004); 1U de enzima DNA *Taq* Polimerase; 0,3 mM de solução de dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP e 1X de tampão da enzima DNA *Taq* Polimerase.

As condições de amplificação foram as seguintes: dois minutos a 95°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 25 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 60°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de cinco minutos a 72°C.

Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento de aproximadamente 956 pb. Como controles positivos e negativos foram utilizados DNAs de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. putida* ATCC 15175, respectivamente.

Os isolados negativos para a reação da PCR específica para *P. aeruginosa* foram submetidos, além das provas bioquímicas iniciais para triagem do gênero, a uma série de provas bioquímicas para identificação da espécie: oxidação da glicose, maltose e do amido, utilizando o meio de OF,

com a fonte de carbono na concentração de 1%; habilidade de crescimento em meio TSB (Tryptone Soya Broth) a 42°C; produção da enzima oxidase e hidrólise da gelatina (Garrity, 1984). Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram preparados conforme a orientação do fabricante, e o armazenamento dos mesmos, bem como a leitura e interpretação dos resultados, foram realizados de acordo com MacFaddin (2000).

3.2.4 Visualização dos produtos de PCR

Todos os fragmentos amplificados por reações de PCR realizadas neste estudo foram visualizados em gel de agarose 1% com TAE 1x, corado com brometo de etídeo. Para aplicar as amostras nas canaletas dos géis, foi utilizado 1 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol 6X) para cada 5 µl de amostra aplicada. Como padrão de tamanho de fragmentos, foi utilizado como marcador de tamanho molecular o Ladder 100 pb. Os géis foram analisados com auxílio de transiluminador dotado de lâmpada ultravioleta e fotografados com câmera digital Kodak 1D (versão 3.5.2). A análise do tamanho dos fragmentos amplificados foi realizada através do programa Kodak 1D (versão 3.5.2).

3.3 Susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos

Para a realização do antibiograma, foi utilizada a metodologia de disco-difusão em ágar. Todos isolados tiveram sua susceptibilidade testada para 11 antimicrobianos, conforme preconizado pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2005) (TABELA 2).

TABELA 2 - Agentes antimicrobianos testados nos antibiogramas, com respectiva concentração de discos e siglas

| Agente antimicrobiano | Concentração do disco | Sigla |
|-------------------------|-----------------------|-------|
| Aztreonam | 30 µg | ATM |
| Cefepime | 30 µg | CPM |
| Cefpiroma | 30 µg | CPO |
| Cefoperazona | 30 µg | CFP |
| Ceftazidima | 30 µg | CAZ |
| Imipenem | 10 µg | IPM |
| Meropenem | 10 µg | MER |
| Piperacilina | 100 µg | PRL |
| Piperacilina-tazobactam | 100/10 µg | PPT |
| Ticarcilina | 75 µg | TIC |
| Ticarcilina-clavulanato | 75/10 µg | TCC |

Como controles, foram utilizadas as cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente.

O inóculo foi preparado fazendo-se uma suspensão, em solução salina, de colônias isoladas selecionadas em uma placa de ágar TSA com crescimento de 24 horas a 35°C, fazendo-se com que a turbidez coincidissem com uma solução padrão MacFarland de 0,5 ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL). As placas foram incubadas a 35°C por 18-24 horas.

A medida dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor de cada disco foi efetuada, utilizando uma régua padrão, sendo que a interpretação dos halos obtidos foi realizada de acordo com as normas do CLSI (2005).

Foram considerados multi-resistentes (MDRs) os isolados que apresentaram susceptibilidade diminuída (perfil resistente ou intermediário) a pelo menos um antimicrobiano beta-lactâmico pertencente a pelo menos três subclasses diferentes (Paterson, 2006) (TABELA 3).

TABELA 3 - Divisão dos antimicrobianos testados, de acordo com as subclasses de beta-lactâmicos

| Subclasse | Antimicrobiano(s) |
|---|--|
| Beta-lactâmicos/Inibidor de beta-lactamases | ticarcilina-clavulanato, piperacilina-tazobactam |
| Carbapenêmicos | imipenem, meropenem |
| Cefalosporinas | ceftazidima, cefoperazona, cefpiroma, cefepime |
| Monobactâmicos | aztreonam |
| Penicilinas | ticarcilina, piperacilina |

3.4 Leitura interpretada do perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados

Para a realização da leitura interpretada do perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos na metodologia de disco-difusão em ágar, foram utilizados os critérios estabelecidos por Vila & Marco (2002); Livermore *et al.* (2004) e Picão & Gales (2007). Esta leitura baseia-se no fato de que os perfis de susceptibilidade encontrados podem ser relacionados à presença de certos tipos de determinantes de resistência, como bombas de efluxo, presença de expressão diminuída de porinas e presença de genes de resistência.

3.5 Amplificação de genes MBL pela reação de PCR

Todos os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram submetidos à PCR para pesquisa dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM-1}. Para essas reações, foi utilizado como controle positivo DNA de cepa carreadora do respectivo gene, cedida por Dr^a Ana Cristina Gales (Laboratório Alerta e Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Divisão de

Doenças Infecciosas, Universidade Federal de São Paulo) e como controle negativo foi utilizado DNA de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

A reação de PCR para amplificação do gene *bla_{IMP}* foi realizada com um volume final de 15 µl, cada reação contendo 2 µl do DNA bacteriano extraído previamente; 3,0 mM de MgCl₂; 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador: F1 (5'AAA GAT ACT GAA AAG TTA GT 3') e R1 (5' TCY CCA AYT TCA CTR TGA CT 3') (Yatsuyanagi *et al.*, 2004); 1U de enzima DNA *Taq* Polimerase; 0,3 mM de solução de dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP e 1X de tampão da enzima DNA *Taq* Polimerase.

As condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 25 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 44°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de oito minutos a 72°C. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento de aproximadamente 446 pb.

A PCR para amplificação do gene *bla_{VIM}* foi realizada com um volume final de 15 µl, cada reação contendo 2 µl do DNA bacteriano extraído previamente; 3,0 mM de MgCl₂; 1,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador: F2 (5' AGT GGT GAG TAT CCG ACA 3') e R2 (5' ATG AAA GTG CGT GGA GAC 3') (Gräf *et al.*, 2008); 1U de enzima DNA *Taq* Polimerase; 0,3 mM de solução de dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP e 1X de tampão da enzima DNA *Taq* Polimerase.

As condições de amplificação foram as seguintes: dois minutos a 95°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por

30 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 62°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de dez minutos a 72°C. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento de aproximadamente 400 pb.

A PCR para amplificação do gene *bla*_{SPM-1} foi realizada com um volume final de 15 µl, cada reação contendo 2 µl do DNA bacteriano extraído previamente; 3,2 mM de MgCl₂; 2,0 µM de cada oligonucleotídeo iniciador: F3 (5' TCG GAT CAT GTC GAC TTG CC3') e R3 (5'CCT TCG CTT CAG ATC CTC GT 3') (Gräf *et al.*, 2008); 1U de enzima DNA *Taq* Polimerase; 0,3 mM de solução de dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP e 1X de tampão da enzima DNA *Taq* Polimerase.

As condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 25 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 54°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de oito minutos a 72°C. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento de aproximadamente 350 pb.

3.6 Amplificação de genes OXA pela reação de PCR

Todos os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram submetidos à PCR para pesquisa de genes dos grupos *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like} e *bla*_{OXA-51-like}. Para essas reações, foi utilizado como controle positivo DNA de cepa carreadora do respectivo gene, cedida por Dr^a Ana Cristina Gales (Laboratório Alerta e Laboratório Especial de Microbiologia

Clínica, Divisão de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de São Paulo) e como controle negativo foi utilizado DNA de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

O par de oligonucleotídeos iniciadores *bla*_{OXA-23-like} abrange a amplificação dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-27} e *bla*_{OXA-49}. A PCR para amplificação com este par de oligonucleotídeos iniciadores foi realizada com um volume final de 20 µl, cada reação contendo 3 µl do DNA bacteriano extraído previamente; 5,0 mM de MgCl₂; 2,0 µM de cada oligonucleotídeo iniciador: F4 (5' GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA 3') e R4 (5' ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT 3') (Woodford *et al.*, 2006); 1U de enzima DNA *Taq* Polimerase; 0,3 mM de solução de dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP e 1X de tampão da enzima DNA *Taq* Polimerase.

As condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 51°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de seis minutos a 72°C. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento de aproximadamente 501 pb.

O par de oligonucleotídeos iniciadores *bla*_{OXA-24-like} abrange a amplificação dos genes *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-25}, *bla*_{OXA-26} e *bla*_{OXA-40}. A PCR para amplificação com este par de oligonucleotídeos iniciadores foi realizada com um volume final de 20 µl, cada reação contendo 3 µl do DNA bacteriano extraído previamente; 5,0 mM de MgCl₂; 2,0 µM de cada oligonucleotídeo iniciador: F5 (5' GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA 3') e R5 (5' AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT 3') (Woodford *et al.*, 2006); 1U de enzima DNA *Taq*

Polimerase; 0,3 mM de solução de dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP e 1X de tampão da enzima DNA *Taq* Polimerase.

As condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 54°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de seis minutos a 72°C. Foram considerados positivos os resultados que demonstraram a presença de um produto de reação de aproximadamente 246 pb.

A amplificação do gene *bla*_{OXA-51-like} utilizou os oligonucleotídeos iniciadores F6 (5' TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG 3') e R6 (5' TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG 3') (Woodford *et al.*, 2006), que abrange a amplificação dos genes *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-64}, *bla*_{OXA-65}, *bla*_{OXA-66}, *bla*_{OXA-68}, *bla*_{OXA-69}, *bla*_{OXA-70}, *bla*_{OXA-71}, *bla*_{OXA-78}, *bla*_{OXA-79}, *bla*_{OXA-80} e *bla*_{OXA-82}. As condições de reação utilizadas foram as mesmas descritas para a pesquisa do gene *bla*_{OXA-23-like}.

As condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 53°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de seis minutos a 72°C. Foram considerados positivos os resultados que demonstraram a presença de um produto de reação de aproximadamente 353 pb.

3.7 Amplificação de genes GES pela reação de PCR

Todos os isolados com susceptibilidade diminuída aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) foram submetidos à reação da PCR para pesquisa de genes do grupo *bla*_{GES-like}. Para essa reação, foi utilizado como controle positivo DNA de cepa carreadora de genes do grupo *bla*_{GES-like}, cedida por Dr^a Ana Cristina Gales (Laboratório Alerta e Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Divisão de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de São Paulo) e como controle negativo foi utilizado DNA de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

O par de oligonucleotídeos iniciadores *bla*_{GES-like} abrange a amplificação dos genes *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-3}, *bla*_{GES-4}, *bla*_{GES-5} e *bla*_{GES-8}. A reação de PCR para amplificação com este par de oligonucleotídeos iniciadores foi realizada com um volume final de 25 µl, cada reação contendo 5 µl do DNA bacteriano extraído previamente; 5,5 µl de água deionizada estéril; 12,5 do mastermix GoTaq[®] e 2,0 µM de cada oligonucleotídeo iniciador: F7 (5' GTT AGA CGG GCG TAC AAA GAT AAT 3') e R7 (5' TGT CCG TGC TCA GGA TGA GT 3') (Jeong *et al.*, 2006).

As condições de amplificação foram as seguintes: dois minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 58°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de dez minutos a 72°C. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento de aproximadamente 860 pb.

3.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ao imipenem

Todos os isolados que apresentaram nível resistente ou intermediário ao imipenem foram testados para determinar a CIM pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as normas do CLSI (2005).

A partir de uma solução de 125 mg de imipenem, foi preparada uma diluição principal em caldo Mueller-Hinton com a concentração de 5120 µg/mL. A partir desta, foram realizadas diluições subseqüentes. Após, 0,1 mL dessas diluições nas concentrações de 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 e 256 µg/mL foi dispensado em cada poço de microplaca de fundo redondo para a realização dos testes. O inóculo foi preparado através de suspensão direta em solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar TSA com crescimento de 18-24 horas. A suspensão foi realizada de forma que a concentração final de bactérias por poço fosse aproximadamente 5×10^4 UFC/mL, utilizando uma solução padrão de MacFarland 0,5 como padrão.

Para cada teste, foi realizado um controle negativo (não inoculado, contendo somente caldo Mueller-Hinton) e um controle positivo de crescimento (contendo caldo Mueller-Hinton e a suspensão da bactéria sendo testada). Para cada placa de testes, foi utilizada *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 para controle de leitura da CIM, sendo que esta foi determinada como o primeiro poço onde houve completa inibição do crescimento do organismo a olho nu. De acordo com o CLSI (2005), o ponto de corte para bactérias sensíveis a este antimicrobiano é ≤ 4 µg/mL e o ponto de corte para bactérias resistentes a esse antimicrobiano é ≥ 16 µg/mL.

3.9 Caracterização dos isolados quanto à presença de integrons

Todos os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram submetidos à PCR para pesquisa de integrons, através da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores degenerados hep35 (5' TGC GGG TYA ARG ATB TKG ATT T 3') e hep36 (5' CAR CAC ATG CGT RTA RAT 3') (White *et al.*, 2001), que anelam em regiões conservadas de genes de integrase *intl1*, *intl2* e *intl3* de integrons de classe 1, 2 e 3, respectivamente.

Para cada reação foi utilizado 5,5 µl de água deionizada estéril, 12,5 do mastermix GoTaq e 1 µl de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 1 µM, totalizando 20 µl. Em cada tubo de amplificação contendo 20 µl de mix foi adicionado 5 µL do DNA bacteriano extraído previamente, obtendo-se um volume final de 25 µl.

As condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 35 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), dois minutos a 55°C (anelamento), três minutos a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de sete minutos a 72°C. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento de aproximadamente 491 pb.

3.9.1 Identificação dos integrons de classe 1

Todos os isolados identificados como positivos com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores hep35 e hep36 foram submetidos à PCR para determinação da classe à qual estes integrons pertenciam. Para isso, foram

utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da integrase 1: *intl1f* (5' CGGAATGGCCGAGCAGATC 3') e *intl1r* (5' CAAGGTTCTGGACCAGTTGCG 3') (Sandvang *et al.*, 2002).

Para cada reação, foram utilizados 15,5 µl de água deionizada estéril, 2,5 µl do MasterMix GoTaq e 2 µl de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 1 µM, totalizando 20 µl. Em cada tubo de amplificação contendo 20 µl de mix, foram adicionados 5 µL do DNA bacteriano extraído previamente, obtendo-se um volume final de 25 µl.

As condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 35 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 55°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão); com um ciclo final de extensão de seis minutos a 72°C. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um fragmento de aproximadamente 879 pb.

3.9.2 Clivagem com endonuclease de restrição do produto de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores hep35 e hep 36

Foi realizada digestão dos isolados que se apresentaram como positivos para os oligonucleotídeos iniciadores hep35 e hep36, mas negativos para os oligonucleotídeos iniciadores *intl1f* e *intl1r*, com o intuito de estabelecer a classe à que esses integrons pertenciam. As condições de PCR foram as mesmas descritas no item 3.9. Foi utilizada a endonuclease de restrição *RsaI* para clivagem dos produtos de PCR (White *et al.*, 2001). A reação de clivagem com a enzima *RsaI* foi realizada num volume final de 20 µl, contendo 10 µl do

produto da reação de PCR, tampão da enzima 1x, 10U da enzima de restrição e água deionizada estéril. A mistura foi incubada em banho de água a 37° C por 4 horas.

Para a análise dos fragmentos, aos 20 µl da reação de clivagem foi adicionado 4 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol 6x), sendo que os fragmentos foram separados por migração eletroforética em gel não desnaturante de poliacrilamida 8% em tampão TBE 1X. Para esses géis, foi utilizado como marcador de tamanho molecular o Ladder 100 pb.

De acordo com o número e tamanho de fragmentos gerados, os isolados foram classificados como positivos para integrons de classe 1, 2 ou 3, conforme TABELA 4.

TABELA 4 - Número e tamanho de fragmentos esperados com a digestão com endonuclease de restrição *RsaI* para classificação dos isolados quanto às classes de integrons

| Produto de PCR | Nº de fragmento (s) | Tamanho de fragmentos(s) (pb) |
|----------------|---------------------|-------------------------------|
| <i>intl1</i> | 1 | 491 |
| <i>intl2</i> | 2 | 334, 157 |
| <i>intl3</i> | 3 | 97, 104, 290 |

pb: pares de base.

Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 8 V/cm por 2 horas e 40 minutos. Após a migração, o gel foi corado com brometo de etídeo (TBE 1x com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo) por 15 minutos. A análise foi realizada sob luz ultravioleta e o gel fotografado com câmera digital Kodak 1D (versão 3.5.2). A análise do tamanho dos fragmentos amplificados foi realizada através do programa KODAK 1D (versão 3.5.2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Distribuição de espécies de *Pseudomonas*

Foram realizadas oito coletas de amostras de efluente hospitalar não tratado, sendo que foram obtidos 654 isolados não fermentadores, a partir da utilização do meio de cultura MacConkey. Após serem submetidos a triagem inicial, restaram 371 isolados com perfil bioquímico compatível com o gênero *Pseudomonas*. Destes, com a realização de PCR específico para o gênero *Pseudomonas*, foram obtidos 124 isolados. Pela PCR específica para *P. aeruginosa*, foram identificados 26 destes isolados, representando 20,96% do total de isolados do gênero *Pseudomonas*. Os 98 isolados remanescentes (79,04%) foram identificados até nível de espécie através das provas bioquímicas descritas nos Apêndices.

Quanto à distribuição de espécie entre os isolados, foram encontradas oito espécies diferentes de *Pseudomonas* spp. No Hospital 1, com seis isolados, dois foram identificados como *P. luteola*, dois como *P. putida* e dois como *P. fluorescens*. No Hospital 2, com dois isolados, a única espécie

encontrada foi *P. pseudoalcaligenes*. Já no Hospital 3, com 25 isolados, 9 foram identificados como *P. mendocina*, 3 como *P. oryzihabitans*, 4 como *P. fluorescens*, 2 como *P. aeruginosa*, 2 como *P. putida*, 2 como *P. alcaligenes* e 3 como *P. pseudoalcaligenes*. No Hospital 4, em que se encontrou maior número de isolados, com o total de 91, foram identificados 2 *P. oryzihabitans*, 24 *P. aeruginosa*, 3 *P. putida*, 1 *P. luteola* e 61 *P. pseudoalcaligenes*.

A espécie mais freqüente foi *P. pseudoalcaligenes*, com 66 (53,27%) isolados; seguida de *P. aeruginosa*, com 26 (20,96%) isolados; *P. mendocina*, com 9 (7,25%) isolados; *P. putida*, com 7 (5,64%) isolados, *P. fluorescens*, com 6 (4,83%) isolados, *P. oryzihabitans*, com 5 (4,03%) isolados; *P. luteola*, com 3 (2,41%) isolados e *P. alcaligenes*, com 2 (1,61%) isolados. A freqüência das espécies não pode ser considerada como representativa, em razão da característica das coletas realizadas, bem como pela grande diferença entre o número de isolados obtidos a partir dos diferentes hospitais.

Apesar de ter sido a espécie mais encontrada no estudo e ser freqüentemente isolada em amostras do ambiente, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* raramente é responsável por infecções em humanos, tendo sido relacionada com genes de resistência em poucos casos descritos na literatura (Phillips & Shannon, 1978; Quinteira *et al.*, 2005). A espécie se relaciona com infecções em animais, como fitopatógeno, mas principalmente está envolvida em processos de biorremediação (Garrity, 1984; Mathewson & Simpson, 1982).

Já *P. aeruginosa*, segunda espécie mais encontrada, é um dos principais patógenos nosocomiais, sendo responsável por vários tipos de

infecções e com opções terapêuticas cada vez mais limitadas, grande parte devido à sua capacidade de acumular rapidamente diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Empel *et al*, 2007). Considerada uma bactéria ubíqua, está amplamente distribuída no ambiente, sendo encontrada, além de fontes clínicas de infecções, em ambientes aquáticos como lagos, rios, água de torneira, água mineral engarrafada, efluentes, solo, plantas, etc (Garrity, 1984).

P. mendocina também é bactéria comumente encontrada no ambiente e está geralmente relacionada a estudos que dão ênfase na biorremediação e degradação do tolueno. Pode raramente causar infecções oportunistas, como endocardite e espondilodiscite. Somente três casos de infecções em humanos foram reportados até a atualidade (Aragone, 1992; Chi *et al.*, 2005; Mert *et al.*, 2007).

P. putida é freqüentemente encontrada no ambiente, estando relacionada principalmente a processos de biodegradação. Primariamente, pode causar infecções em pacientes imunocomprometidos e em pacientes com equipamentos médicos invasivos, como sondas e cateteres. Já esteve relacionada com surtos, principalmente originários de fluídos contaminados. Apesar de não ser considerada clinicamente significativa, normalmente é estabelecida como causadora da infecção quando isolada em cultura pura (Carpenter, 2008)

Apesar da maior parte dos isolados deste estudo pertencer a espécies ambientais que estão infreqüentemente relacionadas a infecções humanas, com exceção de *P. aeruginosa*, é importante salientar que todas elas podem representar um potencial reservatório de determinantes de resistência,

como apresentado por Koh *et al.* (2004). Desta maneira, reside neste fato a importância de ser considerada a presença destes isolados em amostras de efluente hospitalar não tratado.

4.2 Susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados

Atualmente existe uma grande ocorrência de resistência aos antimicrobianos, tornando necessário o entendimento da disseminação dos fatores de resistência no ambiente, bem como a forma como os fatores antropogênicos, como por exemplo, os efluentes, podem afetar esta disseminação. Aproximadamente dois terços dos antimicrobianos administrados a humanos são beta-lactâmicos, sendo este um dos fatores que influenciam a existência do principal mecanismo de resistência bacteriana, a hidrólise de antimicrobianos devido à produção de beta-lactamases, bem como a constante descoberta de novas variantes enzimáticas com tanta frequência e ubiquidade. Outros mecanismos que também influenciam largamente na resistência a beta-lactâmicos são as bombas de efluxo e a perda ou diminuição da expressão de porinas (Lachmayr *et al.*, 2009).

De uma forma geral, os isolados encontrados neste estudo apresentaram uma sensibilidade maior aos antimicrobianos carbapenêmicos imipenem e meropenem, totalizando 87,90% e 95,97% de sensibilidade, respectivamente. As maiores taxas de susceptibilidade reduzida (perfil intermediário ou resistente) foram encontradas para o antimicrobiano ticarcilina

(78,23%), seguido por cefoperazona (50,00%), ceftazidima (47,58%), piperacilina (40,32%) e cefepime (38,71%) (TABELA 5).

TABELA 5 - Porcentagem de isolados de *Pseudomonas* spp sensíveis e com susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos testados

| Antimicrobiano | Sensível | Susceptibilidade diminuída |
|----------------|----------|----------------------------|
| MER | 95,97 | 04,03 |
| IPM | 87,90 | 12,10 |
| PPT | 82,26 | 17,74 |
| CPO | 71,77 | 28,23 |
| ATM | 69,35 | 30,65 |
| TCC | 65,32 | 34,68 |
| CPM | 61,29 | 38,71 |
| PRL | 59,68 | 40,32 |
| CAZ | 52,42 | 47,58 |
| CFP | 50,00 | 50,00 |
| TIC | 21,77 | 78,23 |

TCC, ticarcilina-clavulanato; IPM, imipenem; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; TIC, ticarcilina; PRL, piperacilina; CFP, cefoperazona, PPT, piperacilina-tazobactam; MER, meropenem; CPO, cefpiroma; CPM, cefepime.

Foram considerados multi-resistentes (MDR) os isolados que apresentaram susceptibilidade reduzida (perfil resistente ou intermediário) a pelo menos um antimicrobiano beta-lactâmico pertencente à pelo menos três subclasses diferentes (Paterson, 2006) (TABELA 3).

Considerando todos os isolados obtidos, foram identificados 51 perfis de susceptibilidade diferentes. Dezoito isolados foram sensíveis a todos os 11 antimicrobianos testados, totalizando 12,33%. Somente um isolado demonstrou susceptibilidade diminuída a todos os antimicrobianos testados. (TABELA 6).

TABELA 6 – Perfis de susceptibilidade por isolados de *Pseudomonas* spp provenientes de efluente hospitalar não tratado

| Nº de antimicrobianos com susceptibilidade diminuída | Nº de isolados com o perfil | Perfil de susceptibilidade diminuída | PPS | PAE | PME | PPU | PFL | POR | PLU | PAL | |
|--|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| Nenhum | 18 | - | 11 | 4 | - | 1 | - | 1 | 1 | - | |
| 1 | 3 | ATM | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | |
| | 2 | CAZ | 2 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 1 | PRL | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 9 | TIC | 5 | 1 | - | - | - | 2 | - | 1 | |
| 2 | 5 | ATM, TIC | 1 | - | - | 1 | 2 | - | - | 1 | |
| | 1 | CAZ, ATM | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 5 | TCC, TIC | 2 | 1 | - | - | 1 | 1 | - | - | |
| | 3 | TIC, PRL | 3 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 3 | 8 | TIC, PRL, CFP | 5 | 3 | - | - | - | - | - | - | |
| | 2 | CAZ, ATM, TIC * | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | |
| | 4 | IPM, CAZ, TIC * | 4 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 1 | TCC, ATM, TIC * | - | - | - | - | 1 | - | - | - | |
| | 2 | TCC, CAZ, TIC * | 2 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 4 | 1 | CAZ, TIC, CFP, CPM | - | 1 | - | - | - | - | - | - | |
| | 1 | CAZ, TIC, CFP, CPO | - | 1 | - | - | - | - | - | - | |
| | 1 | IPM, CAZ, CFP, CPM | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 1 | IMP, CAZ, TIC, CFP * | - | 1 | - | - | - | - | - | - | |
| | 3 | TCC, CAZ, ATM, TIC * | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | |
| | 1 | TCC, TIC, PRL, CFP * | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 3 | TIC, PRL, CFP, PPT * | 2 | - | - | 1 | - | - | - | - | |
| 5 | 2 | CAZ, TIC, PRL, CFP, CPM | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | |
| | 2 | TIC, PRL, CFP, CPO, CPM | 2 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 1 | CAZ, ATM, TIC, CPO, CPM * | - | - | 1 | - | - | - | - | - | |
| | 1 | CAZ, ATM, TIC, PRL, CFP * | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 1 | CAZ, ATM, TIC, PRL, CPM * | - | - | - | - | - | - | 1 | - | |
| | 1 | CAZ, TIC, CFP, CPO, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 1 | TCC, CAZ, ATM, TIC, PRL * | - | - | 1 | - | - | - | - | - | |
| | 6 | 1 | CAZ, TIC, PRL, CFP, CPO, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 1 | CAZ, TIC, PRL, CFP, PPT, CPM * | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| 1 | | IPM, CAZ, ATM, CFP, MER, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 1 | | IPM, CAZ, TIC, CFP, CPO, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |

TABELA 6 - Continuação - TABELA 6 – Perfis de susceptibilidade por isolados de *Pseudomonas* spp provenientes de efluente hospitalar não tratado

| | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 1 | IPM, CAZ, TIC, CFP, MER, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 2 | TCC, ATM, TIC, CFP, CPO, CPM * | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - |
| | 2 | TCC, CAZ, ATM, TIC, CFP, CPM * | - | - | 2 | - | - | - | - | - |
| | 1 | TCC, CAZ, TIC, CFP, CPO, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 1 | TCC, CAZ, TIC, PRL, CFP, PPT * | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | 4 | TCC, TIC, PRL, CFP, CPO, CPM * | 3 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | 7 | 4 | CAZ, TIC, PRL, CFP, PPT, CPO, CPM * | 2 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| 1 | | IPM, CAZ, TIC, PRL, CFP, MER, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | | TCC, CAZ, ATM, TIC, CFP, CPO, CPM * | 1 | - | 2 | - | - | - | - | - |
| 1 | | TCC, CAZ, TIC, PRL, CFP, CPO, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 | | TCC, IPM, CAZ, ATM, TIC, CFP, CPM * | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| 1 | | TCC, IPM, CAZ, TIC, CFP, CPO, CPM * | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | | 2 | TCC, CAZ, ATM, TIC, PRL, CFP, CPO, CPM * | - | 2 | - | - | - | - | - |
| | 2 | TCC, CAZ, ATM, TIC, PRL, CFP, PPT, CPM * | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - |
| | 3 | TCC, CAZ, TIC, PRL, CFP, PPT, CPO, CPM * | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | 9 | 4 | TCC, CAZ, ATM, TIC, PRL, CFP, PPT, CPO, CPM * | 2 | 2 | - | - | - | - | - |
| 1 | | TCC, IPM, CAZ, TIC, PRL, CFP, PPT, CPO, CPM * | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| 1 | | TCC, IPM, CAZ, TIC, PRL, CFP, PPT, CPO, CPM * | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| 11 | 1 | TCC, IPM, CAZ, ATM, TIC, PRL, CFP, PPT, MER, CPO, CPM * | - | 1 | - | - | - | - | - | |

TCC, ticarcilina-clavulanato; IPM, imipenem; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; TIC, ticarcilina; PRL, piperacilina; CFP, cefoperazona, PPT, piperacilina-tazobactam; MER, meropenem; CPO, ceftipiroma; CPM, cefepime. PPS, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; PAE, *Pseudomonas aeruginosa*; PME, *Pseudomonas mendocina*; PPU, *Pseudomonas putida*; PFL, *Pseudomonas fluorescens*; POR, *Pseudomonas oryzae*; PLU, *Pseudomonas luteola*; PAL, *Pseudomonas alcaligenes*. *, perfil MDR.

Entre os 66 isolados de *P. pseudoalcaligenes*, foram determinados 33 perfis de susceptibilidade diferentes, sendo que os mais encontrados foram: 11 sensíveis a todos os antimicrobianos testados; 5 com susceptibilidade diminuída somente à ticarcilina; 5 com susceptibilidade diminuída à ticarcilina, piperacilina e cefoperazona; 3 com susceptibilidade diminuída à ticarcilina e piperacilina; e 3 com susceptibilidade diminuída à ticarcilina-clavulanato, ticarcilina, piperacilina, cefoperazona, cefpiroma e cefepime. Também foi possível observar 2 isolados com susceptibilidade diminuída a 9 dos 11 antimicrobianos testados, com exceção dos carbapenêmicos, imipenem e meropenem. Foram encontrados 30 isolados MDR pertencentes a esta espécie (TABELA 6 e TABELA 7).

Entre os 26 isolados de *P. aeruginosa*, foram determinados 19 perfis de susceptibilidade diferentes, sendo que os mais encontrados foram: 4 sensíveis a todos antimicrobianos testados; 3 com susceptibilidade diminuída a ticarcilina, piperacilina e cefoperazona e 2 com susceptibilidade diminuída a ticarcilina-clavulanato, ceftazidima, aztreonam, ticarcilina, piperacilina, cefoperazona, cefpiroma e cefepime. Também foi possível observar 1 isolado com susceptibilidade diminuída a todos os antimicrobianos testados. Foram encontrados 14 isolados MDR pertencentes a esta espécie (TABELA 6 e TABELA 7).

Entre os nove isolados de *P. mendocina*, foram determinados sete perfis de perfis de susceptibilidade diferentes, sendo que os mais encontrados foram: dois com susceptibilidade diminuída a ticarcilina-clavulanato, ceftazidima, aztreonam, ticarcilina, cefoperazona e cefepime; e dois com

susceptibilidade diminuída a ticarcilina-clavulanato, ceftazidima, aztreonam, ticarcilina, cefoperazona, cefpiroma e cefepime. Todos os outros perfis encontrados tiveram somente um isolado, sendo que todos isolados pertencentes a essa espécie foram MDR (TABELA 6 e TABELA 7).

Para os sete isolados de *P. putida*, foi encontrado um perfil de susceptibilidade diferente para cada isolado da espécie, sendo que quatro deles encaixam-se no perfil de MDR (TABELA 6 e TABELA 7).

Entre os seis isolados de *P. fluorescens*, o único perfil de susceptibilidade que se repetiu para dois isolados foi susceptibilidade diminuída aos antimicrobianos aztreonam e ticarcilina, sendo que todos outros isolados tiveram perfis de susceptibilidade distintos. Três isolados obtidos preencheram os critérios para serem classificados como MDR (TABELA 6 e TABELA 7).

Para os cinco isolados de *P. oryzihabitans*, foram determinados quatro perfis de susceptibilidade diferentes. O perfil de susceptibilidade que se repetiu para dois isolados foi aquele que demonstrou susceptibilidade diminuída somente a ticarcilina, sendo que somente um isolado pertencente a esta espécie foi classificado como MDR (TABELA 6 e TABELA 7).

Entre os três isolados obtidos de *P. luteola*, todos demonstraram perfis de susceptibilidade distintos, sendo que somente um deles foi classificado como MDR (TABELA 6 e TABELA 7).

Para os dois isolados obtidos de *P. alcaligenes*, foram encontrados perfis de susceptibilidade diferentes. Nenhum foi classificado como MDR (TABELA 6 e TABELA 7).

De uma forma geral, foram encontrados perfis heterogêneos de susceptibilidade aos antimicrobianos testados, tanto entre as espécies, como sua distribuição dentro de cada uma delas. Também pode ser observado um alto número de isolados MDR, totalizando 62 (50%), sendo que a única espécie em que não se encontrou isolados MDR foi *P. alcaligenes*, com apenas dois isolados (TABELA 7).

Devido ao tipo de amostragem utilizada no estudo, é possível que a ocorrência alta de isolados MDR se deva ao fato da possível clonalidade dos isolados obtidos.

TABELA 7 - Distribuição de perfis de susceptibilidade distintos e ocorrência de isolados MDR entre as espécies de *Pseudomonas* spp isoladas de efluente hospitalar não tratado

| Espécie (n) | Nº de perfis de susceptibilidade diferentes | Nº isolados MDR |
|----------------------------------|---|-----------------|
| <i>P. pseudoalcaligenes</i> (66) | 33 | 30 |
| <i>P. aeruginosa</i> (26) | 19 | 14 |
| <i>P. mendocina</i> (9) | 7 | 9 |
| <i>P. putida</i> (7) | 7 | 4 |
| <i>P. fluorescens</i> (6) | 5 | 3 |
| <i>P. oryzihabitans</i> (5) | 4 | 1 |
| <i>P. luteola</i> (3) | 3 | 1 |
| <i>P. alcaligenes</i> (2) | 2 | 0 |

4.3 Leitura interpretada do perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados

Para a leitura interpretada do perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos, foram utilizados os critérios estabelecidos por Vila & Marco (2002); Livermore *et al.* (2004) e Picão & Gales (2007) onde são estabelecidos os prováveis mecanismos de resistência aos antimicrobianos

que podem estar presentes no isolado em questão, de acordo com o perfil de susceptibilidade do antibiograma realizado.

Em 45 isolados (36,30%), não pode ser definido um perfil de susceptibilidade de acordo com os critérios estabelecidos, sendo que nenhum destes foi considerado MDR. Nos 79 isolados (63,70%) restantes, puderam ser identificados 31 perfis de susceptibilidade distintos. Destes isolados que apresentaram algum perfil de susceptibilidade, 62 (78,48%) foram classificados como MDR.

TABELA 8 – Mecanismos de resistência deduzidos a partir de leitura interpretada do antibiograma em isolados de *Pseudomonas* sp obtidos a partir de efluentes hospitalares não tratados.

| Perfil de susceptibilidade | Nº de Isolados | Porcentagem (%) |
|--|----------------|-----------------|
| Penicilinase, Bomba efluxo MexXY-OprM | 10 | 8,06 |
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, PER-1 | 9 | 7,26 |
| GES-2, GES-5 | 6 | 4,84 |
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, PER-1, VEB-3 | 5 | 4,03 |
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM + Perda de Porina OprD, GES-2, GES-5 | 5 | 4,03 |
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN | 4 | 3,23 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, OXA-31, OXA-32 | 3 | 2,42 |
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, AmpC | 3 | 2,42 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, OXA-15, OXA-32, OXA-10, PSE-2 | 3 | 2,42 |
| AmpC, OXA 11, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-19, OXA-28, OXA-31, OXA-32 | 3 | 2,42 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, OXA-15, OXA-32 | 2 | 1,61 |

TABELA 8 - Continuação - Mecanismos de resistência deduzidos a partir de leitura interpretada do antibiograma em isolados de *Pseudomonas* sp obtidos a partir de efluentes hospitalares não tratados.

| | | |
|--|---|------|
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM | 2 | 1,61 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, Penicilinase, PSE 1 e 4, TEM 1 e 4, OXA-3 | 2 | 1,61 |
| Bomba efluxo MexEF-OprN, GES-2 | 2 | 1,61 |
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN, PER-1 | 2 | 1,61 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM | 2 | 1,61 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, PER-1, OXA-15, OXA-31, OXA-32 | 2 | 1,61 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, PSE 1 e 4, TEM 1 e 4, OXA-3 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, AmpC, PER-1, TEM-42, OXA-18, TEM-24, GES-8 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN, AmpC, OXA 11, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-19, OXA-28, TEM-42, OXA-18, TEM-24, GES-8, GES-9, VEB-3 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexEF-OprN, GES-2, GES-5 | 1 | 0,81 |
| AmpC, OXA-15 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, AmpC, PER-1, OXA-15, OXA-31 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, OXA-10, OXA-32 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, PER-1 | 1 | 0,81 |
| PSE 1 e 4, TEM 1 e 4, OXA-3 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, AmpC, OXA-31, OXA-32 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN, OXA-31, OXA-17 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, AmpC, OXA 11, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-19, OXA-28, OXA-32 | 1 | 0,81 |
| Bomba efluxo MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, PER-1, TEM-42, OXA-18, TEM-24, GES-8, TEM-21, GES-9 | 1 | 0,81 |
| OXA-32 | 1 | 0,81 |

4.4 Amplificação de genes de resistência aos beta-lactâmicos

Todos os 124 isolados foram submetidos à PCR para pesquisa de genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like} e *bla*_{OXA-51-like}, sendo que todos foram negativos para os genes pesquisados. Apesar dos perfis de susceptibilidade terem demonstrado um nível bastante alto de susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos entre os isolados no presente estudo, poucos estudos têm relacionado amostras não clínicas do gênero *Pseudomonas* a esses grupos de genes de resistência.

Fuentefria *et al.* (2009) identificaram nove isolados de *P. aeruginosa*, obtidos a partir de amostras de efluente hospitalar não tratado, positivos para o gene *bla*_{SPM-1} no Brasil. Além desse, o único estudo que relaciona MBLs com amostras não-clínicas do gênero consiste naquele realizado por Quinteira *et al.*, (2005) que identificou um isolado ambiental de *P. pseudoalcaligenes* produtor de VIM-2 a partir de uma amostra de esgoto urbano recebendo efluente hospitalar não tratado. Esses estudos reiteram o fato de que a resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, amplamente disseminada entre isolados clínicos, já é detectada em isolados ambientais. No presente estudo, a resistência aos carbapenêmicos ocorreu, mas não pode ser relacionada a esse tipo de enzimas.

Todos isolados com susceptibilidade diminuída (perfil intermediário ou resistente) ao imipenem ou meropenem foram submetidos à PCR para pesquisa de genes *bla*_{GES-like}, sendo que todos também foram negativos para este grupo de genes. Essa pesquisa foi realizada devido ao fato de que os isolados com susceptibilidade diminuída aos carbapenêmicos foram negativos

para pesquisa de genes de MBLs, e considerando que o grupo de enzimas GES e OXAs também podem conferir resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, esses determinantes também foram testados. O resultado negativo para os isolados pesquisados coincide com o fato de que, até o momento, não há descrição de isolados não-clínicos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* positivos para genes GES na literatura.

4.5 Determinação da CIM ao imipenem

Dos 124 isolados de *Pseudomonas* spp, apenas 15 foram resistentes ao imipenem, nenhum isolado apresentou perfil intermediário a este antimicrobiano. A determinação da CIM foi realizada porque os principais genes de beta-lactamase pesquisados que conferem resistência aos carbapenêmicos (carbapenemases), caso este do imipenem, não foram encontrados. Geralmente quando a resistência se deve ao fato da presença de carbapenemases, o CIM encontrado é alta (CIM > 32 µg/mL). Por outro lado, na maioria das vezes em que a resistência se deve a hiper-expressão de bombas de efluxo e/ou perda ou diminuição de expressão de OprD porina associada ou não a desrepressão do gene de beta-lactamase cromossômica AmpC, a CIM encontrada normalmente é baixa a moderada (8 a 32 µg/mL) (Kim *et al.*, 2005).

Na determinação da concentração inibitória mínima para o imipenem, foi possível determinar que três isolados tiveram uma CIM de 16 µg/mL, enquanto os 12 isolados restantes apresentaram uma CIM de 32 µg/mL. Portanto, todos podem ser classificados com resistência de nível baixo

a moderado. Dos 15 isolados resistentes ao imipenem, somente um, pertencente à espécie *P. pseudoalcaligenes*, não foi classificado como MDR (TABELA 9).

Apesar de já terem sido descritas outras beta-lactamases com capacidade de hidrolisar o carbapenêmico imipenem, algumas delas foram descartadas, neste caso as MBLs, GES e OXAs, uma vez que a realização da PCR apresentou somente resultados negativos. Assim, faz-se necessário considerar outras beta-lactamases do tipo carbapenemases, bem como outros mecanismos de resistência. O fato de ter sido demonstrado somente CIM de nível baixo a moderado a este antimicrobiano, juntamente com os resultados negativos para certos genes de carbapenemases testados no presente estudo, torna possível o fato de que outro mecanismo de resistência possa estar presente. Neste caso, pode ser citado a hiper-expressão de bombas de efluxo e/ou perda ou diminuição de expressão de OprD porina associada ou não a desrepressão do gene de beta-lactamase cromossômica AmpC. Quando levado em consideração os perfis de susceptibilidade determinados pela leitura interpretada, a existência de outros mecanismos de resistência relacionados torna-se também condizente (TABELA 8).

Kim *et al.* (2005) realizaram um estudo com isolados clínicos de *P. aeruginosa*, onde foi possível determinar que de um total de 14 cepas com CIM de nível muito alto ao imipenem (CIM >128 µg/mL), 12 foram positivas para o gene MBL *bla*_{VIM-2}. Além disso, Ziha-Zarifi *et al.* (2007) demonstraram que a superprodução da beta-lactamase cromossômicamente codificada AmpC e

também da bomba de efluxo MexAB-OprM estavam relacionadas com MICs de até 16 µg/mL.

TABELA 9 – Concentração inibitória mínima de *Pseudomonas* sp, distribuídos de acordo com a espécie e presença de multi-resistência

| Espécie | CIM (µg/mL) | Nº de isolados | Nº de isolados MDR |
|-----------------------------|----------------|----------------|--------------------|
| <i>P. pseudoalcaligenes</i> | 32 | 8 | 7 |
| <i>P. pseudoalcaligenes</i> | 16 | 2 | 2 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 16 | 1 | 1 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 32 | 3 | 3 |
| <i>P. oryzihabitans</i> | 32 | 1 | 1 |

4.6 Caracterização dos isolados quanto à presença de integrons

Todos isolados identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp foram submetidos à PCR para pesquisa de integrons, através da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores degenerados hep35 e hep36, que hibridizam com as regiões conservadas do gene da integrase dos integrons de classe 1, 2 e 3.

Sessenta e oito isolados foram positivos para esta amplificação, totalizando 54,93% do total de isolados obtidos. Destes isolados positivos, 37 (54,41%) foram MDR e 9 (13,23%) foram sensíveis a todos antimicrobianos testados. Os demais isolados integron positivos tiveram perfis de susceptibilidade variados. Este resultado demonstra que não existiu uma forte relação entre isolados MDR e presença de integrons. Fonseca *et al.* (2005) verificaram que 38% dos isolados MDR possuíam integrons, demonstrando que realmente um grande número de isolados MDR não estavam relacionados a esta estrutura genética. De fato, sabe-se que múltiplos mecanismos estão relacionados ao desenvolvimento de resistência no gênero *Pseudomonas*, nem

todos relacionados a integrons. O integron é um elemento importante e adicional para adquirir diversos mecanismos de resistência, mas não o único passível de determinar esta característica, apesar de que estes podem contribuir substancialmente para a disseminação de mecanismos de resistência (Livermore, 2002).

Apesar de não haver dados sobre a ocorrência de integrons em isolados provenientes de efluente do gênero *Pseudomonas*, Fonseca *et al.* (2005), pesquisando a presença de integrons de classe 1 entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* no Brasil, determinaram que 41,50% destes isolados eram positivos para integrons classe 1, dado que se aproxima daquele encontrado no presente estudo. Neste mesmo estudo, foram encontrados isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados, mas mesmo assim integrons positivos, fato que ocorreu em nove (13,23%) dos isolados identificados no presente estudo.

Somente isolados das espécies *P. pseudoalcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. oryzihabitans* e *P. luteola* foram integron positivos no presente estudo, sendo que as quatro primeiras espécies já foram anteriormente relacionadas na literatura com integrons. Provavelmente isso se deve ao fato de que, por serem bactérias raramente causadoras de infecções em seres humanos, poucos estudos foram realizados considerando a presença de integrons, bem como sua relação com a multi-resistência.

Gaze *et al.* (2005) fizeram uma comparação entre isolados de ambientes contaminados com compostos de amônio quaternário e ambientes não-contaminados, verificando que os isolados integron positivos foram mais

freqüentes quando retirados dos ambientes contaminados. Eles também verificaram que dos 19 isolados integrons positivos provenientes do ambiente contaminado com compostos de amônio quaternário, 18 eram carreadores do gene *qacE*, sendo este um gene funcional de efluxo multi-drogas carreado em integrons de classe 1, conferindo resistência aumentada a uma variedade de compostos de amônio quaternário e biguanidinas.

Este fato é de suma importância, pois é necessário levar em consideração a diversidade metabólica de algumas espécies do gênero *Pseudomonas*. Pode-se citar como exemplo *P. fluorescens*, já reportada como capaz de crescer tendo um certo tipo de composto de amônio quaternário como sua única fonte de carbono. Também é relevante o fato de que concentrações sub-letais de compostos de amônio quaternário e/ou biguanidinas presentes em certos tipos de efluente serão responsáveis pela diminuição da viabilidade celular de bactérias que não possuam genes responsáveis pela sua extrusão ou degradação. Neste caso, os isolados positivos para integron com genes conferindo resistência a compostos de amônio quaternário e/ou biguanidina terão uma vantagem seletiva nestes ambientes, além da vantagem de poderem utilizar certos destes compostos como fonte de carbono para seu crescimento.

A importância desta característica reside no fato de que no Brasil, a clorexidina, uma biguanidina, é amplamente utilizada em hospitais e consultórios dentários. Levando-se em consideração que seu descarte poderá ocorrer no efluente hospitalar não tratado, é possível que isso contribua para a ocorrência de um número tão elevado de isolados integron positivos no

presente estudo, dado este nunca demonstrado neste tipo de amostragem e em isolados ambientais.

Considerando-se que os cassetes gênicos comumente presentes nos integrons geralmente determinam fatores de resistência, e sendo que os integrons em si estão normalmente localizados em plasmídeos e transposons, deve-se levar em conta a importância da alta porcentagem de isolados integrons positivos encontrados no presente estudo. Como os isolados foram recuperados a partir de efluente hospitalar não tratado, esses podem estar contribuindo para a disseminação dos genes de resistência, bem como agindo como reservatório para os mesmos.

4.6.1 Identificação dos integrons de classe 1

Todos os isolados identificados como positivos com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores hep35 e hep36 foram submetidos à reação da PCR para determinar a classe desses integrons. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da integrase 1, *intl1f* e *intl1r*, mais comum entre *P. aeruginosa*. Dos 68 isolados positivos com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores hep35 e hep36, 52 (76,47%) foram confirmados como pertencentes à classe 1 através da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores específicos.

No presente estudo, não pode ser determinada a presença de isolados positivos para integrons de classe 2 e 3. Isso possivelmente se deve ao fato que outras classes de integrons são menos freqüentes do que os integrons de classe 1, bem como o fato de que os integrons de classe 2 ainda

não foram identificados em isolados do gênero *Pseudomonas*. Até o momento, integrons de classe 3, no gênero *Pseudomonas*, só foram identificados em quatro isolados clínicos de *P. putida* (Shibata *et al.*, 2003).

Apesar de também estarem relacionados a fatores de resistência, os integrons de classe 2 em bacilos gram negativos não fermentadores de glicose estão restritos a cepas de *Acinetobacter* spp MDR, com sua presença já relatada em várias partes do mundo, segundo Ramirez *et al.* (2005). Henriques *et al.* (2006) determinaram a ocorrência das classes de integrons em isolados gram negativos resistentes à ampicilina obtidos a partir de amostras de águas de rio em Portugal, sendo que 29,60% dos isolados da família Enterobacteriaceae e 21% dos isolados de *Aeromonas* foram positivos para integrons de classe 1, enquanto que os de classe 2 estavam presentes somente em 4% dos isolados de Enterobacteriaceae. Roe *et al.* (2003) demonstraram que a prevalência de integrons classe 1 era quatro vezes maior que a de integrons de classe 2, em isolados de *Escherichia coli* obtidos a partir de amostras de rio, nos Estados Unidos. Já Seward (1999) realizando pesquisa com amostras clínicas de surto *Acinetobacter* sp em 11 países diferentes, determinou que 17 dos 25 isolados pesquisados foram positivos para integron classe 1, enquanto que somente um isolado positivo para classe 2 e nenhum isolado de classe 3 foram encontrados. Shibata *et al.* (2003) obtiveram 587 isolados bacilos gram negativos resistentes a ceftazidima e a uma combinação de sulbactam e cefoperazona; dentre estes, 427 apresentaram o gene da integrase 1. Quatro isolados, identificados como *Pseudomonas putida* apresentaram, juntamente com o gene da integrase 1, o gene da integrase 3.

4.6.2 Clivagem com endonuclease de restrição do produto de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores hep35 e hep 36

Os 16 isolados positivos para presença de integron, mas negativos para o integron de classe 1, foram submetidos à clivagem com endonuclease de restrição, com o intuito de estabelecer a classe a qual estes isolados pertenciam de acordo com o padrão de fragmentos gerados (White *et al.*, 2001;TABELA 4).

Não foi possível determinar a classe de integron a qual estes isolados pertenciam, pois observou-se que o produto de PCR permanecia inalterado após a clivagem com endonucleases de restrição. Essa característica seria determinante de integron classe 1, mas como esses isolados foram negativos com a utilização do par de oligonucleotídeos iniciadores específicos, acredita-se que a padronização da clivagem não foi eficaz. A principal dificuldade evidenciada para a padronização desta técnica reside no fato de que somente controles de integrons de classe 1 estavam disponíveis, impossibilitando a realização da mesma de forma eficiente.

5. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, pode-se concluir o seguinte.

Quanto à distribuição de espécie entre os isolados, foram encontradas sete espécies diferentes de *Pseudomonas*. A espécie mais freqüente foi *P. pseudoalcaligenes*, seguida de *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. oryzihabitans*, *P. luteola* e *P. alcaligenes*; fato este que demonstra a ocorrência de diferentes espécies do referido gênero presentes no efluente hospitalar não tratado.

De uma forma geral, pode ser observada uma sensibilidade maior dos isolados aos antimicrobianos carbapenêmicos, enquanto que as maiores taxas de resistência foram encontradas para certas cefalosporinas, carboxipenicilinas e aminopenicilinas. Também pode ser observado um alto número de isolados MDR, quando levado em consideração que os isolados foram provenientes de amostra ambiental. Um baixo número de isolados apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Também pode ser observado um alto número de isolados MDR, sendo que a única espécie

em que não se encontrou isolados MDR foi *P. alcaligenes*, com apenas dois isolados.

Nenhum isolado foi positivo para os genes de beta-lactamases pesquisados através de PCR: *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{GES-like}.

Sessenta e oito isolados foram positivos para integrons. Destes, 52 foram identificados como pertencentes à classe 1. Não pode ser determinada a presença de integrons de classe 2 e 3.

Neste trabalho, os dados obtidos corroboram que os efluentes hospitalares não tratados analisados podem servir de fonte de contaminação ambiental, pois implicam no descarte de bactérias resistentes aos antimicrobianos e, no caso dos isolados deste estudo, também positivas para integrons. As bactérias contendo este elemento de mobilidade genética podem contribuir para a disseminação de determinantes de resistência, bem como servir de reservatório em potencial para estes genes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É necessário estabelecer se os isolados obtidos no efluente hospitalar não tratado são provenientes do ambiente hospitalar, em consequência deste descarte sem tratamento prévio, através de técnicas de caracterização molecular.

A pesquisa de outros determinantes de resistência, como aqueles apontados pela leitura interpretada do antibiograma, seria uma forma de enriquecer a caracterização dos isolados obtidos no presente estudo. Isso seria relevante, uma vez que, apesar da alta taxa de resistência encontrada a certos antimicrobianos, bem como a presença de um alto número de isolados MDR, não foram encontrados isolados positivos para os genes de resistência pesquisados.

Também seria interessante determinar, através de seqüenciamento, à quais classes os integrons que não puderam ser identificados com o par de oligonucleotídeos iniciadores inespecíficos utilizados neste estudo pertencem, bem como avaliar com esta mesma metodologia, quais os cassetes gênicos

que compõem os integrons positivos deste estudo, determinando assim, os mecanismos de resistência responsáveis pelos perfis de resistência aos antimicrobianos encontrados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. M. *et al.* Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 371-374, 2005.

_____. Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan. **Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1685-1691, 2006.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 289, p. 321-331, 1980.

ANZAI, Y. *et al.* Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.50, p. 1563–1589, 2000.

ARAGONE, M. R. *et al.* *Pseudomonas mendocina*, an environmental bacterium isolated from a patient with human infective endocarditis. **Journal of Clinical Microbiol.**, v. 30, n. 9, p. 1583-1584, jun. 1992.

BARLOW, R. S. *et al.* Isolation and characterization of Integron-containing bacteria without antibiotic selection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 838-842, 2004.

BENNETT, P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **J Antimicrob Chemother**, v. 43, p. 1-4, 1999.

BISKRI, L.; MAZEL, D. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3326-3331, 2003.

BOSCHI, L. *et al.* The *Legionella (Fluoribacter) gormanii* metallo- β -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1538-1543, 2000.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n. 4, p. 933–951, out. 2001

BUSH, K. *et al.* Characterization of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 259-263, 1989.

_____. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

CARPENTER, R.J. *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine: a case report and review of the literature. **Journal of Infection**, v. 56, n. 4, p. 234-240, abr. 2008.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4654-4661, 2004.

CHEN, M. J. & WANG, H. Continuous surveillance of antimicrobial resistance among nosocomial gram-negative bacilli from intensive care units in China. **China Nosocomial Pathogens Resistance Surveillance Study Group**, v. 83, p. 375-381, 2003.

CHI, C.Y. *et al.* *Pseudomonas mendocina* spondylodiscitis: a case report and literature review. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, n. 11-12, p. 950 – 953, nov. 2005.

CLARK, C. A. *et al.* The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. **Microbiology**, v. 146, p. 2605-2612, 2000.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 15th Informational Supplement.**, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

COLLIS, C. M. *et al.* Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. **J Bacteriol.**, v. 184, p. 3017-3026, 2002.

_____ & HALL, R. M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 155-162, 1995.

CORREIA, M. *et al.* Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 2838-2843, 2003.

DOCQUIER, J. D. *et al.* IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 1522-1528, 2003.

DUNNE, W. M.; HARDIN, D.J. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. and *Serratia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.. 43, n. 12, p. 5945-5949, dez. 2005.

EMPEL, J. *et al.* Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2829-2834, jul. 2007.

FONSECA, E.L. *et al.* Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 303–309, 2005.

FUENTEFRIA, D. B. *et al.* Spread of Metallo-beta-lactamases: Screening reveals the presence of a *bla*_{SPM-1} gene in hospital sewage in southern Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v. 40, n.1, p. 82-85, 2009

GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed., 1984.

GAZE, W.H. *et al.* Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1802-1807, maio 2005.

GIULIANI, F. *et al.* OXA-46, a new class D β -lactamase of narrow substrate specificity encoded by a *bla*_{VIM-1}-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1973-1980, 2005.

GRÄF, T. *et al.* Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 306-308, maio-jun, 2008

GUTIÉRREZ, O. *et al.* Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spanish hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4329-4335, dez. 2007.

HANSSON, K. *et al.* IntI2 integron integrase in Tn7. **Journal of Bacteriology**. v. 184, n. 6, p. 1712-1721, mar. 2002.

HENRICHFREISE, B. *et al.* Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 4062-4070, nov. 2007.

HENRIQUES, I.S. *et al.* Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Res Microbiol.** , v. 157, n. 10, 938-947, dez. 2006.

HOUANG, E. T. S. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo- β -lactamase (*bla*_{IMP-4}) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 1382-1390, 2003.

ITO, H. *et al.* Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 824-829, abr. 1995.

- JACOBY, G.A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22. n.1 p. 161-182, jan. 2009.
- JACOBY, G.A.; MUNOZ-PRICE, The New Beta – Lactamases. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 4, p. 380-391, jan. 2005.
- JEANNOT, K. Resistance and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Overproducing the MexCD-OprJ Efflux Pump. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2455-2462, jul. 2008.
- JEONG, S.H. *et al.* Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p.423-431, ago. 2006.
- JUAN, C. *et al.* Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4733–4738, nov. 2005.
- KIM, I. *et al.* Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo- β -Lactamase producers in a korean hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 11, p. 355-359, 2005.
- KOH, T.H. *et al.* IMP-1 and a novel metallo- β -lactamase, VIM-6, in fluorescent *Pseudomonads* isolated in Singapore 2004, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2334–2336, jun. 2004.
- LACHMAYR, K.L. *et al.* Quantifying nonspecific TEM β -Lactamase (*bla*_{TEM}) genes in a Wastewater Stream. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 203-211, jan. 2009
- LAURETTI, L. *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.
- LEE, K. *et al.* Evaluation of etest MBL for detection of *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-2} allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n. 2, p. 942-944, fev. 2005.
- _____. *bla*_{VIM-2} Cassette-containing *Bacillus cereus* novel integrons in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a korean hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1053-1058, abr. 2002.
- LIBISCH, B. *et al.* Molecular epidemiology of VIM-4 Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* sp. isolates in Hungary. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4220–4223, dez. 2006.
- LIM, H. M. *et al.* Cloning, nucleotide sequence, and expression of the 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 6, p. 2873-2878, jun. 1988.
- LIVERMORE, D. M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–584, out. 1995

_____. *et al.* Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **J Antimicrob Chemother.**, v. 48, n. 1, p. 87-102, jul. 2004. Suplemento.

_____. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? **Clin Infect Dis.** V. 34, n. 5, p. 634-640, jan.-mar. 2002.

LOMBARDI, G. *et al.* Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.11 p. 4051-4055, nov. 2002.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.** 3rd. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MADIGAN, M. **Brock Biology of Microorganisms.** 11rd ed. New York: Prentice Hall Press, 2005.

MAMMERI, H. *et al.* Chromosome-encoded β -lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 Metalloenzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3561-3567, nov. 2002.

MAMMINA, C. *et al.* Identification of *Shigella sonnei* biotype g isolates carrying class 2 integrons in Italy (2001 to 2003). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5 p. 2467-2470, ,maio 2005.

MARRA, A. R. *et al.* Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 388-390, jan. 2006.

MASSIDDA, O. *et al.* The *Aeromonas hydrophila cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 15, p. 4611-4617, ago. 1991.

MASUDA, N. *et al.* Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n. 12, p. 3322-3327, dez. 2000.

MATHEWSON, J.J.; SIMPSON, R.B. Glucose-nonfermenting gram-negative bacilli associated with clinical veterinary specimens. **J Clin Microbiol.**, v. 15, n. 6, p. 1015-1018, jun. 1982.

MAZEL, D. Integrons and the origin of antibiotic resistance gene cassettes. **ASM News**, v. 70, p. 520-525, 2004.

MENDES, R. E. *et al.* Metallo- β -lactamases. **J. Brás. Patol. Méd. Lab.**, v. 42, n. 2, p. 103-113, abr. 2006.

_____. Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4693-4702, dez. 2004.

- MERT, A. *et al.* Native valve endocarditis due to *Pseudomonas mendocina* in a patient with mental retardation and a review of literature. **Scand J Infect Dis.**, v. 39, n. 6, p. 615-616, 2007.
- MESAROS, N. *et al.* A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 378-386, fev. 2007.
- MICHAEL, C. A. *et al.* Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. **Am. Nat.**, v. 164, n. 1, p. 1-12, maio, 2004.
- PALLERONI, N.J. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. pp.141-99.
- MORENO, R.C. Lectura interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica? **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.** V. 20, n. 4, p. 176-186, 2002.
- NAAS, T. *et al.* Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing β -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 267-273, jan. 2003.
- NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, dez. 2003.
- OSANO, E. *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo-beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 38, n. 1, p. 71-78, jan. 1994.
- PALLERONI, N.J. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. **Microbiology**, v. 149, p.1-7, 2003.
- PARTRIDGE, S. R. *et al.* Definition of the attI1 site of class 1 integrons. **Microbiology**, v. 146, p. 2855-2864, 2000.
- PATERSON, D. L. The epidemiological profile of Infections with Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter Species*. **CID**, v. 43, Suppl 2, p. S43-S48, 2006.
- PEIRANO, G. *et al.* Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 305-309, jun. 2006.
- PHILIPPON, A. *et al.* Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 1-11, jan 2002.

PHILLIPS, I. B. A.; SHANNON, K. P. The mechanisms of resistance to aminoglycosides in the genus *Pseudomonas*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 4, p. 121-129, 1978

PICÃO, R. C.; GALES, A. C. β -Lactamases de espectro ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: pesadelo ou só imaginação? **Prática Hospitalar**, v. 10, n. 49, jan.-fev. 2007.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382-402, abr. 2006.

POIREL, L. *et al.* Carbapenem-hydrolysing metallo- β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Australia. **Pathology (Philadelphia)**, v. 36, n. 4, p. 366-367, ago. 2004.

_____. *et al.* Class II transposon-borne structure harboring metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas putida*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n.8, p. 2889-2891, ago. 2006.

POOLE, K. *et al.* Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **J Bacteriol.**, v. 175, n. 22, p. 7363-7372, nov. 1993.

POOLE, T. L. *et al.* Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Strains Isolated from Community Wastewater from a Semiclosed Agri-Food System in Texas. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4382-4385, out. 2005.

QUEENAN, A. M., BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, jul. 2007

QUINTEIRA, S. *et al.* Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- β -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 451-453, jan. 2005.

_____. *et al.*, 2005 First Isolation of *bla*_{VIM-2} in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2140-2141, maio 2005.

RAMIREZ, M. S. *et al.* Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4418-4420, out. 2005.

RASMUSSEN, B. & BUSH, K. Carbapenem-Hydrolyzing- β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 223-232, 1997.

RODRIGUEZ, I. *et al.* Large conjugative plasmids from clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-associated drug resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1603-1607, abr. 2006.

- ROE, M. T. *et al.* Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 7, p. 822-826, jul. 2003
- SADER, H. S. *et al.* IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian hospital. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 11, n. 1, p. 73-76, jan. 2005.
- SANDVANG, D. *et al.* Translocation of integron-associated resistance in a natural system: acquisition of resistance determinants by Inc P and Inc W plasmids from *Salmonella enteric* Typhimurium DT104. **Microb Drug Resist.**, v. 8, n. 3, p. 151-160, 2002.
- SEWARD, R.J. Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 5, n. 6, p. 308-318, 1999.
- SHIBATA, N. *et al.* PCR typing of genetic determinants 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, n. 12, p. 5407-5413, dez. 2003.
- SPIPKER, T. *et al.* PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n.5, p. 2074-2079, maio 2004.
- STOKES, H. W. *et al.* Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. **Mol. Microbiol.**, v. 26, n. 4, p. 731-745, nov. 1997.
- TAMBER, S. *et al.* Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 1, p. 45-54, jan. 2006.
- TÉRAN, W. *et al.* Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3067-3072, out. 2003.
- TOLEMAN, M. 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 Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-679, nov. 2002.
- _____. *et al.* *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 329-332, jan. 2004.
- TRIAS, J.; NIKAIDO, H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 34, n. 3, p. 52-57, mar. 1990.
- TUMÉO, E. *et al.* Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients recovered in the hospital effluents? **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, n.1-2, p. 200-204, mar. 2008.

- VALI, L. *et al.* Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* O26, O103 and O145 shed by two cohorts of Scottish beef cattle. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 403-410, fev. 2007.
- VILA, J.; MARCO, F. Lectura Interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 20, n. 6, p. 304-312, ago 2002.
- WALSH, T. R. *et al.* Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, abr. 2005.
- WALSH, T. R. *et al.* Evaluation of a new e-test for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2755-2759, ago. 2002.
- WALSH, T. R. *et al.* Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1218, n. 2, p. 199-201, jun. 1994.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373-383, jan. 2006.
- WANG, Y. *et al.* Regulation of membrane Permeability by a Two-Component Regulatory System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 47, n. 1, p. 95-101, mar. 2003.
- WELDHAGEN, G. F. *et al.* Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2385-2392, ago. 2003.
- WHITE, P. A. *et al.* Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2658-2661, set. 2001.
- WOLTER, D. J. *et al.* Increased expression of ampC in *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected with ciprofloxacin. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n. 8, p. 2997-3000, ago. 2007.
- WOODFORD, N., *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.
- www.lahey.org/studies/other.asp, acessado em 15 de março de 2009.
- YAMANO, Y. *et al.* Outer membrane proteins responsible for the penetration of beta-lactams and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 26, n. 5, p. 175-184, set. 1990.
- YAN, J. *et al.* Metallo-beta-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, n. 8 p. 2224-2228, ago. 2001.

YATSUYANAGI, J. *et al.* Class 1 integron metallo-beta-lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 48, n. 2, p. 626-628, 2004.

YUM, J. H. *et al.* A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 42, p. 217-219, 2002.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1148-1151, out. 2005.

ZIHA-ZARIFI, I. *et al.* In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system *mexA-mexB-oprM*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 43, n. 2, n. 287-291, 2007.

8. APÊNDICES

8.1 Listagem de fabricantes de reagentes, meios de cultura e de identificação utilizados

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| Ácido Acético | Biogen |
| Ácido Bórico | Biogen |
| Acrilamida | GE HealthCare |
| Ágar Bacteriológico | Acumedia |
| Ágar Bacteriológico | Acumedia |
| Ágar MacConkey | Himedia |
| Ágar Mueller-Hinton | Oxoid |
| Agarose | BioAgency |
| Água peptonada | Biobrás Diagnósticos |
| Amido | Biobrás Diagnósticos |
| Azul de Bromofenol | USB |
| BHI | Himedia |
| Bisacrilamida | Amersham BioSciences |
| Brometo de etídeo | Promega |
| Caldo Müller-Hinton | Himedia |
| Disco aztreonam | Cefar |
| Disco cefepime | Cefar |
| Disco cefoperazona | Cefar |
| Disco cefpiroma | Cefar |
| Disco ceftazidima | Cefar |
| Disco imipenem | Cefar |
| Disco meropenem | Cefar |
| Disco piperacilina | Cefar |
| Disco piperacilina-tazobactam | Cefar |
| Disco ticarcilina | Cefar |
| Disco ticarcilina-clavulanato | Cefar |

| | |
|------------------------|------------------------|
| DNTP | LGCBio |
| EDTA | Biogen |
| Extrato de Carne | Biobrás Diagnósticos |
| Filtro 0,45 µm | SES |
| Gelatina | Biobrás Diagnósticos |
| Glicose | Biobrás Diagnósticos |
| GoTaq | Promega |
| Imipenem Pó | Merck, Sharp & Dohme |
| Ladder 100pb | Gibco |
| Maltose | Biobrás Diagnósticos |
| MgCl ₂ | Pht |
| NaCl | Synt |
| OF | Biobrás Diagnósticos |
| Peptona bacteriológica | Biobrás Diagnósticos |
| Persulfato de Amônio | Promega |
| Rsal | Fermentas LifeSciences |
| Taq DNA Polimerase | Invitrogen |
| TEMED | Promega |
| Tiras de Oxidase | Laborclin |
| Tris-Base | Invitrogen |
| Tris-HCl | Invitrogen |
| TSA | Acumedia |
| TSB | Himedia |

8.2 Listagem de fabricantes e modelos de equipamentos

utilizados

| | |
|---------------------|---|
| Autoclave vertical | Phoenix Equipamentos Científicos (001-86) |
| Balança analítica | Marte Balanças e Equipamentos (AL 200C) |
| Banho-maria | B. Braun Biotech (1053/522) |
| Destilador de água | Biomatic (7019) |
| Estufas incubadoras | DeLeo Equipamentos Científicos LTDA. (DI-CBE) |
| Freezer vertical | Prosdócimo (F25 Smile) |
| Geladeira | Electrolux (R280) |
| Microscópio | Olympus (CX40) |
| Termociclador | Eppendorf (Mastercycler Personal) |
| Vórtex | B. Braun Biotech International (Certomat-MV) |
| Microondas | Brastemp Maxi |

8.3 Listagem e composição das soluções utilizadas

Tris-HCl 1M pH 8.0

| | |
|----------------|-----------|
| Tris | 121,14 g |
| Água Destilada | 1000,0 mL |

Ajustar o pH com HCl 1 M.

EDTA 0,5M pH 8.0

| | |
|----------------|-----------|
| EDTA | 186,12 g |
| Água destilada | 1000,0 mL |

Ajustar o pH com solução de NaOH 1M e autoclavar a 121°C, 1 atm, 10 minutos. Armazenar à temperatura ambiente.

NaOH 1M

| | |
|--------------------|-----------|
| Hidróxido de sódio | 40,0 g |
| Água destilada | 1000,0 mL |

Tris-HCl 10 mM pH 7,5

| | |
|----------------|-----------|
| Tris | 1,121 g |
| Água destilada | 1000,0 mL |

Agarose 1%

| | |
|---------------|----------|
| Agarose | 1,0 g |
| Tampão TAE 1x | 100,0 mL |

Tampão TAE 50 x

| | |
|-----------------------|-----------|
| Tris-HCl | 242,0 g |
| Ácido Acético Glacial | 57,1 mL |
| EDTA 0,5 M pH 8.0 | 100,0 mL |
| Água Destilada q.s.p. | 1000,0 mL |

Tampão TAE 1X

| | |
|----------------|-----------|
| Tampão TAE 50x | 20,0 mL |
| Água Destilada | 1000,0 mL |

Tampão de corrida 6x

| | |
|--------------------|---------|
| Azul de bromofenol | 0,005 g |
| Sacarose | 0,8 g |
| Água Destilada | 2,0 mL |

Armazenar a – 4°C.

Gel de poliacrilamida não desnaturante 8% (20 mL)

| | |
|--------------------------|----------|
| Acrilamida 30% | 5,32 mL |
| Água Destilada | 10,54 mL |
| TBE 5X (pH 8.3) | 4,0 mL |
| Persulfato de amônio 10% | 0,140 mL |
| TEMED | 14 µl |

Acrilamida 30%

| | |
|----------------|----------|
| Acrilamida | 29,0 g |
| Bisacrilamida | 1,0 g |
| Água Destilada | 100,0 mL |

Dissolver o pó em banho-maria a 37°C. Armazenar em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Persulfato de amônio 10%

| | |
|----------------------|---------|
| Persulfato de amônio | 1,0 g |
| Água Destilada | 10,0 mL |

Distribuir alíquotas de 140 µl e congelar a – 4°C.

TBE 5X

| | |
|-----------------------|-----------|
| Tris-base | 54,0 g |
| Ácido bórico | 27,5 g |
| EDTA 0,5M pH 8.0 | 20 mL |
| Água Destilada q.s.p. | 1000,0 mL |

TBE 1X

| | |
|-----------------------|-----------|
| TBE 50X | 200,0 mL |
| Água Destilada q.s.p. | 1000,0 mL |

8.4 Identificação bioquímica

| Espécie | Prova bioquímica | | | | | |
|-----------------------------|------------------|---------|---------------------|-------------------|----------|---------|
| | TSB 42° C | Oxidase | Oxidação da glicose | Oxidação do amido | Gelatina | Maltose |
| <i>P. aeruginosa</i> | + | + | + | - | +(82) | - |
| <i>P. fluorescens</i> | - | + | + | - | + | - |
| <i>P. putida</i> | - | + | + | - | - | -(31) |
| <i>P. stutzeri</i> | +(69) | + | + | + | - | + |
| <i>P. mendocina</i> | + | + | + | - | - | - |
| <i>P. pseudoalcaligenes</i> | + | + | -(9) | - | - | - |
| <i>P. alcaligenes</i> | + | + | - | - | + | - |
| <i>P. luteola</i> | + | - | + | - | +(61) | + |
| <i>P. oryzihabitans</i> | -(31) | - | + | - | -(17) | + |

A porcentagem de amostras positivas para cada teste e espécie se encontra entre parêntesis () (MacFaddin, 2000).