

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES DE rDNA-PCR E tDNA-PCR**  
**PARA A TIPAGEM DE ISOLADOS CLÍNICOS DE**  
*Pseudomonas aeruginosa*

**ISABEL CRISTINA GUERRA SPACOV**

**Recife, PE**  
**Março, 2005**

**ISABEL CRISTINA GUERRA SPACOV**

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES DE rDNA-PCR E tDNA-PCR  
PARA A TIPAGEM DE ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de **Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco**, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Mestre em Genética**.

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior**,  
Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas - UFPE.  
Setor de Biologia Molecular, LIKA - UFPE.

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Maria Camargo de Moraes**,  
Depto. de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas  
- UPE. Setor de Biologia Molecular, LIKA - UFPE.

**Recife, PE  
Março, 2005**

**Spacov, Isabel Cristina Guerra**  
**Utilização de marcadores de rDNA-PCR e tDNA-PCR para tipagem de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* / Isabel Cristina Guerra Spacov. – Recife : O Autor, 2005.**  
**71 folhas : il., fig., tab.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2005.**

**Inclui bibliografia e apêndice.**

**1. Ciências biológicas – Genética. 2. *Pseudomonas aeruginosa* – Características gerais – Genotipagem. 3. Tipagem molecular – Técnica de rDNA-PCR, tDNA-PCR, Duplex-PCR. I. Título.**

**577.21  
579.135**

**CDU (2.ed.)  
CDD (20.ed.)**

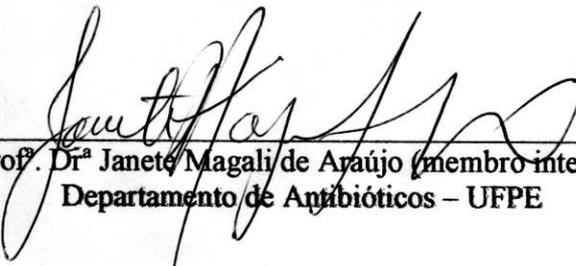
**UFPE  
BC2005-121**

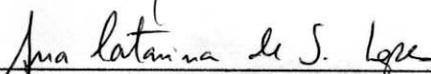
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

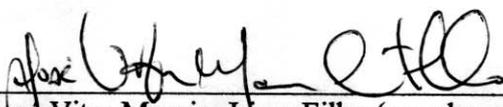
**PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA**

Parecer da Comissão Examinadora de defesa de **Dissertação de Mestrado**, com área de concentração em **Biologia Molecular**, de **Isabel Cristina Guerra Spacov**, sob o título: “Utilização de marcadores de rDNA-PCR e tDNA-PCR para a tipagem de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*”. Tendo como orientador Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas - UFPE e Co-Orientadora Profª Drª Márcia Maria Camargo de Moraes, Depto. de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas - UPE.

A Comissão Examinadora composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **Isabel Cristina Guerra Spacov**, aprovada com distinção.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Drª Janete Magali de Araújo (membro interno)  
Departamento de Antibióticos – UFPE

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Drª Ana Catarina de Souza Lopes (membro externo)  
Departamento de Medicina Tropical/Área de Microbiologia – UFPE

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho (membro externo)  
Departamento de Biologia/Área de Microbiologia – UFRPE

Recife, 08 de Março de 2005

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Márcia Maria Camargo de Moraes**, Depto. de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas - UPE. Setor de Biologia Molecular, LIKA – UFPE, pelo incentivo na conquista de mais uma etapa na área acadêmica;

Ao Prof. Dr. **Marcos Antônio de Moraes Júnior**, Depto. de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas - UPE. Setor de Biologia Molecular, LIKA – UFPE, pelo voto de confiança.

A **diretoria e Comitê de Ética do Hospital Oswaldo Cruz – HUOC**, Recife-PE, Brasil, pela utilização das instalações do Laboratório de Bacteriologia;

Ao Prof. **Carlos Cabral**, Chefe do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife-PE, por ter proporcionado desde minha graduação um espaço para minha iniciação na área microbiológica. Em especial as Dras. **Marinalda Vilela** e **Sandra Souza** pela cordialidade. A **Vanessa, Bruno, Valter, Gabriela** e **aos demais**, pela disponibilidade constante;

A diretoria do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, na pessoa do Prof. Dr. **José Luiz de Lima Filho**, pela utilização das instalações do mesmo;

A **Fundação Oswaldo Cruz, INCQS**, Rio de Janeiro, Brasil, pelas cepas de referência das espécies do gênero *Pseudomonas*;

Ao *Pseudomonas Genome Project*, pela cepa de referência mapeada.

A **turma do Mestrado** em Genética da UFPE 2003, pelo carinho. Em especial a **Tatianny** e **Éden**. Bem como a todos envolvidos no Mestrado em Genética, desde a secretaria aos professores;

A **Susi**, aluna de Iniciação Científica do Setor de Biologia Molecular do LIKA - UFPE, pelas idas e vindas... E principalmente, pela seriedade e leveza de ser na consubstanciação desta pesquisa;

Aos colegas do Setor de Biologia Molecular do LIKA - UFPE, pela solicitude: a **Kelly** – pois tudo que ela toca “vira ouro” –, **Erilane, Ellayne, Ruti, Alessandra, Karina, Fernanda, Catarina,...** E aos demais;

Ao **peçoal dos Setores de Microscopia Eletrônica, Biotecnologia e Bioquímica do LIKA** pela disponibilidade em momentos imprescindíveis;

Aos **que fazem parte dos Departamentos de Microbiologia e Imunologia, CPqAM**, pela gentileza;

A **Dr<sup>a</sup> Alzira Maria Paiva de Almeida** do Departamento de Microbiologia, CPqAM, pelas sugestões;

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu marido Tedy Ander, companheiro de todas as horas, e a nossa filha Victoria, que inicia sua vida em nossas vidas.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	08
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	09
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b>	12
<b>RESUMO</b>	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
<b>2.1. Características gerais</b>	15
<b>2.2. Epidemiologia</b>	17
<b>2.3. Adesão, colonização, invasão e disseminação</b>	18
<b>2.4. Patologia</b>	19
<b>2.5. Fatores de virulência</b>	19
<b>2.6. Resistência a antimicrobianos</b>	20
<b>2.7. Métodos de identificação e tipagem molecular em <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	21
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	23
<b>4. MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO</b>	29
<b>5. CONCLUSÕES</b>	62
<b>6. ABSTRACT</b>	63
<b>7. ANEXOS</b>	64
<b>1. <i>Non-coding RNA gene</i></b>	65
<b>2. Carta do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/HUOC</b>	70
<b>8. APÊNDICE</b>	71
<b>1. Instruções para Autores</b>	72

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Manuscrito de Artigo Científico</b>	
<b>Tabela 1.</b> Distribuição do perfil genotípico (rDNA-PCR, tDNA-PCR e Duplex-PCR) em relação ao perfil de resistência antimicrobiana detectada em 34 isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , coletados entre março de 2003 e janeiro de 2004.	48
<b>Tabela 2.</b> Apresentação do processo fenotípico em comparação aos processos de identificação e tipagem molecular (rDNA-PCR, tDNA-PCR e Duplex-PCR) de 34 isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> coletados entre março de 2003 e janeiro de 2004, seguidos do perfil de susceptibilidade antimicrobiana, e da distribuição de casos por setor hospitalar, data da coleta e amostra.	49

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Revisão da Literatura</b>	
<b>Figura 1.</b> Mapa do genoma da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pseudomonas Genome Project, 2004).	17
<b>Figura 2.</b> Organização do operon de rRNA em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Vê-se: as subunidades 16S, 23S e 5S; os tRNA-Ile e tRNA-Ala; e as Regiões Espaçadoras Intergênicas, <i>Intergenic Spacer Region</i> – ISRs correspondentes.	21
<b>Manuscrito de Artigo Científico</b>	
<b>Figura 1.</b> Gel de agarose a 1.6%, apresentando os produtos amplificados pelo rDNA-PCR das cepas de referência de <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> e <i>P. fluorescens</i> . Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: <i>P. aeruginosa</i> PA01; Poço 2: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027; Poço 3: <i>P. putida</i> ATCC 15175; Poço 4: <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525.	53
<b>Figura 2.</b> Gel de agarose a 1.6%, apresentando os produtos amplificados pelo rDNA-PCR da cepa de referência de <i>P. aeruginosa</i> , isolado clínico de <i>P. aeruginosa</i> e isolado clínico de <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> , todos com padrão de amplificação R1. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027; Poço 2: isolado clínico 22; Poço 3: <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> .	54
<b>Figura 3.</b> Gel de agarose a 1.6%, apresentando os padrões de amplificação pelo rDNA-PCR da cepa de referência de <i>P. aeruginosa</i> e dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> . Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027; Poços 2 a 6: isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> apresentando cinco padrões de amplificação, R1, R2, R3, R4, R5, respectivamente.	55
<b>Figura 4.</b> Gel de agarose a 2%, apresentando os produtos amplificados pelo tDNA-PCR das cepas de referência de <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> e <i>P. fluorescens</i> . Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: <i>P. aeruginosa</i> PA01; Poço 2: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027; Poço 3: <i>P. putida</i> ATCC 15175; Poço 4: <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525.	56

**Figura 5.** Gel de agarose a 2%, apresentando os padrões de amplificação pelo tDNA-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Figuras A a D: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando oito padrões de amplificação, (A) Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 2: isolado clínico 22 apresentando o padrão de amplificação T1; (B) Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poços 1 a 4: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando os padrões de amplificação T2, T3, T4, T5; (C) Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder. Poço 1: isolado clínico de *P. aeruginosa* apresentando o padrão de amplificação T6. (D) Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder. Poços 1 e 2: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando os padrões de amplificação T7 e T8.

**Figura 6.** Gel de agarose a 1.8%, apresentando os produtos amplificados pelo Duplex-PCR das cepas de referência de *P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. fluorescens*. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder. Poço 1: *P. aeruginosa* PA01; Poço 2: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 3: *P. putida* ATCC 15175; Poço 4: *P. fluorescens* ATCC 13525.

**Figura 7.** Gel de agarose a 1.8%, apresentando os produtos amplificados pelo Duplex-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poços 1 a 9: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando oito padrões de amplificação R1T1, R1T2, R1T3, R1T4, R2T5, R3T6, R4T7, R5T8, respectivamente.

**Figura 8.** (A) Gel de agarose a 1.6%, apresentando os produtos amplificados pelo rDNA-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um mesmo paciente. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 2: isolado clínico 21 com padrão de amplificação R1; Poço3: isolado clínico 23 com padrão de amplificação R1; (B) Gel de agarose a 2%, mostrando os produtos amplificados pelo tDNA-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um mesmo paciente. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 2: isolado clínico 21 com padrão de amplificação T4; Poço 3: isolado clínico 23 com padrão de amplificação T1.

**Figura 9.** Análise computacional da relação entre os perfis de resistência a antibióticos dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* a partir de um programa de análise e distribuição de haplótipos (NetWork 4.1.0.8). Cada haplótipo, ou agrupamento fenotípico está identificado pelos círculos em cinza e os números correspondentes representam cada agrupamento. A área do círculo corresponde ao número de representantes bacterianos em cada agrupamento: 6 (6, 22 e 26), 8 (8), 11 (11, 28 e 29), 31 (31), 3 (3), 13 (13), 4 (4 e 33), 25 (25 e 27), 1 (1, 5, 10, 14, 19 e 23), 16 (16, 17, 18, 20 e 34), 7 (7) e 12 (12). O círculo em branco foi considerado a base da rede de agrupamentos e o *mv1* corresponde a um isolado previsto pela análise, mas não encontrado nas amostras. A distância entre cada agrupamento é proporcional ao número de passos entre eles, representados pela expressão das resistências aos antibióticos CH1 (Ciprofloxacina), CH2 (Gentamicina), CH3 (Amicacina), CH4 (Piperacilina/Tazobactam), CH5 (Cefotaxima), CH6 (Cefepima), CH7 (Imipinem ) CH8 e (Aztreonam).

## LISTA DE ABREVIACÕES

TBE	Tris-borato, EDTA
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
M	Molar
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
bp	Pares de base
mg	Miligrama
ng	Nanograma
ml	Mililitro
$\mu$ l	Microlitro
U	Unidade
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
tRNA	RNA transportador
tRNA <sup>Ala</sup>	RNA transportador de alanina
tRNA <sup>Ile</sup>	RNA transportador de isoleucina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsátil
RAPD	Polimorfismo de amplificação aleatória de DNA
<i>Taq</i>	Enzima extraída da bactéria <i>Thermophylus aquaticus</i>
AFLP	Amplificação dos fragmentos de comprimento polimórficos

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa ubíqua e oportunista. Na rotina hospitalar, os marcadores fenotípicos nem sempre revelam a diversidade das bactérias distribuídas nos diversos setores, assim, aplicamos três métodos moleculares baseados na amplificação por PCR do *locus* de rDNA e tDNA para caracterizar a diversidade genética de linhagens de *P. aeruginosa* isoladas em um hospital público em Recife-PE, Brasil. O rDNA-PCR detectou 15% de variabilidade genética, contra 23% do tDNA-PCR e 23% do Duplex-PCR. O setor com maior diversidade genética foi a Unidade de Tratamento Intensivo do hospital, o qual apresentou quatro genótipos bacterianos diferentes. A ocorrência de linhagens de *P. aeruginosa* pertencentes ao mesmo genótipo e mesmo perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR), em diferentes setores do hospital, sugere que há infecção cruzada entre pacientes. Os dados apresentados pelo rDNA-PCR, tDNA-PCR e Duplex-PCR, em associação ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana provêm valiosas informações epidemiológicas para o controle de infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa*.

**Palavras-chave:** *P. aeruginosa*, tipagem molecular, rDNA-PCR, tDNA-PCR, Duplex-PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria que apresenta habilidade de causar doenças e ser resistente a múltiplos antimicrobianos concomitantemente, além de exibir uma potencialidade metabólica e versatilidade ambiental extraordinária. Faz parte da microbiota do organismo humano, contudo, em hospedeiros imunocomprometidos pode tornar-se oportunista (Choi *et al.*, 2002; Speert, 2002) e causar infecções endógenas ou exógenas, estas geralmente provenientes do contato com o ambiente hospitalar.

Em centros hospitalares as disseminações verticais e/ou horizontais de bactérias multirresistentes muitas vezes são dificilmente monitoradas, uma vez que as identificações de rotina mencionam apenas o gênero e espécie bacteriana. Tradicionalmente, a identificação da *P. aeruginosa* é baseada em análises biológicas. O advento de técnicas de identificação e tipagem molecular contribuiu para a identificação de isolados que não são fenotipicamente relacionados, mas são geneticamente homólogos, e/ou para tipagem de isolados fenotipicamente análogos. Desta forma, provêm informações para o controle de infecções adquiridas em ambiente hospitalar e confirmam a relação epidemiológica entre as mesmas (Severino *et al.*, 1999).

Devido à possibilidade de surtos de infecção disseminarem-se em centros hospitalares, este trabalho propôs como objetivo geral, aplicar e confrontar as técnicas de identificação e tipagem molecular (rDNA-PCR e tDNA-PCR) a fim de contribuir para o controle de possíveis surtos de infecção por *P. aeruginosa* no hospital em estudo. Os objetivos específicos foram:

Analisar o perfil de amplificação das regiões espaçadoras entre os genes de rRNA 16S-23S (rDNA-PCR) para identificação e tipagem molecular dos isolados clínicos e cepas de referência de *P. aeruginosa*;

Analisar o perfil de amplificação entre os genes de tRNA (tDNA-PCR) para identificação e tipagem molecular dos isolados clínicos e cepas de referência de *P. aeruginosa*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Características gerais

Ao longo dos séculos XIX e XX foram sugeridas algumas denominações para a *Pseudomonas aeruginosa*, contudo a terminologia empregada por Migula em 1894, tem prevalecido atualmente (NCBI, 2004). A *P. aeruginosa* pertence a família Pseudomonadaceae. O gênero *Pseudomonas* é o mais importante do ponto de vista clínico e ambiental e é composto por cerca de 128 espécies, divididas em grupos de espécies próximas (Anzai *et al.*, 2000). O grupo das *Pseudomonas aeruginosas* abrange as seguintes espécies: *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, *P. aeruginosa* UCBPP-PA14, *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. citronellolis*, *P. flavescens*, *P. jinjuensis*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens*, *P. oleovorans*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. cf. pseudoalcaligenes*, *P. resinovorans*, *P. straminea* (NCBI, 2004). Do ponto de vista filogenético, os gêneros *Pseudomonas*, *Chryseomonas* e *Flavimonas* parecem muito próximos segundo a análise de seqüências de nucleotídeos do gene rDNA 16S (Anzai *et al.*, 1997). Por outro lado, várias espécies de *Pseudomonas* foram reclassificadas no gênero *Burkholderia* (Tortora *et al.*, 2002).

Esta bactéria faz parte da microbiota humana, está presente na pele e intestino grosso (Brooks *et al.*, 2000). Contudo, pode se tornar patogênica em decorrência de sua introdução em local previamente estéril do corpo humano, alteração fisiológica do indivíduo ou virulência do microrganismo. É oportunista (Choi *et al.*, 2002; Speert, 2002) e, em hospedeiros imunocomprometidos pode causar infecções endógenas (Gruner *et al.*, 1993) ou exógenas, estas geralmente provenientes do contato com o ambiente hospitalar (Mims *et al.*, 1999). Contudo observou-se sua presença em infecções não invasivas de hospedeiros imunocompetentes (Speert, 2002).

A *P. aeruginosa* é considerada um microrganismo de importância não apenas médica, mas industrial e ambiental. Com relação a esta última, está envolvida nos processos de biorremediação (Tortora *et al.*, 2002). É classificada como um bastonete Gram-negativo, aeróbico, contudo, algumas cepas realizam respiração anaeróbica, quando da substituição do oxigênio por nitrato como aceptor final de elétrons. Crescem entre 37°C e 42°C (Brooks *et al.*, 2000), são móveis, com dimensões de 0,6 x 2,0 micrômetros (Siqueira, 2002) e apresentam-se isoladas, em pares ou cadeias curtas (Brooks *et al.*, 2000).

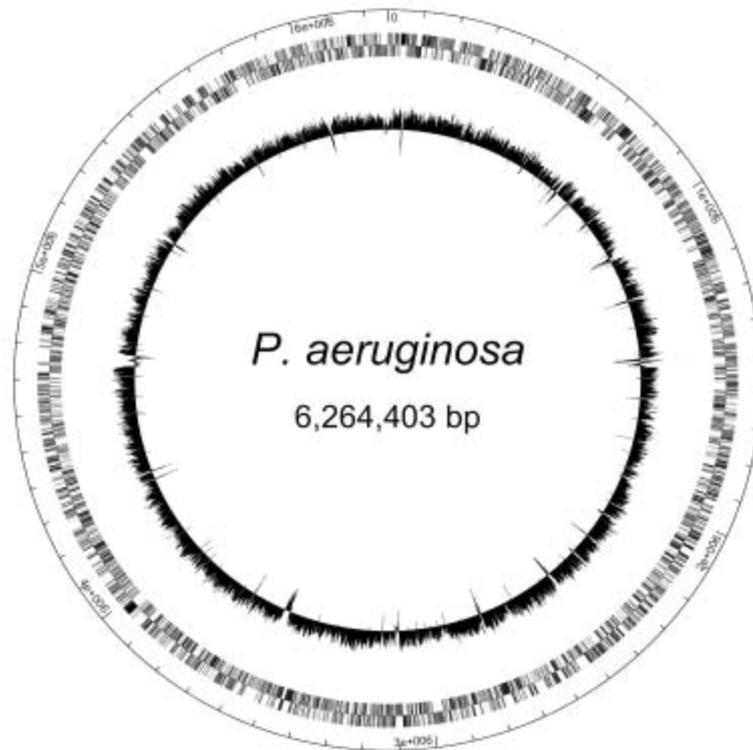
Quanto aos tipos de colônias, a *P. aeruginosa* pode se apresentar de três formas: pequenas e ásperas, quando provenientes do meio ambiente, como água ou solo; largas, lisas e de margens planas, de origem clínica em geral; e de aparência mucóide, de origem respiratória, em

decorrência da produção do muco de alginato, um exopolissacarídeo que auxilia na prevenção da fagocitose e contribui na virulência desta espécie (Siqueira, 2002).

O odor das colônias é geralmente adocicado, análogo à uva ou milho (Brooks *et al.*, 2000). Algumas cepas lisam o sangue, e em Ágar Mueller-Hinton pode se observar sua coloração. As cores de suas colônias variam de acordo com as pigmentações que excretam: piocianina (pigmento azulado não-fluorescente), que se propaga no Ágar e é inato à *P. aeruginosa*; pioverdina (pigmento fluorescente); piorrubina (pigmento vermelho-escuro) e piomelanina (pigmento negro) (Brooks *et al.*, 2000, Tortora *et al.*, 2002). Acredita-se que os pigmentos podem ter papel um importante na patogenicidade da bactéria (Mims *et al.*, 1999).

A identificação laboratorial inclui a observação do aspecto da colônia, odor característico, presença de pigmento, motilidade e testes bioquímicos com os seguintes fenótipos: fermentação de carboidratos (-); citrato (+); lisina descarboxilase (-); indol (-); oxidase (+); beta-hemólise em Ágar sangue; DNase (-) (Holt *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 2004). E, quando da dúvida, são confirmadas pelo sistema automatizado. Quanto a sorotipagem, a *P. aeruginosa* apresenta 20 sorogrupos segundo o Sistema Internacional de Tipagem Antigênica, *International Antigenic Typing System* - IATS (Dean e Goldberg, 2000).

A *P. aeruginosa* é amplamente estudada pelos cientistas que estão interessados não somente em sua habilidade de causar doenças e ser resistente aos antibióticos, como também por sua potencialidade metabólica e versatilidade ambiental. Seu genoma foi completamente mapeado, sendo considerada a maior das 25 bactérias seqüenciadas até então, com cerca de 5500 genes, codificados entre os 6, 264,403 bp (Stover *et al.*, 2000), (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa do genoma da *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas Genome Project*, 2004).

## 2.2. Epidemiologia

Sugere-se que o número elevado de genes da *P. aeruginosa* permita que ela se adapte e sobreviva em diferentes ambientes. Sua capacidade de crescimento em ambientes com quantidades mínimas de matérias orgânicas, como por exemplo, o crescimento em água destilada utilizada no preparo de medicamentos intravenosos, comprova que a mesma apresenta um metabolismo extremamente versátil (Murray *et al.* 2004; Todar, 2002).

É considerada uma bactéria ubíqua e encontra-se presente em alimentos, água (Hardalo e Edberg, 1997), solo (Kwon *et al.*, 2003), vegetação (Filloux e Vallet, 2003), animais e humanos (Murray *et al.* 2004). Em geral, não causa danos à saúde da população saudável. Senão a um portador hospitalizado ou ambulatorial que esteja imunocomprometido. A aquisição da infecção hospitalar pode ser adquirida com a colonização na admissão, através da terapia antimicrobiana, ou através de funcionários do hospital que a disseminam de um paciente a outro (Blanc *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2004).

Para se considerar uma infecção como hospitalar, deve-se levar em consideração algumas prerrogativas: que se adquira a mesma após a admissão hospitalar e que sua manifestação se dê

durante a internação ou após a alta, desde que se possa relacioná-la com a internação ou procedimentos hospitalares; quando, na mesma topografia em que foi diagnosticada uma infecção comunitária, foi isolado um patógeno diferente seguido do agravamento das condições clínicas do paciente; ou quando se desconhece o período de incubação do microrganismo e não houver evidência clínica e/ou dado laboratorial de infecção no momento da internação. Por fim, é considerada como uma infecção hospitalar toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 (setenta e duas) horas após a admissão, bem como aquelas infecções manifestadas antes de 72 (setenta e duas) horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos, realizados durante este período (Ministério da Saúde, 1998).

Em ambiente hospitalar, principalmente os úmidos como pias, sanitários, flores cortadas, alimentos, soluções desinfetantes e equipamentos para limpeza, pode disseminar-se facilmente (Ono, 2002), sendo considerada o terceiro patógeno em casos de infecção hospitalar (Gencer *et al.*, 2002) e, algumas vezes, a principal espécie (Pellegrino *et al.*, 2002). Julgada como um supermicróbio pelo Laboratório de Saúde Pública de Londres (Borges, 1998), apresenta elevada capacidade de morbidade, mortalidade e alto índice de resistência aos antibióticos (Pirnay *et al.*, 2000; Pellegrino *et al.*, 2002; Cunha, 2002; Vila e Marco, 2002).

A *P. aeruginosa* é geralmente resistente à atividade química. Quando da avaliação de desinfetantes pelo método de papel filtro, apresenta a capacidade de crescer na presença de hexaclorofeno, O-fenilfenol e Quat (composto de amônio quaternário), sendo o cloro o único componente efetivo contra a mesma (Tortora, 2002). Um outro fator que chama a atenção é o fato da possibilidade de resistência cruzada entre anti-sépticos e antibióticos, uma vez que a exposição ao triclosam pode selecionar a resistência de drogas antipseudomonas (Chuanchuen *et al.*, 2001).

### **2.3. Adesão, colonização, invasão e disseminação**

Grande parte das infecções pelas *Pseudomonas* são invasivas e toxicogênicas, e envolvem três estágios: (1) adesão e colonização; (2) invasão local; (3) e disseminação sistêmica. No entanto, o processo pode parar em qualquer um dos estágios. No estágio (1), as fímbrias (*Pili*) estendem-se a partir da superfície celular bacteriana em direção as células epiteliais ou as do trato respiratório superior do hospedeiro, promovendo assim a fixação (Brooks *et al.*, 2000). As adesinas parecem ligar-se a resíduos de manose e galactose ou aos receptores de ácido siálico. Linhagens mucóides da espécie apresentam uma adesina adicional, e a exoenzima S, que se liga a células do trato respiratório (Todar, 2002).

O estágio (2) envolve a capacidade da bactéria sobreviver à fagocitose, a produção das enzimas extracelulares e toxinas que rompem as barreiras físicas, contribuindo para a invasão bacteriana. A produção de muco (alginato), produzido por cepas específicas nos indivíduos com fibrose cística, contribui na prevenção da fagocitose; elastases e proteases exercem sua atividade no estágio invasivo, destruindo o tecido no local da infecção; outras três proteínas estão relacionadas à invasão: a fosfolipase, a lecitinase e uma citotoxina, formadora de poros (Mims *et al.*, 1999 e Todar, 2002).

A disseminação sistêmica da bactéria (3) não está completamente esclarecida, contudo sabe-se que a mesma é resistente à fagocitose (Gregory *et al.*, 2001).

#### **2.4. Patologia**

Quando a *P. aeruginosa* coloniza indivíduos imunocompetentes, geralmente atua como saprófita, porém, em indivíduos imunodeprimidos torna-se um importante patógeno oportunista (Choi *et al.*, 2002; Speert, 2002). Causa infecções severas particularmente naqueles com câncer, queimaduras, diabetes *mellitus* e imunossupressão. Pode acometer pacientes de hospitalização prolongada, de uso continuado de antibióticos ou que utilizam próteses (Ono, 2002). É considerado um patógeno pulmonar preocupante em casos de fibrose cística (Yagci, *et al.*, 2003).

Provoca inflamação ocular, infecção de ouvido denominada otite maligna externa, infecção de feridas e queimaduras estas, com produção de pus de coloração azul-esverdeado, infecção de tecidos moles, ossos, juntas e dos trato urinário e gastrointestinal, endocardite, meningite e septicemia (Mims *et al.*, 1999; Ono, 2002; Todar, 2002; Brooks *et al.*, 2000). Neste último tipo de infecção, pode ocorrer necrose nos tecidos, pela ação de uma exotoxina A, que atua bloqueando a síntese de proteínas, originando lesões denominadas de *Ecthyma Gangrenosum* que são circundadas por eritema. Contudo antitoxinas contra a toxina A podem ser encontrada em alguns soros humanos, mesmo naqueles que se recuperaram de infecções severas (Brooks *et al.*, 2000).

#### **2.5. Fatores de virulência**

Vários fatores de virulência foram identificados. A fixação da *P. aeruginosa* em células epiteliais do hospedeiro é mediada por adesinas dos *pili* e não-*pili*. A neuraminidase aumenta a aderência das bactérias ao epitélio do hospedeiro, por removerem os resíduos de ácido siálico do receptor de *pili*. Os lipopolissacarídeos (LPS), um componente essencial da membrana externa da *P. aeruginosa*, desenvolve um papel importantíssimo na virulência, uma vez que impede a fagocitose (Gregory *et al.*, 2001) através da camada mucoide que protege a bactéria e contribui na aderência às células do hospedeiro; A piocianina, um pigmento inato à *P. aeruginosa*, catalisa

a produção de radicais de oxigênio tóxicos como o peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas, contribuindo assim, na lesão tecidual (Brooks *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2004; e Todar, 2002).

As enzimas LasA, serina-protease, LasB e zinco metaloprotease degradam a elastina e lesionam diretamente o tecido pulmonar provocando hemorragia. A Fosfolipase C medeia a lesão tecidual degradando os lipídios e a lecitina. A Exotoxina A bloqueia a síntese de proteínas nas células do hospedeiro. A endotoxina lipopolissacarídica (LPS), um antígeno de parede celular, medeia os aspectos patológicos comuns de uma septicemia por bactérias Gram-negativas, como febre, hipotensão e coagulação intravascular (Brooks *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2004; e Todar, 2002).

## **2.6. Resistência a antimicrobianos**

A terminologia Resistência Múltipla a Drogas (*Multi-Drug Resistance* - MDR) pode ser utilizada para qualquer microrganismo, seja uma bactéria, fungo ou parasito que apresente concomitantemente resistência a várias drogas antimicrobianas (Levy, 2002). Certas cepas de *P. aeruginosa* são resistentes a vários senão a todos os agentes antimicrobianos disponíveis no comércio (Hamer, 2000). As infecções hospitalares relacionadas a *P. aeruginosa* são frequentemente do tipo MDR (Sarwari *et al.*, 2004). No Brasil, pesquisas em um hospital público universitário do Rio de Janeiro revelaram que já no ano de 1998 os isolados de *P. aeruginosa* estudados, apresentaram resistência a todos os agentes antipseudomonas disponíveis (Pellegrino *et al.*, 2002). Atualmente, foram identificados quatorze genes relacionados à susceptibilidade e resistência a antibióticos (*Pseudomonas Genome Project*, 2004).

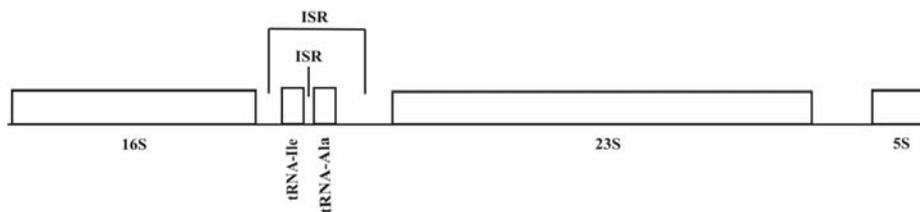
Vários mecanismos de resistência têm sido observados em *P. aeruginosa*. A absorção alterada pode ser devido as porinas de baixa eficiência (R.E.W. Hancock Laboratory, 2003) ou através das bombas de efluxo. Quanto às últimas, foram identificadas doze tipos de sistemas de efluxo, contudo apenas quatro foram caracterizados (Chuanchuen *et al.*, 2001). Os sistemas MexA-MexS-OprM e MexX-MexY-OprM são expressos constitutivamente em tipos selvagens, e conferem resistência múltipla intrínseca; e os sistemas MexC-MexD-OprJ e Mex-E-MexF-OprN tem sido expressos apenas em linhagens mutantes de multi-resistência adquirida (Poole e Srikumar, 2001).

A inativação da droga é promovida pela produção de beta- lactamases do tipo classe A, que hidrolizam o ceftazidime e cefepime (Nordmann e Guibert, 1998); classe B, que hidrolizam todos os beta-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (Yan *et al.*, 2001) e classe D, que hidrolizam carbapenemas (Bou *et al.*, 2000). Além dos genes cromossômicos, as beta-lactamases podem ser identificadas também em plasmídeos – ou fatores transferíveis de resistência, *Resistance Transfer Factors* – RTFs (Cunha, 2002). Os atributos genéticos podem definir-se

através de: conjugação (Todar, 2002), transdução (Blahova *et al.*, 2001) ou transposição (Wong e Mekalanos, 2000).

## 2.7. Métodos de identificação e tipagem molecular em *Pseudomonas aeruginosa*

Dentre as técnicas de genotipagem, a ribotipagem por PCR (rDNA-PCR), método descrito por Kostman *et al.*, (1992), é uma técnica que utiliza *primers* específicos na busca de polimorfismos entre as Regiões Espaçadoras Intergênicas, *Intergenic Spacer Region* – ISRs, dos genes do rRNA 16S-23S através da PCR, (Figura 2).



**Figura 2.** Organização do operon de rRNA em *Pseudomonas aeruginosa*. Vê-se: as subunidades 16S, 23S e 5S; os tRNA-Ile e tRNA-Ala; e as Regiões Espaçadoras Intergênicas, *Intergenic Spacer Region* – ISRs correspondentes.

Os ISRs dos genes rRNA16S-23S das bactérias variam devido à presença de genes de tRNA, de seqüências de reconhecimento de enzimas, como a ribonuclease III, envolvida no processo de *splicing* para produzir ribossomo maduro (Bram *et al.*, 1980) e de seqüências que têm um papel anti-terminador durante a transcrição, como a *boxA* (Harvey *et al.*, 1988). Em *P. aeruginosa*, os genes de rRNA são organizados em quatro operons conservados na ordem 16S-23S-5S. Com relação à quantidade e ao tipo de genes tRNA nesse espaço, apresentam um tRNA<sup>Ile</sup> e um tRNA<sup>Ala</sup> (*Pseudomonas Genome Project*, 2004). Como são essenciais para sobrevivência bacteriana, são altamente conservados (anexo 1).

O PFGE (Schwartz e Cantor 1984), uma técnica que emprega enzimas de restrição que clivam o DNA bacteriano originando fragmentos de restrição de alto peso molecular é mais discriminatória do que a ribotipagem por PCR (Hollis *et al.*, 1999). Sendo eficaz para fins epidemiológicos (Speert, 2002) e capaz de confirmar linhagens clonais de *P. aeruginosa* (Douglas *et al.*, 2001). Contudo, para análise epidemiológica, a utilização do AFLP (Vos *et al.*, 1995), que amplifica fragmentos de DNA gerados pela digestão de enzimas de restrição, demonstrou maior poder discriminatório comparado ao PFGE (Speijer *et al.*, 1999).

Em *P. aeruginosa*, o RAPD (Williams *et al.*, 1990), que amplifica segmentos de DNA de forma aleatória a partir de um único iniciador, parece servir para vigilância epidemiológica

(Barnini *et al.*, 2004). Contudo esta técnica não foi eficaz na demonstração de uma possível variabilidade genética (Schutze *et al.*, 2004).

A técnica tDNA-PCR (Welsh e McClelland, 1991) se propõem a identificar espécies e gêneros e é baseada na análise por PCR do polimorfismo de comprimento dos ISRs entre os genes de tRNA que, em *P. aeruginosa*, apresentam-se em número de sessenta e três e são conservados (*Pseudomonas Genome Project*, 2004; anexo 1). *A priori*, gera padrões de amplificação espécie-específicos (Baele *et al.*, 2000), porém em *Klebsiella pneumoniae* foi capaz de distinguir linhagens bacterianas (Lopes, 2003).

A epidemiologia hospitalar tem utilizado, entre outros, a análise de marcadores fenotípicos, como a biotipagem, que analisa o padrão de atividade metabólica bacteriana através de reações bioquímicas, geralmente automatizadas; a sorotipagem, que diferencia bactérias da mesma espécie a partir de antígenos de superfície; e a susceptibilidade a antimicrobianos. Contudo, a tipagem de linhagens a partir da análise de DNA, provê um poder discriminatório maior do que as análises fenotípicas (Severino *et al.*, 1999) e constitui-se um imprescindível recurso para a erradicação das fontes ambientais de contaminação, para o controle de infecção vertical ou horizontal entre indivíduos, e para acompanhar a eficiência da terapia antimicrobiana adotada no ambiente hospitalar.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anzai Y, Kudo Y e Oyaizu H (1997) The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int J Syst Bacteriol* 47:249-51.

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H e Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 4:1563-89.

Baele M, Baele P, Vanechoutte M, Stormas V, Butaye P, Devriese L, Verschraegen G, Gillis M, e Haesebrouck F (2000) Application of tRNA Intergenic Spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 38: 4201-4207.

Barnini S, Dodi C e Campa M (2004) Enhanced resolution of random amplified polymorphic DNA genotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol* 39:274-277.

Blahova J, Kralikova K, Krcmery VSr e Schafer V (2001) Bacteriophages transducing antibiotic resistance from a cluster of lysogenic strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients. *J Chemother* 13: 331-3.

Blanc DS, Parret T, Janin B, Raselli P e Francioli P (1997) Nosocomial infections and pseudoinfections from contaminated bronchoscopes: two-year follow up using molecular markers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 134-6.

Borges ML (1998) Antibióticos fazem surgir supermicrobios. [http://www2.uol.com.br/JC/\\_1998/2704/cm2606c.htm](http://www2.uol.com.br/JC/_1998/2704/cm2606c.htm)

Bou G, Oliver A e Martinez-Beltran J (2000) OXA-24, a novel class D beta-lactamaes with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother* 44:1556-1561.

Bram RJ, Young RA e Steitz, JA (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribossomonal precursor RNA of *Escherichia coli*. *Cell* 19: 393-401.

Brooks GF, Butel, JS e Morse SA (2000) Jawetz, Melnick, & Adelberg *Microbiologia Médica*. 210 edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 611 pp.

Choi JY, Sifri CD, Goumnerov BC, Rahme G, Ausubel FM e Calderwood SB (2002) Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. J Bacteriol 184: 952-61.

Chuanchuen, R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP (2001) Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-Pprj. Antimicrob Agents Chemother 45:428-432.

Cunha BA (2002) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. Semin Respir Infect 17: 231-9.

Dean CR, Goldberg JB (2000) The *wbpM* gene in *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O17 resides on a cryptic copy of the serogroup O11 O antigen gene locus. FEMS Microbiol Lett. 187:59-63.

Douglas MW, Mulholland K, Denyer V e Gottlieb T (2001) Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burns unit - an infection control study. Burns 27: 131-5.

Filloux A e Vallet I (2003) Biofilm: mise en place et organization d'une communauté bactérienne. Afr J Med Med Sci 19:77-83.

Gencer S, Ak O, Benzonana N, Batirel A, Ozer S (2002) Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital of Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob 9:2.

GregoryJ N, Craig D, Lori LB, Andrew MK, Anthony JC e Joseph SL (2001) Three-component-mediated serotype conversion in *Pseudomonas aeruginosa* by bacteriophage D3. Mol Microbiol. 39:1237-1247.

Gruner E, Kropec A, Huebner J, Altwegg M e Daschner F (1993) Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surgical intensive care patients. J Infect Dis 167: 1216-20.

Hamer D H (2000) Treatment of nosocomial pneumonia and tracheobronchitis caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with aerosolized colistin. Am. J. respire. Crit. Care Med 162: 328-330.

Hardalo C e Edberg SC (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. Crit Rev Microbiol 23: 47-75.

Harvey S, Hill CW e Squires CL (1988) Loss of the spacer loop sequence from the *rrnB* operon in the *Escherichia coli* K12 subline that bears the *relA1* mutation. J Bacteriol 170:1235-1238.

Hollis RJ, Bruce JL, Fritschel SJ e Pfaller A (1999) Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 34: 263-8.

Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T e Williams S T (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Williams. & Wilkins, Baltimore.

Kostman JR, Edlind TD, Lipuma JJ e Stull TL (1992) Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacea* determined by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol 30: 2084- 2087.

Kwon SW, Kim JS, Park IC, Yoon SH, Park DH, Lim CK e Go SJ (2003) *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. Int J Syst Evol Microbiol 53: 21-7.

Levy SB (2002) Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 49: 25-30.

Lopes ACS (2003) Caracterização molecular de linhagens patogênicas de *Klebsiella pneumoniae*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco.

Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D e Williams R (1999) Microbiologia médica. 20<sup>0</sup> edição. Manole, São Paulo. 584pp.

Ministério da Saúde, Portaria 2.616 (1998). <http://www.ccih.med.br/portaria2616.html>

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS e Pfaller MA (2004) Microbiologia médica. 4<sup>o</sup> edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 776pp.

NCBI - National Resource for Molecular Biology Information (2004)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Nordmann P, Guibert M (1998). Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother 42:3190-3195.

Ono Y (2002) *Pseudomonas aeruginosa*. Nippon Rinsho 60: 2150-5.

Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho Mda G, Aranha NS, Pinto OM, Mello SJL, D'Avila FA, Ferreira AL, Amorim EL, Riley LW e Moreira BM (2002) Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol 40: 2420-4.

Pirnay JP, Vos D, Duinslaeger L, Reper P, Vandenvelde C, Cornelis P.e Vanderkele, A (2000) Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid 'real-time' polymerase chain reaction. Current Science 4: 255-262.

Poole K e Srikumar R (2001) Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. Curr Top Med Chem 1: 59-71.

*Pseudomonas Genome Project* (2004) Improving disease treatment through genome research.  
[http:// www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)

R.E.W. Hancock Laboratory (2003) Research areas. <http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/>

Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N e Vinas M (2004) Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting Arch Med Res 35: 251-257.

Sarwari A, Hasan R, Lim CB, Ng Y, Ng C, Zaman S (2004) PCR identification and automated ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from intensive care patients. Scand J Infect Dis 36:342-349.

Schutze GE, Gilliam CH, Jin S, Cavanaugh CK, Hall RW, Bradsher RW e Jacobs RF (2004) Use of DNA fingerprinting in decision making for considering closure of neonatal intensive care units because of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Pediatr Infect Dis J 23:110-114.

Schwartz DC e Cantor CR. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gel electrophoresis. Cell 37:67-75.

Severino P, Darini AL e Magalhães VD (1999) The discriminatory power of ribo-PCR compared to conventional ribotyping for epidemiological purposes. APMIS 107: 107910-84.

Siqueira FS (2002) Mecanismos de resistência a  $\beta$ -Lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. <http://www.crbml.com.br/bio48/rev24.asp>

Speert DP (2002) Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Biosci 1:354-61.

Speijer, H, Savelkoul PHM, Bonten MJ, Stobberingh EE e Tjhie JHT (1999) Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. J. Clin. Microbiol 37: 3654-3661.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S e Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature 406:959-64.

Todar K (2002) Opportunistic Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>

Tortora GJ, Berdell RF e Christine LC (2002) Microbiologia. Artmed, Porto Alegre. 827pp.

Vila J e Marco F (2002) Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20: 304-10.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee M, Hornes M (1995) AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 21: 4407-4414.

Welsh J e McClelland M (1991) Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic Acids Res* 19:861-866.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA e Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.

Wong SM e Mekalanos JJ (2000) Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 97:10191-6.

Yagci A, Ciragil P, Over U, Sener B, Erturan Z e Soyletir G (2003) Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Turkish cystic fibrosis patients. *New Microbiol* 26:109-114.

Yan JJ, Hsueh PR, Wen-Chien K, Luh KT, Tsai SH, Wu HM e Wu JJ (2001) Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant if VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother* 45:2224-2228.

#### **4. MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO**

**POLIMORFISMO DOS *LOCI* DE rDNA E tDNA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*Pseudomonas aeruginosa*: UMA PERSPECTIVA PARA ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Isabel Cristina Guerra Spacov<sup>1,2\*</sup>, Suzileyde Alberto Marques da Silva<sup>2</sup>, Marcos

Antônio de Moraes Júnior<sup>1,2</sup>, Márcia Maria Camargo de Moraes<sup>2,3</sup>

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE,  
Brasil<sup>1</sup>. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, UFPE, Recife-PE, Brasil<sup>2</sup>.

Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas – UPE, Recife-PE, Brasil<sup>3</sup>.

\*Autor para correspondência:

Rua Geraldo de Andrade, 101/101

Espinheiro Recife PE Brasil

CEP 52021-220

Tel: 55 81 3241 8212

Manuscrito a ser submetido para publicação no:

***GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY***

ISSN 1678-4685 *online version*

(Ribeirão Preto, Brasil)

**POLYMORPHISM OF THE rDNA AND tDNA *LOCI* IN CLINICAL ISOLATES OF  
*Pseudomonas aeruginosa*: A PERSPECTIVE FOR EPIDEMIOLOGICAL STUDIES**

Isabel Cristina Guerra Spacov<sup>1,2\*</sup>, Suzileyde Alberto Marques da Silva<sup>2</sup>, Marcos Antônio de  
Morais Júnior<sup>1,2</sup>Márcia Maria Camargo de Moraes<sup>2,3</sup>

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE,  
Brasil<sup>1</sup>. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, UFPE, Recife-PE, Brasil<sup>2</sup>.  
Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas – UPE, Recife-PE, Brasil<sup>3</sup>.

\*Corresponding author:

Rua Geraldo de Andrade, 101 apt 101 Espinheiro

52021-220 Recife PE Brasil

Phone: +55 81 3241 8212

E-mail: isabel\_spacov@uol.com.br

To be submitted to:

***GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY***

ISSN 1678-4685 *online version*

(Ribeirão Preto, Brazil)

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa ubíqua e oportunista. Na rotina hospitalar, os marcadores fenotípicos nem sempre revelam a diversidade das bactérias distribuídas nos diversos setores, assim, aplicamos três métodos moleculares baseados na amplificação por PCR do *locus* de rDNA e tDNA para caracterizar a diversidade genética de linhagens de *P. aeruginosa* isoladas em um hospital público em Recife-PE, Brasil. O rDNA-PCR detectou 15% de variabilidade genética, contra 23% do tDNA-PCR e 23% do Duplex-PCR. O setor com maior diversidade genética foi a Unidade de Tratamento Intensivo do hospital, o qual apresentou quatro genótipos bacterianos diferentes. A ocorrência de linhagens de *P. aeruginosa* pertencentes ao mesmo genótipo e mesmo perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR), em diferentes setores do hospital, sugere que há infecção cruzada entre pacientes. Os dados apresentados pelo rDNA-PCR, tDNA-PCR e Duplex-PCR, em associação ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana provêm valiosas informações epidemiológicas para o controle de infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa*.

**Palavras-chave:** *P. aeruginosa*, tipagem molecular, rDNA-PCR, tDNA-PCR, Duplex-PCR.

## INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é considerada uma bactéria ubíqua e encontra-se presente em alimentos, água (Hardalo e Edberg, 1997), solo (Kwon et al., 2003), vegetação (Filloux e Vallet, 2003) e animais. Faz parte da microbiota humana e em geral, não causa danos à saúde da população saudável. Contudo, é considerada um patógeno oportunista (Morgan et al., 1999; Poole e Srikumar, 2001; Choi et al., 2002; Speert, 2002) e, em hospedeiros imunocomprometidos pode causar infecções endógenas (Gruner et al., 1993) ou exógenas, estas geralmente provenientes do contato com o ambiente hospitalar através de sua aquisição na admissão, da pressão seletiva da terapia antimicrobiana, ou através de funcionários do hospital que a disseminam de um paciente a outro (Blanc et al., 1997; Ruiz et al., 2004).

Dados obtidos pelo Programa de Vigilância Epidemiológica e Resistência Antimicrobiana, *Antimicrobial Surveillance Program – SENTRY*, indica que a América Latina e Continente Asiático apresentaram a maior prevalência de infecções causadas pela *P. aeruginosa* (11.4%), seguidos pela Europa (9.3%), Estados Unidos (8.7%), e Canadá (8.6%) (Gales et al., 2001). As infecções hospitalares relacionadas a *P. aeruginosa* são frequentemente resistentes a múltiplos antimicrobianos (Sarwari et al., 2004). Em um hospital público universitário do Rio de Janeiro, no Brasil, os isolados hospitalares de *P. aeruginosa* coletados no ano de 1998, apresentaram resistência a todos os agentes antipseudomonas disponíveis (Pellegrino et al., 2002).

Tradicionalmente, a identificação de *P. aeruginosa* é baseada em análises fenotípicas através de reações bioquímicas. No entanto, em centros hospitalares as disseminações verticais ou horizontais de bactérias multirresistentes tornam-se muitas vezes, de difícil acompanhamento, uma vez que as identificações de rotina mencionam apenas o gênero e espécie bacteriana. O advento de técnicas de identificação e tipagem molecular contribuiu para a identificação de isolados que não são fenotipicamente relacionados, mas que são geneticamente semelhantes e/ou para tipagem de isolados fenotipicamente análogos. Este monitoramento provê informações para

o controle de infecções adquiridas em ambiente hospitalar e podem confirmar a relação epidemiológica entre os isolados e delimitar os possíveis grupos clonais (Severino et al., 1999).

A partir do exposto, este estudo teve como objetivo aplicar e confrontar as técnicas rDNA-PCR e tDNA-PCR, esta última, ainda não aplicada em *P. aeruginosa*, a fim caracterizar a diversidade genética de linhagens de *P. aeruginosa*, contribuindo assim, para o controle dos casos de infecção hospitalar. Os resultados obtidos apontam para a possibilidade de discriminação intra-específica dos diferentes grupos clonais de *P. aeruginosa* nos diferentes setores do hospital estudado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolados bacterianos e procedimentos de identificação**

Trinta e quatro isolados clínicos de *P. aeruginosa*, incluindo aqui o isolado 22, que apresentou perfil inaceitável para *P. aeruginosa* segundo o processo automatizado, e um isolado clínico de *Chryseobacterium meningosepticum*, foram coletados entre março de 2003 e janeiro de 2004 em diferentes setores do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – HUOC, Recife-PE, Brasil (anexo 2). Os isolados foram identificados na rotina hospitalar pela observação, quando presente, do aspecto da colônia, odor característico, presença de pigmento, motilidade e testes bioquímicos com os seguintes fenótipos: fermentação de carboidratos (-); citrato (+); lisina descarboxilase (-); indol (-); oxidase (+); beta-hemólise em ágar sangue; DNase (-). A confirmação da identificação se deu através do sistema de automação ID32 Mini-Api (BioMerieux, França). O antibiograma gerado corresponde aos dados da rotina hospitalar que utiliza o método da difusão do disco, seguidos da leitura dos halos de inibição de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê Nacional para Padronização de Laboratórios Clínicos, *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS M100*.

Como controle foram utilizadas as cepas de referência *Pseudomonas aeruginosa* PA01, cedida pelo *Pseudomonas Genome Project*, Boston, U.S.A. A *P. aeruginosa* ATCC 9027,

*Pseudomonas putida* ATCC 15175 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, cedidas da coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz, INCQS, Rio de Janeiro, Brasil. As espécies *P. putida* e *P. fluorescens* foram selecionadas em decorrência de relatos de bacteremia em Unidades de Tratamento Intensivo de neonatos (Bouallegue, et al., 2004) e em pacientes oncológicos (Hsueh, et al., 1998), respectivamente.

## **Genotipagem**

### **Extração do DNA genômico**

O DNA genômico dos isolados foi extraído de acordo com o método descrito no *Current Protocols in Molecular Biology* (1994) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta após separação eletroforética em gel de agarose a 1%, corado em brometo de etídio 15mg/ml, seguidos de fotodocumentação em sistema Polaroid.

### **rDNA- PCR**

Para a amplificação das Regiões Espaçadoras Intergênicas, *Intergenic Spacer Region* – ISRs entre os genes do rRNA 16S-23S foram utilizados os *primers* 03 (5'-TTGTACACACCGCCCGTCA-3') complementar à subunidade conservada 23S e o 04 (5'-GGTACCTTAGATTGTTTCAGTTC-3'), complementar à subunidade conservada 16S segundo o método descrito por Kostman et al., (1992).

As reações para a PCR foram preparadas com um volume total de 25µl contendo: 50ng de DNA genômico, 20pmoles de cada *primer*, 4pmoles de cada dNTP, 1X tampão de reação (Invitrogen), 37,5 pmoles de MgCl<sub>2</sub> e 1U da enzima *Taq*DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador Hybaid com uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos a 94<sup>0</sup>C, seguida de 30 ciclos de amplificação de um de 1 minuto a 94<sup>0</sup>C para a desnaturação, 1 minuto a 55<sup>0</sup>C para o anelamento e 1 minuto a 72<sup>0</sup>C para a extensão. E uma etapa final extensão de 7 minutos a 72<sup>0</sup>C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 1.6% em tampão TBE a 0.5X e voltagem constante de 100V. Seguido de coloração com brometo de etídio 15mg/ml e visualização em transiluminador de luz ultravioleta seguidos

de fotodocumentação em sistema Polaroid. Tendo como padrão de peso molecular um marcador de DNA de 100 pares de bases (Biotools, Spain).

### **tDNA-PCR**

Para a amplificação das ISRs entre os genes do tRNA foram utilizados os *primers* conservados descritos por Welsh e McClelland (1991), cujas seqüências são: T5A (5'- AGT CCG GTG CTC TAA CCA ACT GAC - 3') e T3B (5'- AGG TCG CGG GTT CGA ATC C - 3'), e que se presta a identificar espécies e gêneros.

As reações para a PCR foram preparadas com um volume total de 25µl contendo: 50ng de DNA genômico, 25pmoles de cada *primer*, 4pmoles de cada dNTP, 1X tampão de reação (Invitrogen), 37,5 pmoles de MgCl<sub>2</sub> e 1U da enzima *Taq*DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador Hybaid com uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos a 94<sup>0</sup>C, seguida de 30 ciclos de amplificação de 30 segundos a 94<sup>0</sup>C para a desnaturação, 30 segundos a 55<sup>0</sup>C para o anelamento e 30 segundos a 72<sup>0</sup>C para a extensão. E uma etapa final extensão de 10 minutos a 72<sup>0</sup>C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 2% em tampão TBE a 0.5X e voltagem constante de 75V. Seguido de coloração com brometo de etídio 15mg/ml e visualização em transiluminador de luz ultravioleta seguidos de fotodocumentação em sistema Polaroid. Tendo como padrão de peso molecular um marcador de DNA de 100 pares de bases (Biotools, Spain).

### **Duplex-PCR**

A reação Duplex-PCR utilizou para a reação de PCR, os seguintes componentes: 50ng de DNA genômico, 20pmoles de cada *primer* descrito por Kostman et al., (1992), 25pmoles de cada *primer* descrito por Welsh e McClelland (1991), 4pmoles de cada dNTP, 1X tampão de reação (Invitrogen), 37,5 pmoles de MgCl<sub>2</sub> e 1U da enzima *Taq*DNA polimerase para o volume final de 25µl.

Para a amplificação houve a associação dos protocolos descritos para os marcadores rDNA e tDNA. A amplificação foi realizada em termociclador Hybaid com uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos a 94<sup>0</sup>C, seguida de 30 ciclos de amplificação de 1 minuto a 94<sup>0</sup>C para a desnaturação, 1 minuto a 55<sup>0</sup>C para o anelamento e 1 minuto a 72<sup>0</sup>C para a extensão. E uma etapa final extensão de 10 minutos a 72<sup>0</sup>C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 1.8% em tampão TBE a 0.5X e voltagem constante de 75V. Seguido de coloração com brometo de etídio 15mg/ml e visualização em transiluminador de luz ultravioleta seguidos de fotodocumentação em sistema Polaroid. Tendo como padrão de peso molecular um marcador de DNA de 100 pares de bases (Biotools, Spain).

### **Análise de filogenias e distribuição geográfica de haplótipos**

A disseminação das bactérias para diferentes setores do hospital pode submetê-las a diferentes pressões seletivas, o que resulta na aquisição ou expressão de resistência diferencial a antibióticos. Neste contexto, os isolados de *P. aeruginosa* foram submetidos a uma análise computacional utilizando um programa designado para análise de filogenias e distribuição geográfica de haplótipos (Fluxus Technology Ltd). Os dados binários consistiram os fenótipos de sensibilidade (0) e resistência (1) aos antibióticos testados e agrupados segundo análise de medianas.

## **RESULTADOS**

### **Biotipagem dos isolados clínicos**

Trinta e quatro isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes da rotina do laboratório de bacteriologia do hospital em estudo foram caracterizados por provas bioquímicas e confirmados em sistema MiniApi ID32. Destes, um isolado apresentou perfil inaceitável para *P. aeruginosa* segundo os critérios de análise do sistema. Além disso, um isolado clínico previamente identificado como *Pseudomonas spp.* na rotina hospitalar, foi submetido à automação e identificado como pertencente a espécie *Chryseobacterium meningosepticum*.

Todos os isolados de *P. aeruginosa*, inclusive o isolado 22, foram submetidos aos ensaios de antibiograma com nove drogas de escolha. Os isolados 6, 22 e 26 apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos testados, enquanto que os outros isolados apresentaram resistências que variaram de um a oito antibióticos (Tabela 1). Não houve uma correlação entre o perfil de resistência bacteriana e o local de coleta do hospital ou amostra clínica de paciente (Tabela 2, isolados 16 e 17; 28 e 29). Os isolados foram posteriormente submetidos às análises moleculares para o estudo da relação genética entre elas.

### **Tipagem genética**

#### **rDNA- PCR**

As cepas de referência *P. aeruginosa* PA01 e *P. aeruginosa* ATCC 9027 apresentaram o mesmo perfil de amplificação para o marcador de rDNA, com a geração de uma única banda de cerca de 800bp. Quando comparadas às outras duas espécies do mesmo gênero, *P. putida* ATCC 15175 e *P. fluorescens* ATCC 13525, o marcador de rDNA gerou padrões de amplificação interespecífico (Figura 1). O isolado clínico 22 apresentou um padrão de amplificação semelhante aos das cepas de referência, R1 (Figura 2), e o isolado clínico identificado como *C. meningosepticum* também apresentou o mesmo perfil de amplificação da cepa de referência *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Figura 2).

Ao aplicarmos a mesma técnica aos outros 33 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, foram observados cinco perfis de amplificação distintos classificados como: R1, R2, R3, R4, R5 (Figura 3). O perfil R1 foi observado em 30 isolados clínicos, além das cepas de referência de *P. aeruginosa*, e representa o perfil de amplificação mais comum da espécie, contra um representante para cada um dos outros quatro perfis (Tabela 2).

#### **tDNA-PCR**

As cepas de referência *P. aeruginosa* PA01 e *P. aeruginosa* ATCC 9027 apresentaram o mesmo padrão de amplificação para o marcador de tDNA, gerando um perfil de amplificação intrespecífico quando comparados ao das outras duas espécies *P. putida* ATCC 15175 e *P.*

*fluorescens* ATCC 13525 (Figura 4). Da mesma forma, o isolado 22 gerou um padrão de amplificação semelhante ao da cepa de referência *P. aeruginosa* ATCC 9027: T1 (Figura 5A). A análise dos outros 33 isolados clínicos de *P. aeruginosa* revelou a presença de oito perfis de amplificação distintos classificados como: T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 (Figuras 5A, 5B, 5C, 5D).

O perfil T1 foi observado em 27 isolados clínicos, além das cepas de referência de *P. aeruginosa*, e representa o perfil de amplificação mais comum da espécie, contra um representante para cada um dos outros sete perfis (Tabela 1). O perfil R1 do marcador de rDNA foi subdividido em quatro perfis de tDNA (T1, T2, T3 e T4), sendo o perfil T1 o mais comum dentre todos os outros encontrados (Tabela 2).

### **Duplex-PCR**

As reações de Duplex-PCR das cepas de referência *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. putida* ATCC 15175 e *P. fluorescens* ATCC 13525 geraram padrões de amplificação interespecíficos (Figura 6). Quando aplicadas ao conjunto dos 34 isolados clínicos, geraram também, como no tDNA-PCR, oito perfis de amplificação, nos mesmos isolados: R1T1, R1T2, R1T3, R1T4, R2T5, R3T6, R4T7, R5T8 (Figura 7 e Tabela 2), o que corresponde ao mesmo percentual de variabilidade genética apresentado pelo tDNA-PCR.

### **Análise de filogenias e distribuição geográfica de haplótipos**

Os isolados R1T1 foram submetidos à análise computacional utilizando o programa Fluxus Technology Ltd, NetWork 4.1.0.8. Pode-se observar o agrupamento 6, formado pelos isolados 6, 22 e 26, sensíveis a todos os antibióticos (Tabela 1), como a possível base da qual evoluíram os isolados 8 e 31 a partir de passos diferenciais de aquisição ou expressão de resistência ao antibiótico Gentamicina e Cefotaxima, respectivamente (Figura 9 e Tabela 2), e assim por diante.

## DISCUSSÃO

A técnica rDNA-PCR (Kostman et al., 1992), que se propõem a detectar polimorfismos intra-específicos, foi aplicada em 34 isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Os produtos amplificados pelo rDNA-PCR serviu para tipagem interespecífica entre espécies do gênero *Pseudomonas* (Figura 1). Ao ser utilizada para confirmar uma automação com perfil inaceitável para *P. aeruginosa* (isolado clínico 22, Tabela 2) o perfil de amplificação demonstrou que o isolado citado corresponde a esta espécie, pois apresentou a mesma amplificação da cepa de referência *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Figura 2). Assim, a princípio, serviu como marcador interespecífico quando da identificação fenotípica duvidosa. Esse dado assemelha-se ao encontrado para isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Lopes, 2003). Entretanto, pela presença de perfis de amplificação distintos (R1, R2, R3, R4 e R5), (Figura 3), pode-se identificar com boa precisão os isolados como *P. aeruginosa* apenas quando estes apresentarem o perfil típico R1, de cerca de 800bp.

A amplificação gerada pelo rDNA-PCR do isolado identificado *C. meningosepticum* se contrapõe a esta possibilidade, já que esta bactéria apresentou o mesmo perfil de amplificação das cepas de referência de *P. aeruginosa* (Figura 2). A partir deste dado pode-se sugerir que estas duas espécies sejam mais semelhantes do ponto de vista filogenético do que se imagina, uma vez que ambas são bacilos não-fermentadores cuja diferenciação fenotípica de rotina consiste no fato de que a *P. aeruginosa* é móvel enquanto que a *C. meningosepticum* não (Holt et al., 1994). Este bacilo, anteriormente denominado *Flavobacterium meningosepticum* (Vandamme et al., 1994) e taxonomicamente integrante da família *Flavobacteriaceae* (NCBI, 2004), é a segunda espécie depois da *P. aeruginosa* presente em água destilada e tratada em hospitais na Grécia (Arvanitidou et al., 2003).

Anzai et al., (1997) constatou a proximidade filogenética entre isolados de *Chryseomonas luteola*, *Flavimonas oryzihabitans* e *Pseudomonas aeruginosa* a partir da alta homologia entre as

seqüências de nucleotídeos do gene que codifica o rRNA 16S. O que confirmou a classificação taxonômica anterior apresentada por Kodama et al., (1985) que considerou a *Chryseomonas luteola*, como *Pseudomonas luteola* e *Flavimonas oryzihabitans*, como *Pseudomonas oryzihabitans*. Taxonomicamente a *C. luteola* e a *F. oryzihabitans* pertencem a família Pseudomonadaceae e ao gênero *Pseudomonas* (NCBI, 2004). Assim, é possível que a pequena diferença fenotípica entre *P. aeruginosa* e *C. meningosepticum*, bem como a semelhança no padrão de amplificação através do rDNA-PCR, evidencie a grande relação genética entre estes dois bacilos. Contudo, estudos filogenéticos posteriores serão necessários para testar esta hipótese.

A tipagem por rDNA-PCR, quando aplicada aos 34 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, detectou polimosfismos intra-específicos, com presença de cinco grupos clonais distintos (Figura 3), o que corresponde a uma variabilidade genética de 15%. Em 2001, foram detectados apenas dois grupos clonais no hospital estudado, uma variabilidade de 6% (Vilela, 2001), o que aponta para o aumento de grupos clonais circulantes no hospital em estudo.

O tDNA-PCR é uma técnica que se propõem a identificar gêneros e espécies bacterianas (Welsh, 1991 e Baele et al., 2002). No presente estudo, esta técnica parece muito mais apropriada para a discriminação intra-específica (Figuras 5A, 5B, 5C, 5D), semelhante ao encontrado para os isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Lopes, 2003). Esta técnica detectou a presença de oito grupos clonais distintos, uma variabilidade genética de 23%. E, por aumentar o poder discriminatório do rDNA, serve como um segundo marcador de tipagem molecular.

O Duplex-PCR, semelhantemente ao tDNA-PCR, detectou a presença do oito grupos clonais distintos, uma variabilidade genética de 23%. Desta forma, a utilização simultânea dos dois marcadores em uma reação de Duplex-PCR surge como uma ferramenta com grande poder discriminatório na tipagem de isolados clínicos de *P. aeruginosa* em surtos de infecção hospitalar (Figuras 6 e 7).

A *P. aeruginosa* é considerada o terceiro patógeno em casos de infecção hospitalar (Gencer et al., 2002) e, em alguns hospitais, é a principal espécie (Pellegrino et al., 2002). A Unidade de Tratamento Intensivo (Geral) do hospital em estudo apresentou a maior diversidade de grupos clonais (Tabela 2). De forma similar, padrões de variabilidade genética de *P. aeruginosa* em UTIs tem sido relacionadas em outros estudos (Sarwari et al., 2004), o que afirma a necessidade de adoção de técnicas moleculares para o auxílio na identificação e controle de surtos de infecção hospitalar.

As infecções hospitalares relacionadas a *P. aeruginosa* são frequentemente ocasionadas por linhagens com resistência a múltiplas drogas (MDR) (Sarwari et al., 2004), fato este que corresponde aos dados encontrados neste estudo (Tabela 1). Contudo não houve relação entre os grupos clonais e o local de coleta dos isolados (Tabela 2), da mesma forma que não houve relação entre os grupos clonais e o antibiograma, uma vez que um mesmo paciente apresentou o mesmo perfil de susceptibilidade antimicrobiana e perfil de amplificação pelo rDNA-PCR: isolado 21 e 23 (Figura 8A e Tabela 2), mas perfil de amplificação pelo tDNA-PCR distintos: isolado 21, T4, e isolado 23, T1 (Figura 8B e Tabela 2). Além do fato do grupo clonal (R1T1), ter apresentado um perfil de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados (isolados 6 e 22, 26), e também sensibilidade a apenas um (isolado 7, Tabela 1).

Através da análise de filogenias e distribuição geográfica de haplótipos, pode-se observar pode-se sugerir que o isolado 7 surgiu de bactérias do agrupamento 6 após aquisição ou expressão seqüencial da resistência a oito antibióticos (Figura 9). O programa colocou o isolado 12 como último da análise sequencial em decorrência do produto da frequência de resistência dos antibióticos amicacina e imipenem.

Um outro ponto que nos chama a atenção quanto ao antibiograma do grupo clonal R1T1 é que constatamos a presença de um “elo perdido” entre nossos isolados, denominado aqui como *mv1*. Este haplótipo teria dado origem aos isolados 4 e 25 (Figura 9). Este fato nos fornece informação de que há um integrante do grupo clonal R1T1, com resistência concomitante aos

antimicrobianos 2, 3, 5 e 6, circulando no hospital em questão, e que não faz parte dos isolados deste estudo (Figura 9 e Tabela 1). Assim, para um controle epidemiológico efetivo, há a necessidade de um trabalho conjunto entre os laboratórios de análise fenotípica, os de análise genotípica e do comitê de infecção hospitalar.

A infecção horizontal parece difundir-se pelo hospital em questão via funcionários ou através de equipamentos utilizados no cuidado dos pacientes, isso porque cinco pacientes hospitalizados (isolados 16, 17, 18, 20 e 34) ao longo do período analisado, estavam colonizados pela mesma linhagem de *P. aeruginosa* (R1T1) em pele ou urina, e apresentaram o mesmo perfil susceptibilidade antimicrobiana apesar de estarem localizados em quatro setores hospitalares distintos (Tabela 2).

Os perfis de amplificação apresentados pelos marcadores de rDNA-PCR e tDNA-PCR quando aplicados em surtos de infecção hospitalar por *P. aeruginosa*, em associação ao perfil de resistência antimicrobiana, podem auxiliar na consubstanciação de dados para fins epidemiológicos no controle de casos de infecções adquiridas em ambiente hospitalar.

## **AGRADECIMENTOS**

A diretoria do Hospital Oswaldo Cruz – HUOC, Recife-PE, Brasil e ao Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife-PE por nos ceder os isolados clínicos. A diretoria do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Recife-PE, Brasil, pela utilização de sua instalação. A Fundação Oswaldo Cruz, INCQS, Rio de Janeiro, Brasil, e ao *Pseudomonas Genome Project*, pelas cepas de referência. A CAPES pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

Anzai Y, Kudo Y e Oyaizu H (1997) The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int J Syst Bacteriol* 47:249-51.

Arvanitidou M, Vayona A, Spanakis N e Tsakris A (2003) Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *J Appl Microbiol* 95:180.

Baele M, Vaneechoutte M, Verhelst R, Vancanneyt M, Devriese LA, Haesebrouck F (2002) Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. *J Microbiol Methods* 50:263-271.

Blanc DS, Parret T, Janin B, Raselli P e Francioli P (1997) Nosocomial infections and pseudoinfections from contaminated bronchoscopes: two-year follow up using molecular markers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 134-6.

Bouallegue O, Mzoughi R, Weill FX, Mahdhaoui N, Ben Salem Y, Sboui H, Grimont F e Grimont PA (2004) Outbreak of *Pseudomonas putida* bacteraemia in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 57:88-91.

Choi JY, Sifri CD, Goumnerov BC, Rahme G, Ausubel FM e Calderwood SB (2002) Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *J Bacteriol* 184: 952-61.

Current Protocols in Molecular Biology (1994). Volume 1. John Wiley&Sons, U.S.A.

Filloux A e Vallet I (2003) Biofilm: mise en place et organization dune communauté bactérienne. Afr J Med Med Sci 19:77-83.

Fluxus Technology Ltd, NetWork 4.1.0.8 (2004) <http://www.fluxus-engineering.com>

Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R e Ramphal R. (2001) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 15:146-155.

Gencer S, Ak O, Benzonana N, Batirel A, Ozer S (2002) Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital of Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob 9:2.

Gruner E, Kropec A, Huebner J, Altwegg M e Daschner F (1993) Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surgical intensive care patients. J Infect Dis 167: 1216-20.

Hardalo C e Edberg SC (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. Crit Rev Microbiol 23: 47-75.

Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T e Williams S T (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Williams. & Wilkins, Baltimore. 787pp.

Hsueh PR, Teng LJ, Pan HJ, Chen YC, Sun CC, Ho SW e Luh KT. (1998) Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. J Clin Microbiol 36:2914-2917.

Kodama K, Kimura N e Komagata K. (1985) Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 35:467-474.

Kostman JR, Edlind TD, Lipuma JJ e Stull TL (1992) Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacea* determined by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol* 30: 2084- 2087.

Kwon SW, Kim JS, Park IC, Yoon SH, Park DH, Lim CK e Go SJ (2003) *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 21-7.

Lopes ACS (2003) Caracterização molecular de linhagens patogênicas de *Klebsiella pneumoniae*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco.

Morgan JA, Bellingham NF, Winstanley C, Ousley MA, Hart CA e Saunders JR (1999) Comparison of flagellin genes from clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Appl Environ Microbiol* 65: 1175-9.

NCBI - National Resource for Molecular Biology Information (2004)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho Mda G, Aranha NS, Pinto OM, Mello SJL, D'Avila FA, Ferreira AL, Amorim EL, Riley LW e Moreira BM (2002) Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 40: 2420-4.

Poole K e Srikumar R (2001) Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem* 1: 59-71.

Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N e Vinas M (2004) Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting *Arch Med Res* 35: 251-257.

Sarwari A, Hasan R, Lim CB, Ng Y, Ng C, Zaman S (2004) PCR identification and automated ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from intensive care patients. *Scand J Infect Dis* 36:342-349.

Severino P, Darini AL e Magalhães VD (1999) The discriminatory power of ribo-PCR compared to conventional ribotyping for epidemiological purposes. *APMIS* 107: 107910-84.

Speert DP (2002) Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Biosci* 1:354-61.

Vandamme P, Bernardet JF, Segers P, Kersters K e Holmes B (1994) New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 44:827-831.

Vilela MA (2001) Ocorrência e caracterização genética de cepas hospitalares multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* no Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Monografia de Especialização, Universidade de Pernambuco.

Welsh J e McClelland M (1991) Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic Acids Res* 19:861-866. .

Tabela 1. Distribuição do perfil genotípico (rDNA-PCR, tDNA-PCR e Duplex-PCR) em relação ao perfil de resistência antimicrobiana detectada em 34 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, coletados entre março de 2003 e janeiro de 2004.

Isolado Clínico	Padrão rDNA	Padrão tDNA	Padrão Duplex	Perfil de Resistência	Data da Coleta
				Antimicrobiana <sup>a</sup>	
6	R1	T1	R1T1	-	23/07/03
22	R1	T1	R1T1	-	02/12/03
28	R1	T1	R1T1	-	05/12/03
8	R1	T1	R1T1	2/	18/09/03
31	R1	T1	R1T1	5/	16/01/04
3	R1	T1	R1T1	5/6/	23/04/03
11	R1	T1	R1T1	2/5/	10/10/03
24	R5	T8	R5T8	5/6/	03/12/03
28	R1	T1	R1T1	2/5/	18/12/03
29	R1	T1	R1T1	2/5/	31/12/03
13	R1	T1	R1T1	2/5/6/	31/10/03
32	R1	T3	R1T3	2/5/7/	19/01/04
4	R1	T1	R1T1	2/3/5/6/7	30/04/03
26	R1	T1	R1T1	1/2/3/5/6/	04/12/03
27	R1	T1	R1T1	1/2/3/5/6/	13/12/03
33	R1	T1	R1T1	2/3/5/6/7/	22/01/04
1	R1	T1	R1T1	1/2/3/5/6/7/	06/03/03
5	R1	T1	R1T1	1/2/3/5/6/7/	27/06/03
10	R1	T1	R1T1	1/2/3/5/6/7/	07/10/03
12	R1	T1	R1T1	1/2/4/5/6/8/	23/10/03
14	R1	T1	R1T1	1/2/3/5/6/7/	31/10/03
15	R4	T7	R4T7	1/2/4/5/6/7/8/	04/11/03
19	R1	T1	R1T1	1/2/3/5/6/7/	26/11/03
21	R1	T4	R1T4	1/2/3/5/6/7/	28/11/03
23	R1	T1	R1T1	1/2/3/5/6/7/	03/12/03
30	R3	T6	R3T6	2/3/4/5/7/8/	09/01/04
2	R1	T2	R1T2	1/2/3/4/5/7/8/	16/04/03
9	R2	T5	R2T5	1/2/3/5/6/7/8/	06/10/03
16	R1	T1	R1T1	1/2/3/4/5/6/7/	10/11/03
17	R1	T1	R1T1	1/2/3/4/5/6/7/	11/11/03
18	R1	T1	R1T1	1/2/3/4/5/6/7/	18/11/03
20	R1	T1	R1T1	1/2/3/4/5/6/7/	28/11/03
34	R1	T1	R1T1	1/2/3/4/5/6/7/	27/01/04
7	R1	T1	R1T1	1/2/3/4/5/6/7/8/	11/09/03

<sup>a</sup> 1: Ciprofloxacina; 2:Gentamicina; 3:Amicacina; 4: Piperacilina/Tazobactam; 5:Cefotaxima; 6:Cefepima; 7:Imipenem; 8:Aztreonam; 9:Polimixina



## LEGENDA DE FIGURAS

**Figura 1.** Gel de agarose a 1.6%, apresentando os produtos amplificados pelo rDNA-PCR das cepas de referência de *P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. fluorescens*. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* PA01; Poço 2: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 3: *P. putida* ATCC 15175; Poço 4: *P. fluorescens* ATCC 13525.

**Figura 2.** Gel de agarose a 1.6%, apresentando os produtos amplificados pelo rDNA-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa*, isolado clínico de *P. aeruginosa* e isolado clínico de *Chryseobacterium meningosepticum*, todos com padrão de amplificação R1. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 2: isolado clínico 22; Poço 3: *Chryseobacterium meningosepticum*.

**Figura 3.** Gel de agarose a 1.6%, apresentando os padrões de amplificação pelo rDNA-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poços 2 a 6: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando cinco padrões de amplificação, R1, R2, R3, R4, R5, respectivamente.

**Figura 4.** Gel de agarose a 2%, apresentando os produtos amplificados pelo tDNA-PCR das cepas de referência de *P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. fluorescens*. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* PA01; Poço 2: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 3: *P. putida* ATCC 15175; Poço 4: *P. fluorescens* ATCC 13525.

**Figura 5.** Gel de agarose a 2%, apresentando os padrões de amplificação pelo

tDNA-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Figuras A a D: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando oito padrões de amplificação, (A) Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 2: isolado clínico 22 apresentando o padrão de amplificação T1; (B) Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poços 1 a 4: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando os padrões de amplificação T2, T3, T4, T5; (C) Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder. Poço 1: isolado clínico de *P. aeruginosa* apresentando o padrão de amplificação T6. (D) Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder. Poços 1 e 2: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando os padrões de amplificação T7 e T8.

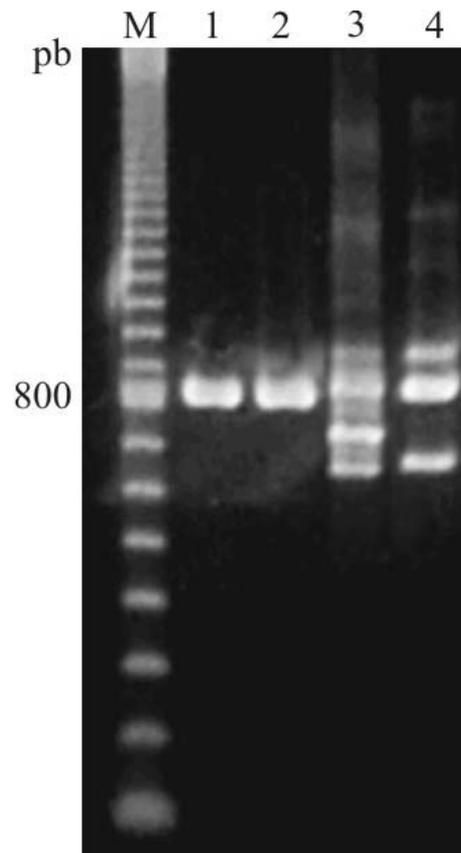
**Figura 6.** Gel de agarose a 1.8%, apresentando os produtos amplificados pelo Duplex-PCR das cepas de referência de *P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. fluorescens*. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder. Poço 1: *P. aeruginosa* PA01; Poço 2: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 3: *P. putida* ATCC 15175; Poço 4: *P. fluorescens* ATCC 13525.

**Figura 7.** Gel de agarose a 1.8%, apresentando os produtos amplificados pelo Duplex-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poços 1 a 9: isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentando oito padrões de amplificação R1T1, R1T2, R1T3, R1T4, R2T5, R3T6, R4T7, R5T8, respectivamente.

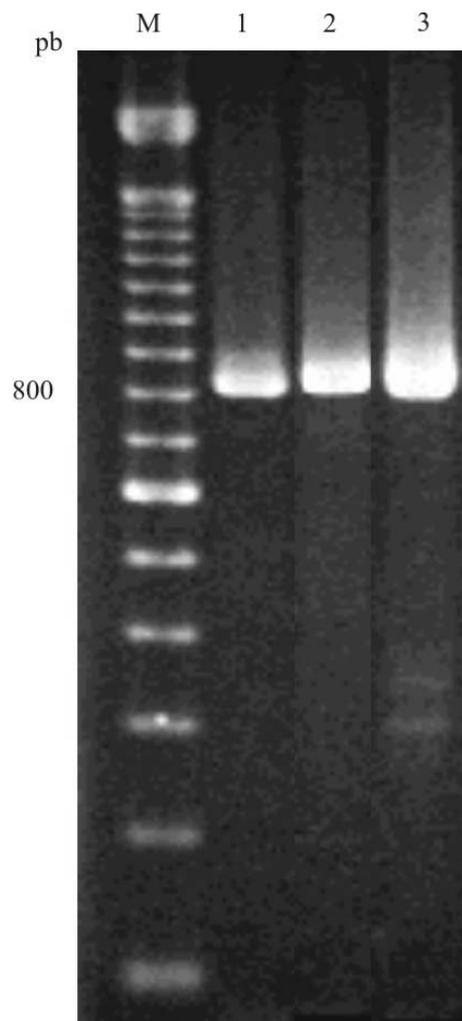
**Figura 8.** (A) Gel de agarose a 1.6%, apresentando os produtos amplificados pelo rDNA-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um mesmo paciente. Poço M: marcador de peso molecular 100bp

DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 2: isolado clínico 21 com padrão de amplificação R1; Poço3: isolado clínico 23 com padrão de amplificação R1; (B) Gel de agarose a 2%, mostrando os produtos amplificados pelo tDNA-PCR da cepa de referência de *P. aeruginosa* e dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um mesmo paciente. Poço M: marcador de peso molecular 100bp DNA ladder; Poço 1: *P. aeruginosa* ATCC 9027; Poço 2: isolado clínico 21 com padrão de amplificação T4; Poço 3: isolado clínico 23 com padrão de amplificação T1.

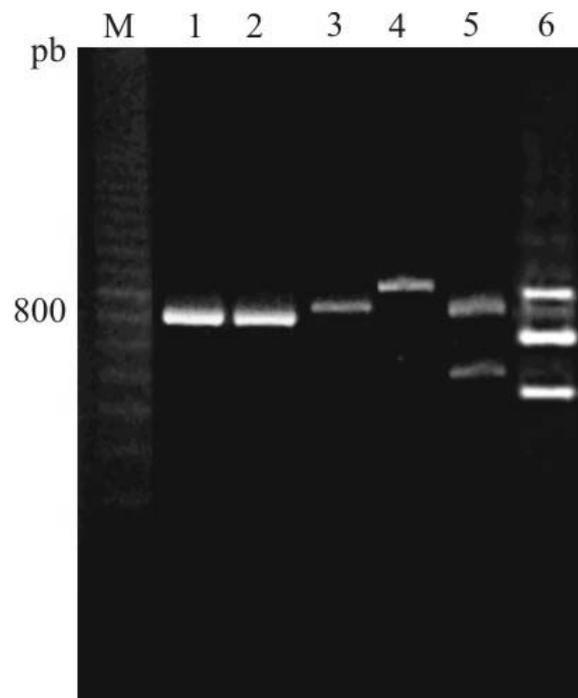
**Figura 9.** Análise computacional da relação entre os perfis de resistência a antibióticos dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* a partir de um programa de análise e distribuição de haplótipos (NetWork 4.1.0.8). Cada haplótipo, ou agrupamento fenotípico está identificado pelos círculos em cinza e os números correspondentes representam cada agrupamento. A área do círculo corresponde ao número de representantes bacterianos em cada agrupamento: 6 (6, 22 e 26), 8 (8), 11 (11, 28 e 29), 31 (31), 3 (3), 13 (13), 4 (4 e 33), 25 (25 e 27), 1 (1, 5, 10, 14, 19 e 23), 16 (16, 17, 18, 20 e 34), 7 (7) e 12 (12). O círculo em branco foi considerado a base da rede de agrupamentos e o *mv1* corresponde a um isolado previsto pela análise, mas não encontrado nas amostras. A distância entre cada agrupamento é proporcional ao número de passos entre eles, representados pela expressão das resistências aos antibióticos CH1 (Ciprofloxacina), CH2 (Gentamicina), CH3 (Amicacina), CH4 (Piperacilina/Tazobactam), CH5 (Cefotaxima), CH6 (Cefepima), CH7 (Imipinem ) CH8 e (Aztreonam).



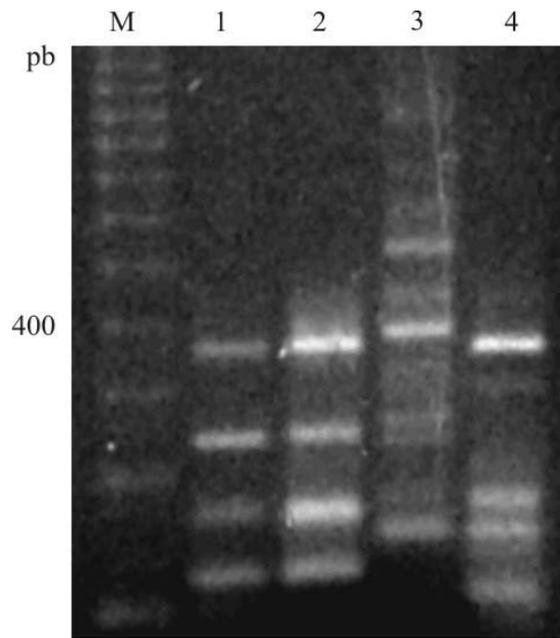
**Figura 1.**



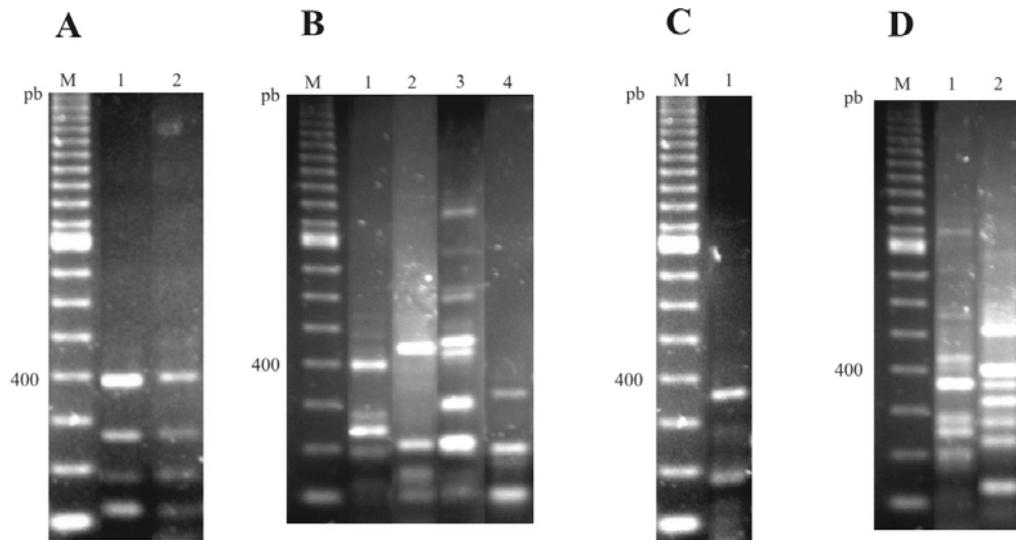
**Figura 2.**



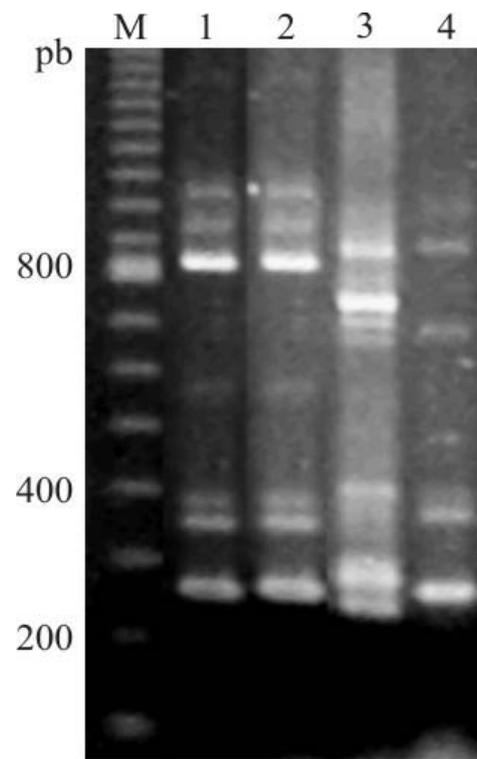
**Figura 3.**



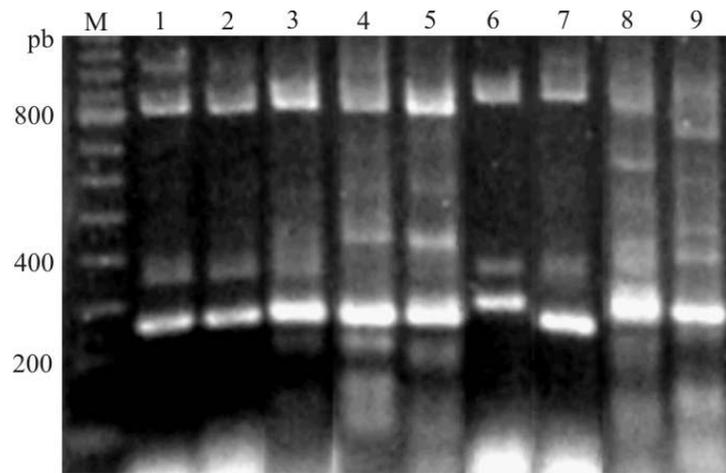
**Figura 4.**



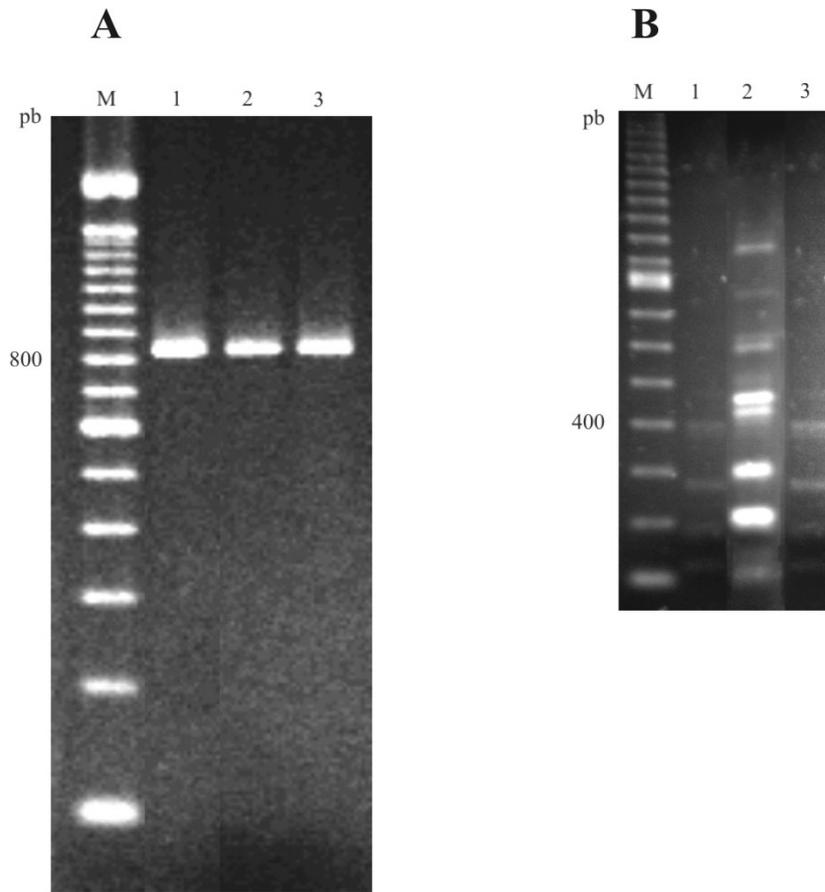
**Figura 5.**



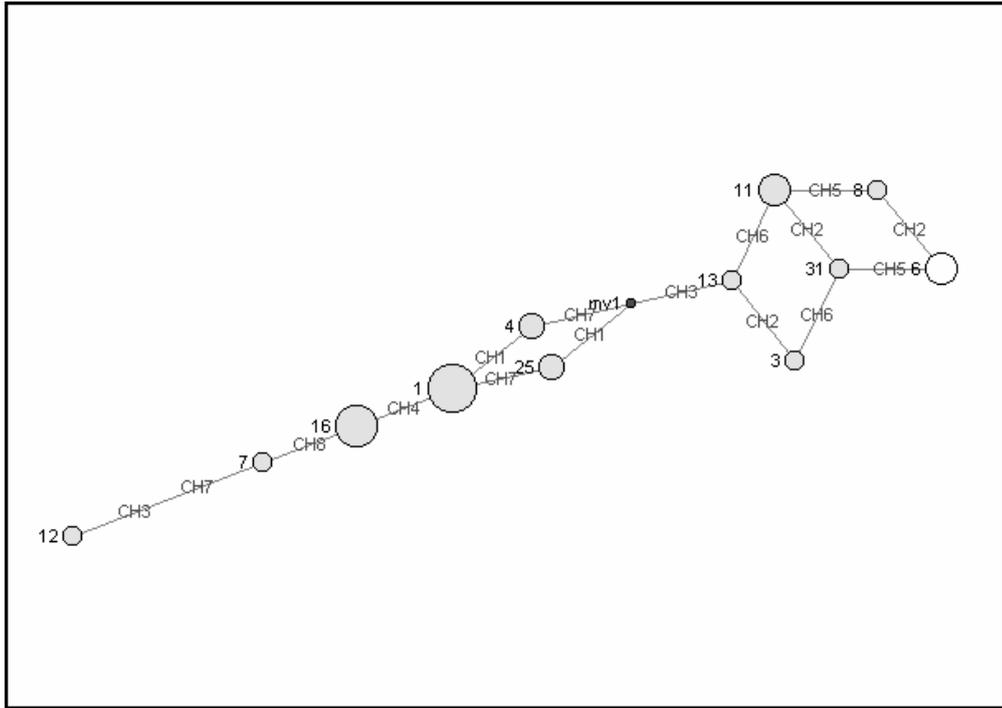
**Figura 6.**



**Figura 7.**



**Figura 8.**



**Figura 9.**

## 5. CONCLUSÕES

O rDNA-PCR revelou-se uma técnica reprodutível e estável para tipagem de polimorfismo intra-específico em *P. aeruginosa*, distinguiu cinco perfis de amplificação entre os isolados estudados, o que corresponde a um polimorfismo de 15%, contribuindo assim, para o monitoramento epidemiológico das infecções hospitalares causadas pela *P. aeruginosa*;

Quando da identificação bioquímica duvidosa, o rDNA-PCR não foi discriminatório, uma vez que um isolado de *Chryseobacterium meningosepticum* apresentou o mesmo perfil de amplificação da cepa de referência *P. aeruginosa* ATCC 9027;

O tDNA-PCR revelou-se uma técnica reprodutível, estável e com maior poder discriminatório que o rDNA-PCR. Identificou oito perfis de amplificação entre os isolados de *P. aeruginosa*, o que corresponde a um polimorfismo de 23%, servindo como um segundo marcador epidemiológico;

Quando da identificação bioquímica duvidosa, o tDNA-PCR pode auxiliar na identificação de *P. aeruginosa*, uma vez que o isolado apresente o perfil padrão das cepas de referência;

O Duplex-PCR demonstrou ser uma ferramenta segura quando da utilização na busca de polimorfismo intra-específico em *P. aeruginosa*, pois reforçou a variabilidade genética apresentada pelo tDNA-PCR;

Os perfis de amplificação produzidos pelo rDNA-PCR e tDNA-PCR quando aplicados em surtos de infecção hospitalar por *P. aeruginosa*, em associação ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana, podem auxiliar na consubstanciação de dados para fins epidemiológicos no controle de infecções adquiridas em ambiente hospitalar.

## 6. ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an ubiquitous and opportunistic Gram-negative bacterium. Phenotypical markers utilized in routine hospital sometimes do not show the diversity of bacteria spread on the different areas. Thus, we apply three molecular methods, rDNA-PCR, tDNA-PCR and Duplex-PCR, to characterize the genetic diversity of *P. aeruginosa* strains isolated from a public hospital in Recife-PE, Brazil. The rDNA-PCR showed 15% of genetic variability, against 23% for tDNA-PCR and 23% for Duplex-PCR. The Intensive Care Unity showed four different genotypes. Colonized patients represent a continuous reservoir of strains from which other patients can be colonized via cross-acquisition. The occurrence of *P. aeruginosa* strain belonging to a unique genotype and multidrug-resistant profile (MDR), in different areas in the hospital implies in cross-infection between the patients. The data of the rDNA-PCR, tDNA-PCR and Duplex-PCR, together with the antibiotic susceptibility profile provides valuable molecular epidemiology information for the control of hospital-acquired *P. aeruginosa* infections.

**Key words:** *P. aeruginosa*, molecular typing, rDNA-PCR, tDNA-PCR, Duplex-PCR.

**7. ANEXOS**

**Anexo 1. Non-coding RNA gene**

<b>PA#</b>	<b>Product Name</b>	<b>Alt Product Name</b>	<b>Gene Name</b>	<b>Alt Gene Name</b>	<b>Range From</b>	<b>Range To</b>
<u>PA0263.1</u>	tRNA-Arg				298892	298816
<u>PA0574.1</u>	tRNA-Met				630510	630434
<u>PA0668.1</u>	16S ribosomal RNA				722096	723631
<u>PA0668.2</u>	tRNA-Ile				723696	723772
<u>PA0668.3</u>	tRNA-Ala				723801	723876
<u>PA0668.4</u>	23S ribosomal RNA				724103	726993
<u>PA0668.5</u>	5S ribosomal RNA				727136	727255
<u>PA0729.1</u>	tRNA-Gly				797794	797721
<u>PA0905.1</u>	tRNA-Ser				991260	991350
<u>PA0905.2</u>	tRNA-Arg				991468	991544
<u>PA0905.3</u>	tRNA-Arg				991656	991732
<u>PA0922.1</u>	tRNA-Met				1007803	1007727
<u>PA0976.1</u>	tRNA-Lys				1060356	1060431
<u>PA1013.1</u>	tRNA-Ser				1096867	1096956
<u>PA1530.1</u>	4.5S ribosomal RNA		ffs		1668840	1669799
<u>PA1796.1</u>	tRNA-Arg				1947320	1947396
<u>PA1796.2</u>	tRNA-His				1947448	1947523

<u>PA1796.3</u>	tRNA-Leu	1947578	1947662
<u>PA1796.4</u>	tRNA-His	1947729	1947804
<u>PA1804.1</u>	tRNA-Asp	1959083	1959159

<b>PA#</b>	<b>Product Name</b>	<b>Alt Product Name</b>	<b>Gene Name</b>	<b>Alt Gene Name</b>	<b>Range From</b>	<b>Range To</b>
<u>PA2570.1</u>	tRNA-Leu				2906051	2905965
<u>PA2581.1</u>	tRNA-Cys				2918676	2918603
<u>PA2583.1</u>	tRNA-Gly				2923297	2923222
<u>PA2603.1</u>	tRNA-Ser				2947672	2947583
<u>PA2736.1</u>	tRNA-Pro				3099382	3099306
<u>PA2775.1</u>	tRNA-Val				3133525	3133449
<u>PA2819.1</u>	tRNA-Gly				3173674	3173599
<u>PA2819.2</u>	tRNA-Gly				3173834	3173759
<u>PA2819.3</u>	tRNA-Glu				3173912	3173837
<u>PA2852.1</u>	tRNA-Ser				3206408	3206497
<u>PA3031.1</u>	tRNA-Pro				3395190	3395266
<u>PA3094.1</u>	tRNA-Asp				3475533	3475457
<u>PA3094.2</u>	tRNA-Asp				3475724	3475648

<u>PA3094.3</u>	tRNA-Val	3475816	3475741
<u>PA3133.1</u>	tRNA-Glu	3514798	3514723
<u>PA3133.2</u>	tRNA-Ala	3514920	3514845
<u>PA3133.3</u>	tRNA-Glu	3515089	3515014
<u>PA3133.4</u>	tRNA-Ala	3515213	3515138
<u>PA3139.1</u>	tRNA-Asn	3524012	3524087
<u>PA3262.1</u>	tRNA-Asp	3650798	3650722

<b>PA#</b>	<b>Product Name</b>	<b>Alt Product Name</b>	<b>Gene Name</b>	<b>Alt Gene Name</b>	<b>Range From</b>	<b>Range To</b>
<u>PA3262.2</u>	tRNA-Val				3650890	3650815
<u>PA3368.1</u>	tRNA-Arg				3778730	3778654
<u>PA3824.1</u>	tRNA-Leu				4281665	4281751
<u>PA4276.1</u>	tRNA-Trp				4784259	4784184
<u>PA4277.1</u>	tRNA-Thr				4785668	4785593
<u>PA4277.2</u>	tRNA-Gly				4785761	4785688
<u>PA4277.3</u>	tRNA-Tyr				4785872	4785788
<u>PA4280.1</u>	5S ribosomal RNA				4788693	4788574
<u>PA4280.2</u>	23S ribosomal RNA				4791724	4788836
<u>PA4280.3</u>	tRNA-Ala				4792026	4791951

<u>PA4280.4</u>	tRNA-Ile	4792131	4792055
<u>PA4280.5</u>	16S ribosomal RNA	4793731	4792196
<u>PA4524.1</u>	tRNA-Thr	5069007	5068932
<u>PA4541.1</u>	tRNA-Lys	5087000	5086925
<u>PA4541.2</u>	tRNA-Pro	5087087	5087011
<u>PA4541.3</u>	tRNA-Asn	5087172	5087097
<u>PA4581.1</u>	tRNA-Arg	5131082	5131155
<u>PA4669.1</u>	tRNA-Gln	5238277	5238351
<u>PA4673.1</u>	tRNA-Met	5242026	5242102
<u>PA4690.1</u>	5S ribosomal RNA	5264219	5264100

<b>PA#</b>	<b>Product Name</b>	<b>Alt Product Name</b>	<b>Gene Name</b>	<b>Alt Gene Name</b>	<b>Range From</b>	<b>Range To</b>
<u>PA4690.2</u>	23S ribosomal RNA				5267252	5264362
<u>PA4690.3</u>	tRNA-Ala				5267554	5267479
<u>PA4690.4</u>	tRNA-Ile				5267659	5267583
<u>PA4690.5</u>	16S ribosomal RNA				5269259	5267724
<u>PA4746.1</u>	tRNA-Met				5332163	5332087
<u>PA4746.2</u>	tRNA-Leu				5332339	5332254
<u>PA4802.1</u>	tRNA-Sec				5387857	5387766
<u>PA4937.1</u>	tRNA-Leu				5541614	5541700

<u>PA4937.2</u>	tRNA-Leu	5541830	5541916
<u>PA5149.1</u>	tRNA-Phe	5798560	5798635
<u>PA5160.1</u>	tRNA-Thr	5809970	5810045
<u>PA5369.1</u>	5S ribosomal RNA	6039703	6039584
<u>PA5369.2</u>	23S ribosomal RNA	6042736	6039846
<u>PA5369.3</u>	tRNA-Ala	6043038	6042963
<u>PA5369.4</u>	tRNA-Ile	6043143	6043067
<u>PA5369.5</u>	16S ribosomal RNA	6044743	6043208

## Anexo 2. Carta do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/HUOC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/HUOC

Recife, 1º de outubro de 2003

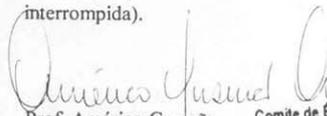
Para: Dra. Isabel Cristina Guerra Spacov

De: Prof. Wilson de Oliveira Jr.

Senhora Pesquisadora:

Informamos a V.Sa. que o Projeto de Pesquisa - Protocolo no. 28. 8.026 *Pseudomonas aeruginosa: distribuição clínica e análise molecular de isolados multiresistentes* foi analisado e APROVADO por este Comitê.

Solicitamos seja-nos remetido Relatório Final ou Parcial (caso a pesquisa seja interrompida).

  
Prof. Américo Gusmão  
Vice-Coordenador

  
Comite de Ética em Pesquisa  
CEP/HUOC  
Prof. Américo Gusmão  
Vice-Coordenador

## **8. APÊNDICE**

## 1. Instruções para Autores

**Revista**

***GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY***

ISSN 1678-4685 *online version*

(Ribeirão Preto, Brasil)

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

© 2002-2004 Sociedade Brasileira de Genética

- \* Scope and policy
- \* Submission of papers

### Scope and policy

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although Genetics and Molecular Biology is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

### Submission of papers

1. Manuscripts should be submitted to Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief in the address below.

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

1. A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere;

2. A copy of the manuscript, including original figures.

3. A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.

4. A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files

(For Figures, see detailed instructions in 3.1.g). Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

### 3. Categories of Contribution

#### 3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>).

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhyncosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

Sample book citation:

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) *Populações Brasileiras*. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) *Elementos de Genética*. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

Sample abstracts in meeting citation:

Basile R (1973) Cromossomos Politénicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de *Rhyncosciara*. *Ciênc e Cult* 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

Sample Thesis/Dissertation citation:

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the *Tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD, Van Dyke T (2004) pRb Inactivation in Mammary Cells Reveals Common Mechanisms for Tumor Initiation and Progression in Divergent Epithelia. *Plos Biol* 2: 194-205. <http://www.plosbiology.org>.

Sample Electronic Database citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

f) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

g) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

h) Nomenclature: current standard international nomenclature should be adhered to.

i) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

j) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

k) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the work was approved by the institutional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories: accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.