

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas

Pesquisa de genes de metalo- β -lactamases em
Pseudomonas aeruginosa isoladas em três
hospitais universitários de Porto Alegre

Patrick Barcelos Gaspareto

Porto Alegre, 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas

Pesquisa de genes de metalo- β -lactamases em
Pseudomonas aeruginosa isoladas em três
hospitais universitários de Porto Alegre

Dissertação apresentada por **Patrick Barcelos Gaspareto** para
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Porto Alegre, 2005

Este trabalho foi realizado nas Unidades de Pesquisa Biomédica e Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com bolsa de estudos financiada pela CAPES e apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) do HCPA .

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Afonso Barth, pela confiança em mim depositada bem como pela possibilidade de aprimoramento pessoal e profissional e pela amizade.

Aos meus pais, Ivan e Elusa, por abrirem mão de muitas coisas em prol de minha formação bem como pelo constante estímulo a esse objetivo.

Ao meu irmão Otávio por ter pacientemente escutado muitas das idéias surgidas durante o trabalho.

À Dra. Susane Silbert e à biomédica Liana Menezes pela recepção e oportunidade de aprimoramento quando de minha estada no LEMC/EPM.

À colega farmacêutica Fernanda Concli Leite durante a padronização da técnica molecular.

Às farmacêuticas Alice Machado e Marisa Chesky pelo apoio técnico e possibilidade de uso da estrutura da Unidade de Biologia Molecular do HCPA.

À Dra. Carmen Pilla pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho na Unidade de Pesquisa Biomédica do HCPA.

Aos amigos Roberto Viana Santos, Rafael Moresco e Adroaldo Lunardelli pelo companheirismo e desprendimento durante toda a realização deste trabalho.

Às colegas Andreza Martins, Ana Lúcia Gonçalves e Larissa Lutz pelo companheirismo e discussão dos resultados de muitos experimentos

Ao Profs. Drs. Jarbas de Oliveira e Geraldo Atílio De Carli pela amizade e estímulo à pesquisa e ao aperfeiçoamento constante.

À CAPES pelo financiamento de minha bolsa de estudos.

Ao PPG em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de aprimoramento profissional e pessoal bem como a todos os amigos nele feitos.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do HCPA (FIPE) pelo apoio financeiro sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	03
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	03
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	04
3.2 CARBAPENÊMICOS.....	05
3.3 RESISTÊNCIA EM <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	06
3.4 CARBAPENEMASES.....	07
3.4.1 HISTÓRICO E EVOLUÇÃO.....	07
3.4.2 METALO-BETA-LACTAMASES – IMPORTÂNCIA.....	09
3.4.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	10
3.4.4 EPIDEMIOLOGIA DAS METALO-B-LACTAMASES.....	11
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	14
4.1.1 MATERIAIS.....	14
4.1.2 APARELHOS E EQUIPAMENTOS.....	14

4.1.3 CEPAS BACTERIANAS.....	15
4.2 MÉTODOS.....	15
4.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO.....	15
4.2.2 DETECÇÃO FENOTÍPICA DAS METALO-B-LACTAMASES.....	15
4.2.3 DETECÇÃO DO GENE <i>BLA_{SPM-1}</i>.....	16
4.2.4 DETECÇÃO DO GENE <i>BLA_{VIM-2}</i>.....	17
4.2.5 DETECÇÃO DO GENE <i>BLA_{IMP-1}</i>.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DO GENE <i>BLA_{SPM-1}</i>.....	19
5.2 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DO GENE <i>BLA_{VIM-2}</i>.....	19
5.3 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DO GENE <i>BLA_{IMP-1}</i>.....	20
5.4 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE TÉCNICA DE PCR COM AMOSTRAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>.....	21
5.5 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS FENOTÍPICAS COM TÉCNICA MOLECULAR.....	28
5.6 PREVALÊNCIA DOS GENES DE MBL ENTRE AMOSTRAS CLÍNICAS DE <i>P.</i> <i>AERUGINOSA</i> RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS.....	30
6 CONCLUSÕES.....	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
8 BIOGRAFIA.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do imipenem.....	06
Figura 2. Similaridade molecular entre as famílias de metalo- β -lactamases.....	10
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose de produto da PCR para pesquisa do gene <i>bla</i> _{SPM-1} em amostras clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	22
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose de produto da PCR para pesquisa do gene <i>bla</i> _{SPM-1} em amostras clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	23
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose de produto da PCR para pesquisa do gene <i>bla</i> _{SPM-1} em amostras clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	24
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose de produto da PCR para pesquisa do gene <i>bla</i> _{IMP-1} em amostras clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose de produto da PCR para pesquisa do gene <i>bla</i> _{IMP-1} em amostras clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	26
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose de produto da PCR para pesquisa do gene <i>bla</i> _{VIM-2} em amostras clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos através das técnicas fenotípica e molecular em amostras clínicas de *P. aeruginosa* 29

Tabela 2: Comparativo entre os resultados obtidos entre as técnicas fenotípicas e molecular em amostras clínicas de *P. aeruginosa*.....30

ABREVIATURAS

ATCC *American Type Culture Collection*

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

MBL Metalo- β -lactamase

CIM Concentração Inibitória Mínima

***bla*_{IMP-1}** Gene de Metalo- β -lactamase IMP-1

***bla*_{VIM-2}** Gene de Metalo- β -lactamase VIM-2

***bla*_{SPM-1}** Gene de Metalo- β -lactamase SPM-1

CFZ Ceftazidima

IMP Imipenem

HCPA Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSL Hospital São Lucas da PUCRS

ISCMPA Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

RESUMO

Objetivos: Padronizar uma técnica molecular, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar os genes *bla*_{SPM-1} , *bla*_{VIM-2} e *bla*_{IMP-1} que conferem a *Pseudomonas aeruginosa* resistência a carbapenêmicos (imipenem e meropenem) através da produção das metalo-β-lactamases (MBL) SPM-1, VIM-2 e IMP-1. Comparar os resultados obtidos com a técnica de PCR com os obtidos através de uma técnica fenotípica para detecção desse mecanismo enzimático de resistência. Descrever a prevalência dos genes de MBL.

Metodologia: Utilizando 48 amostras clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou imipenem sendo 37 caracterizadas como produtoras de MBL através de uma técnica fenotípica (aproximação de disco) e 11 como não produtoras pela mesma técnica. Esses isolados foram testados com três *primers* específicos para os seguintes genes: *bla*_{SPM-1} , *bla*_{VIM-2} e *bla*_{IMP-1}

Resultados e Discussão: Dos 37 isolados produtores de metalo-β-lactamase, 29 tiveram resultado positivo na PCR sendo 27 positivos para o gene *bla*_{SPM-1} e 2 positivos para o gene *bla*_{IMP-1} . Em nenhum isolado foi detectado o gene *bla*_{VIM-2} .Oito isolados caracterizados como produtores de MBL não tiveram nenhum produto amplificado com os três pares de *primers*. Os 11 isolados caracterizados como não produtores de MBL não tiveram produto amplificado. Assim, a sensibilidade da técnica molecular foi de 78,40% e a especificidade 100,0% considerando a técnica fenotípica de aproximação de disco como padrão ouro. **Conclusões:** Foi possível a padronização da técnica de PCR para a detecção dos genes *bla*_{SPM-1} , *bla*_{VIM-2} e *bla*_{IMP-1} bem como foi possível a comparação entre a técnica de PCR e a técnica fenotípica, sendo que a metodologia molecular apresentou 100% de especificidade e 78,40% de sensibilidade. O gene de MBL mais prevalente foi *bla*_{SPM-1} encontrado em 27/29 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem. O gene *bla*_{IMP-1} foi detectado em apenas 2/29 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem. O gene *bla*_{VIM-2} e não foi detectado nas amostras de *P.aeruginosa* analisadas neste estudo.

Palavras –chave: *Pseudomonas aeruginosa* , resistência a carbapenêmicos, metalo-β-lactamase.

Research of metallo- β -lactamases genes in *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in Porto Alegre

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to establish a molecular tool, Polymerase Chain Reaction, to search for genes which confer resistance to carbapenems (imipenem and meropenem) by *Pseudomonas aeruginosa* due to the production of metallo- β -lactamases (MBL). Compare the results from PCR with that acquired with a phenotypic method. Describe the prevalence of MBL genes. **Methodology:** Isolates resistant to ceftazidime and/or imipenem characterized as MBL producers by a phenotypic method were included in this study. A total of 48 isolates of *P. aeruginosa* were tested and 37 were characterized as MBL producers by the phenotypic method. Three primers (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}) were used to detect the main MBL genes. **Results and Discussion:** A total of 29/37 isolates MBL producers presented positive PCR result (27 *bla*_{SPM-1} and 2 *bla*_{IMP-1}). It was not possible to establish which gene was involved in resistance 8 isolates classified as MBL producers. The specificity and sensibility of the PCR, as compared with the phenotypic method, were 100,0% and 78,40%, respectively. **Conclusions:** It was possible to set a PCR protocol to detect the metallo- β -lactamase which presented 100% and 78,4% of specificity and sensibility. The most common gene detected was *bla*_{SPM-1} followed by IMP-1. None sample belong the gene *bla*_{VIM-2}.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, resistance to carbapenem, metallo- β -lactamase.

1 – Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram negativo não fermentador da glicose que sob o ponto de vista epidemiológico possui três aspectos relevantes:

- 1- É um patógeno comum em ambiente nosocomial sendo isolado dos mais diferentes sítios ocupando posição de destaque como causador de infecção hospitalar.
- 2- Coloniza/infecta o trato respiratório de pacientes afetados pela fibrose cística sendo responsável pelo alto índice de morbimortalidade desses pacientes;
- 3- Apresenta resistência a diversos antimicrobianos quando comparado a Enterobactérias sendo esse um aspecto que contribui para a dificuldade do tratamento de infecções provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

Diminuição da permeabilidade, produção de enzimas que degradam antibióticos e expressão de uma bomba de efluxo que transporta para fora da célula bacteriana diversos agentes antibacterianos (tetraciclina, fluoroquinolonas, cefalosporinas e penicilinas) são mecanismos de resistência encontrados em *P. aeruginosa*.

O tratamento de infecções por *P. aeruginosa* pode ser feito com antibióticos de diferentes classes (aminoglicosídeos, quinolonas, etc...) sendo os antibióticos β -lactâmicos o grupo de fármacos mais utilizado. Assim, o aztreonam, as cefalosporinas (em particular a ceftazidima) e as combinações β -lactâmico/inibidor β -lactamase (tipo piperacilina/tazobactam) têm sido escolhidos para o tratamento de infecções embora os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) sejam o grupo efetivamente mais ativo contra *P.*

aeruginosa. A grande maioria dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresenta sensibilidade aos carbapenêmicos sendo muito poucos os mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* que conferem resistência plena a esses antibióticos. Recentemente, foram descritos isolados de *P. aeruginosa* produtores de β -lactamases denominadas carbapenemases, enzimas dependentes do íon zinco, por isso classificadas como metalo- β -lactamase (MBL) as quais são capazes de hidrolizar diversos antibióticos incluindo os carbapenêmicos, conferindo alto grau de resistência à bactéria. Até a atualidade, quatro famílias de MBL foram descritas: IMP, VIM, SPM e GIM. Como os carbapenêmicos correspondem à última opção terapêutica para o tratamento de infecções severas por *P. aeruginosa* multirresistente, a redução da atividade desses antibióticos devido à expressão de MBL acarretará em sérios riscos na terapia das infecções hospitalares provocadas por esse patógeno. Como a incidência de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos tem aumentado em nosso meio, e as técnicas fenotípicas para detecção de MBL não tem a capacidade de identificar as MBL específicas, é importante o desenvolvimento de uma técnica molecular, no caso a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a detecção do(s) gene(s) responsável(is) pela expressão de metalo- β -lactamases.

2- Objetivos

Objetivo Geral:

Detectar, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1} responsáveis pela expressão das enzimas metalo- β -lactamases IMP-1, VIM-2 e SPM-1, em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentem resistência a ceftazidime e/ou imipenem.

Objetivos Específicos:

- 1- Padronizar a técnica molecular para detecção dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1} em *P. aeruginosa* resistente a ceftazidime e/ou imipenem;
- 2- Comparar os resultados obtidos com a técnica fenotípica para detecção de MBL;
- 3- Descrever a prevalência dos genes de metalo- β -lactamases entre *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou imipenem.

3 – Revisão Bibliográfica

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo com aproximadamente 1,5-3,0 μm de comprimento e 0,5 μm de largura. É uma espécie estritamente aeróbia, que não forma esporos e sua mobilidade se deve, usualmente, a presença de um único flagelo. *P. aeruginosa* cresce em temperaturas que variam de 5°C a 42°C, sendo 37°C a temperatura considerada ideal (PITT 1997).

P. aeruginosa é um organismo metabolicamente versátil, capaz de crescer em meios de cultura mínimos, composto simplesmente de sais minerais, glicose e ágar. As colônias de *P. aeruginosa* podem ser identificadas rapidamente por sua aparência no meio de cultura, por pigmentação verde-azulada (resultado da produção de piocianina) e pelo odor de frutas característico. (PITT 1997). As colônias podem apresentar seis formas diferentes, desde colônia plana e difusa, característica da maioria dos isolados clínicos até colônias bem diminutas. Colônias com aspecto mucóide são comuns nas amostras isoladas de infecções do trato respiratório, principalmente de pacientes com fibrose cística.

P. aeruginosa produz no mínimo quatro pigmentos distintos: piocianina (azul), pioverdina (amarelo-esverdeado), piorrubrina (vermelho) e piomelanina (marrom para o preto). A piocianina é um pigmento solúvel em água e clorofórmio e é encontrada em aproximadamente 80% das amostras. Sua produção é estimulada pela presença de glicerol, magnésio, potássio e ferro. A pioverdina é solúvel em água, mas não em clorofórmio e é encontrada em outras espécies fluorescentes de *Pseudomonas*. A piorrubrina é solúvel em água e insolúvel em clorofórmio e a piomelanina é distinta quimicamente da

melanina animal. Os últimos dois pigmentos citados são produzidos por menos de 2% dos isolados clínicos (PITT 1997).

A confirmação da identificação da espécie *P. aeruginosa* pode ser realizada pela oxidação da glicose em meio basal, produção da arginina dehidrolase, crescimento à 42⁰C, redução do nitrato em nitrito e inabilidade de utilizar a maltose em meio de amônia com sais e açúcares (PITT 1997).

Pseudomonas aeruginosa coloniza o trato respiratório de pacientes com Fibrose Cística (FC) estando relacionada com o aumento da severidade da doença bem como sendo causa principal da morbidade e mortalidade em indivíduos afetados pela FC (BARTH 1995; SILBERT 2001) .

P. aeruginosa é um patógeno nosocomial com envolvimento em Infecção Hospitalar (IH) provocando infecções oportunistas em pacientes especialmente aqueles imunocomprometidos (LOUREIRO 2002). Surtos provocados por *P. aeruginosa* multirresistente têm sido detectados em diferentes unidades de internação, principalmente em Centros de Tratamento Intensivo (CTI). Esses surtos podem ser breves ou persistirem por longos períodos de tempo com a mesma cepa sendo identificada num período superior a um ano (FREITAS 2002).

3.2 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são antibióticos da classe dos β -lactâmicos que possuem um anel de 5 membros com uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 bem como o heteroátomo de enxofre substituído pelo carbono, em relação à molécula original da penicilina (SADER 2001). A tienamicina é o protótipo dos carbapenêmicos, dela derivando o imipenem (Figura 1) e meropenem, potentes fármacos disponíveis comercialmente para o tratamento de infecções provocadas por *P. aeruginosa* multirresistente (SADER 2001). Esses dois carbapenêmicos possuem considerável estabilidade às β -lactamases bacterianas bem como amplo espectro de atividade quando comparado com outros β -lactâmicos (SADER 2001). Recentemente foi introduzido no mercado brasileiro um novo carbapenêmico, o ertapenem, que apresenta maior atividade frente às Enterobactérias do que o imipenem,

entretanto sua atividade contra *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e *Acinetobacter spp.* é inferior à atividade do imipenem (SADER 2001) .

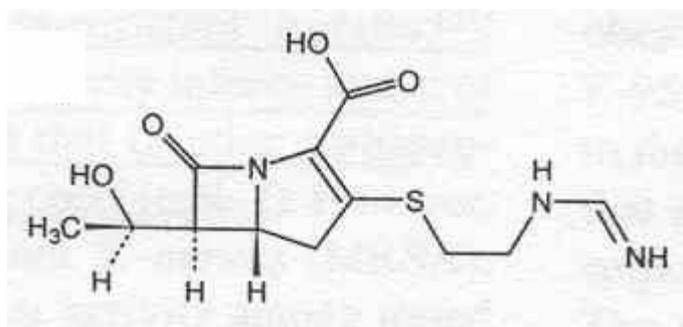


Figura 1: Estrutura molecular do imipenem

3.3 Resistência em *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa apresenta resistência intrínseca a diversos antibióticos num grau variado, sendo, caracteristicamente, menos suscetível que as Enterobactérias à maioria dos antimicrobianos (LIVERMORE 2001). Os principais mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* consistem na presença de um sistema de efluxo de múltiplas drogas, principalmente MexA-MexB-OprM, redução na absorção do antimicrobiano devido à perda de um canal para entrada da droga, em particular a porina OprD, e a expressão de enzimas, como AmpC, IMP e VIM (QUINTILIANI 1999; LIVERMORE 2001; NORDMANN 2003).

A regulação positiva (*upregulation*) da bomba de efluxo MexA-MexB-OprM em *P. aeruginosa* surge com alta frequência como resultado de mutação elevando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol, mas não repercutindo sobre imipenem. Os mutantes podem ser selecionados *in vitro* ou durante a terapia com fluoroquinolonas, penicilinas e cefalosporinas sendo o fenótipo predominante quando carbenicilina e ticarcilina foram amplamente usadas no tratamento antipseudomonas (LIVERMORE 2001). A resistência a imipenem tipicamente reflete a absorção reduzida desse antimicrobiano como resultado da perda da proteína OprD, uma porina permeável a esse carbapenem (TSAKRIS 2000). A resistência por esse mecanismo co-depende da continuada expressão da β -lactamase cromossômica AmpC sendo que a resistência total a

imipenem e meropenem inclusive, surgiria a partir de dois eventos mutacionais que levariam à perda da porina OprD somada a *upregulation* da bomba MexA-MexB-OprM (LIVERMORE 2001).

Mecanismo de resistência devido à expressão de enzimas tem sido identificado em *P. aeruginosa*. As β -lactamases de espectro ampliado inibidas pelo ácido clavulânico (ESBL), que formam a classe A de Ambler, já foram descritas em *P. aeruginosa* com os tipos TEM e SHV bem como PER-1 e VEB-1, que hidrolizam ceftazidime e cefepime, embora esse não seja um mecanismo muito comum na espécie. As enzimas de classe B, denominadas metalo- β -lactamases (MBL) compreendem as famílias IMP, VIM, SPM e GIM possuindo amplo perfil de hidrólise possibilitando a resistência a todos os agentes β -lactâmicos exceto monobactams (LIVERMORE 2001; NORDMANN 2002; NORDMANN 2003; CASTANHEIRA 2004). Enzimas da classe D incluem as oxacilinasas OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA-27, que também hidrolizam carbapenêmicos mas em menor intensidade que as MBL. (NORDMANN 2002).

3.4 Carbapenemases

A descrição de carbapenemases em *P. aeruginosa* tem aumentado nos últimos anos. Esse grupo de enzimas constituído de β -lactamases pertencentes à classe A (penicilinasas), classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinasas) de Ambler. Essas enzimas têm em comum a capacidade de hidrolizar, pelo menos parcialmente, imipenem ou meropenem juntamente com outros antibióticos β -lactâmicos (penicilinas ou cefalosporinas) (NORDMANN 2002).

3.4.1 Histórico e Evolução

As poucas carbapenemases da classe A de Ambler são raramente descritas em isolados de Enterobactérias. Elas pertencem ao grupo 2f como definido na classificação de Bush, Jacoby e Medeiros sendo definidas como penicilinasas inibidas pelo ácido clavulânico (NORDMANN 2002). Compreendem as enzimas NMC-A, que foi a primeira carbapenemase da classe A isolada a partir de um *Enterobacter cloacae* em 1990. SME-1 foi identificada de uma *Serratia marcescens* obtida em Londres em 1982, antes de

qualquer carbapenêmico estar disponível no mercado. IMI-1 foi identificada num *E. cloacae* proveniente da Califórnia em 1984. KPC-1 foi identificada num isolado de *Klebsiella pneumoniae* dos Estados Unidos resistente a carbapenêmicos, cefalosporinas de espectro estendido e aztreonam. GES-2, que deriva de uma mutação pontual da enzima GES-1, foi identificada num isolado de *P. aeruginosa* proveniente da África do Sul. Sua atividade contra carbapenêmicos é cerca de 1000 vezes inferior à das enzimas SME-1 e NMC-A (NORDMANN 2002).

IMP-1 foi a primeira carbapenemase da classe B de Ambler identificada como determinante de resistência a carbapenêmicos num isolado de *S. marcescens* no Japão em 1991 (SENDA 1996). Como a maioria das metalcarbapenemases, IMP-1 apresenta um amplo perfil de substratos, incluindo cefalosporinas de espectro estendido (cefotaxime, ceftazidime, cefepime) e carbapenêmicos (imipenem e meropenem), sendo que somente os monobactâmicos (aztreonam) não sofrem hidrólise (NORDMANN 2002). Essa MBL é uma enzima binuclear dependente de zinco cuja atividade é suscetível a EDTA, porém não é inibida por ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. A análise do gene *bla*_{IMP-1} revelou características típicas de um gene inserido num *integron*, que é um elemento capaz de agrupar genes responsáveis por resistência a antibióticos na forma de cassetes gênicos. Os cassetes gênicos são definidos como um gene de resistência precedido por um sítio de ligação ribossomal, um sítio de recombinação, conhecido como elemento de 59-bases (59-be), localizado *downstream* do gene integrado (NORDMANN 2002). A segunda MBL da classe B de Ambler (VIM-1) foi identificada a partir de um isolado de *P. aeruginosa* proveniente de Verona, Itália (LAURETTI 1999). Outras MBL derivadas de IMP-1 e VIM-1 foram descritas em diversas regiões do mundo (NORDMANN 2002). Em 2003, no Brasil, foi descrita uma nova MBL denominada de SPM-1 que foi identificada num isolado de *P. aeruginosa* apresentando 35,5% de homologia com a seqüência de aminoácidos da enzima IMP-1 (TOLEMAN 2002, GALES 2003). Uma quarta família de MBL foi descrita por Castanheira e colaboradores (2004) em 5 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de diferentes pacientes internados na mesma unidade de um hospital em Düsseldorf, Alemanha. Essa nova MBL foi denominada GIM-1. A caracterização bioquímica dessa enzima demonstrou

que ela tem similaridade com a família IMP de , aproximadamente, 40%, (Figura 2). Diferentemente de outras β -lactamases da classe B que apresentam maior atividade contra o imipenem do que contra o meropenem, GIM-1 apresenta perfil cinético semelhante contra ambos carbapenêmicos (CASTANHEIRA 2004).

Na classe D de Ambler, cinco oxacilinases que conferem resistência a carbapenêmicos foram identificadas. Essas enzimas foram isoladas a partir de isolados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes partes do mundo (NORDMANN 2002). OXA-23, identificada na Escócia, e OXA-27, identificada em Singapura, apresentam 99% de homologia na seqüência de aminoácidos, porém possuem apenas 60% de homologia com um segundo grupo de oxacilinases, que são OXA-24 e OXA-25, isoladas na Espanha, e OXA-26 isolada na Bélgica (NORDMANN 2002). Os seus perfis de hidrólise são muito similares, degradando imipenem e meropenem fracamente, e não hidrolizando cefalosporinas de espectro estendido e aztreonam (NORDMANN 2002).

3.4.2 Metallo-beta-lactamases – importância

Embora existam 3 classes de carbapenemases, as MBL se incluem apenas na classe B de Ambler. Estas metaloenzimas aparentam ter maior importância que as outras carbapenemases visto que elas estão aumentando sua prevalência e que amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBL normalmente estão envolvidas em infecções de risco a vida como pneumonias e septicemia. Como as MBL normalmente tem maior atividade contra os carbapenêmicos do que as outras carbapenemases, o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* produtora de MBL com carbapenêmicos é ineficaz. Além disso, devido ao fato que a detecção de MBL pode não ser feita de maneira clara no laboratório de rotina, e que os genes destas enzimas podem se localizar em elementos genéticos móveis (plasmídios e transposons), a disseminação deste mecanismo de resistência (inclusive para outros microrganismos) tende a aumentar.

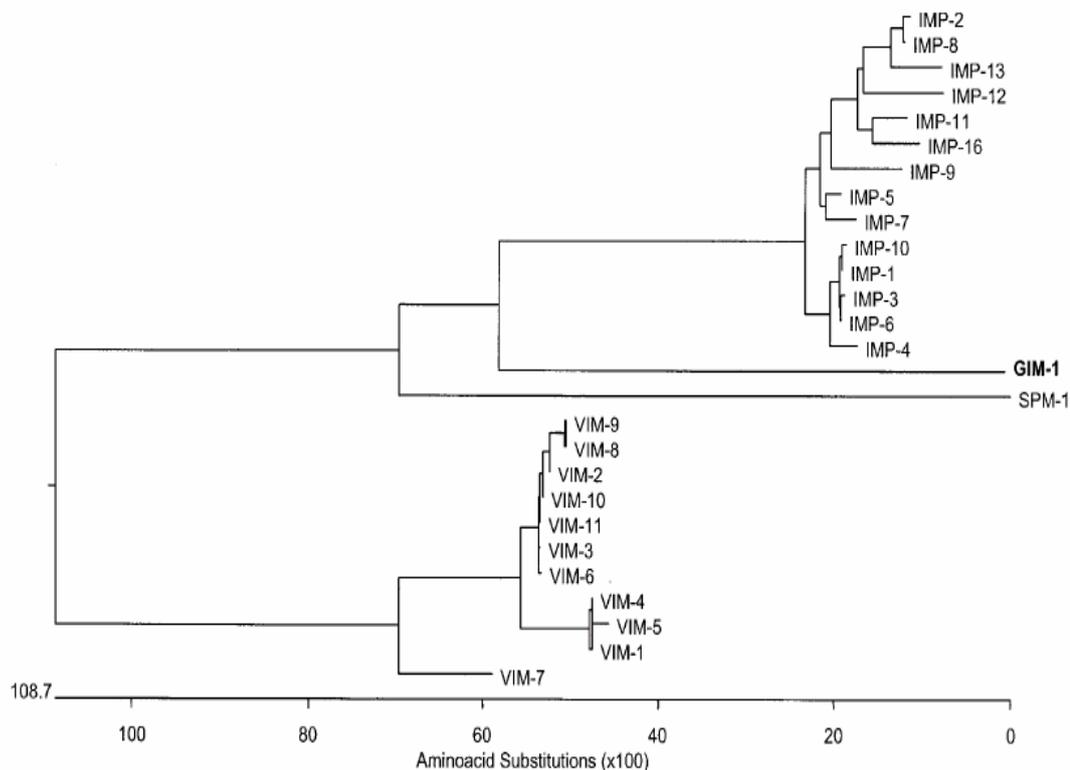


Figura 2: Similaridade molecular entre as famílias de MBL

3.4.3 Métodos de Detecção

A rápida identificação de isolados produtores de MBL é fundamental para que sejam adotadas medidas visando a impedir a disseminação desses isolados. Dessa forma, o desenvolvimento de uma metodologia simples e barata para triagem dos isolados resistentes torna-se necessária (ARAKAWA 2000). Partindo do princípio de que as metalo-β-lactamases são inibidas por quelantes de íons, por exemplo EDTA e Ácido 2-Mercaptopropiônico (2-MPA), o método de aproximação de discos proposto por Arakawa e colaboradores (2000) consiste em verificar a ação inibidora de agente quelante (ácido 2-mercaptopropiônico) sobre a enzima, permitindo ação do substrato (ceftazidime ou imipenem), sobre a bactéria. O aparecimento de região de inibição entre o disco de ceftazidime e o disco de 2-MPA é considerado indicativo de produção de MBL (ARAKAWA 2000).

Embora o teste fenotípico de triagem para MBL seja relativamente prático, ele não permite definir especificamente qual a MBL envolvida no processo de resistência. O desenvolvimento de uma técnica molecular para a detecção de genes responsáveis pela produção de MBL utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem tomado destaque em diversas publicações (SENDA 1996; JONES 1997; GIBB 2002; GALES 2003; SADER 2005 a ; SADER 2005 b). Essa metodologia consiste no desenho de iniciadores (*primers*) que são seqüências de oligonucleotídeos que hibridizam em regiões específicas do DNA molde as quais são amplificadas pela enzima Taq polimerase gerando um produto (*amplicon*) que é visualizado em gel de agarose que sofreu eletroforese. A técnica de PCR permite a detecção de genes específicos (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}) responsáveis pela produção das MBL.

3.4.4 Epidemiologia das metalo-β-lactamases

A primeira descrição de MBL ocorreu no Japão em 1991 sendo que a presença de gene *bla*_{IMP} em *integron* bacteriano e o intensivo uso de carbapenêmicos aparentemente contribuíram para a disseminação desse elemento de resistência naquele país (NORDMANN 2002). Senda e colaboradores (1996) utilizaram a reação de PCR para a detecção do gene de metalo-β-lactamase, *bla*_{IMP}, em 54 amostras de bactérias Gram-negativas com altíssima resistência a ceftazidime (CIM > 128µg/mL) isoladas no Japão. Dessas, 22 amostras tiveram resultado positivo sendo que os microorganismos portadores do gene *bla*_{IMP} eram *P. aeruginosa*, *S. marcesens*, *A. xylosoxidans*, *P. putida* e *K. pneumoniae*. Jones e colaboradores (1997) procuraram detectar através da reação de PCR a presença de gene *bla*_{IMP} em 28 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de hemoculturas de 50 centros médicos dos EUA, .mas todas as amostras tiveram resultado negativo. Novas MBL foram sendo descobertas: IMP-2 foi detectada num isolado de *A. baumannii* isolado na Itália em 1997 (NORDMANN 2002). IMP-3 foi identificada num isolado de *Shigella flexneri* oriundo do Japão em 1998 (NORDMANN 2002). Entre os anos 2000 e 2001, diferentes MBL pertencentes à família IMP foram identificados em

isolados clínicos de aeróbios Gram-negativos em diferentes regiões do mundo (NORDMANN 2002).

A primeira descrição de uma MBL diferente da família IMP ocorreu em 1999 com um isolado de *P. aeruginosa* proveniente de Verona, Itália, que produziu uma enzima denominada VIM-1 (LAURETTI 1999). Em 2000, foi descrita a caracterização de VIM-2 a partir de um isolado de *P. aeruginosa* originário de Marselha, França (POIREL 2000). Recentemente, VIM-3 foi identificada num isolado de *P. aeruginosa* proveniente de Taiwan (NORDMANN 2002). A identificação de enzimas da família VIM fora de países Europeus intensificou a idéia de uma disseminação global de carbapenemases das famílias IMP e VIM (NORDMANN 2002)

Uma terceira família de MBL foi descrita no Brasil por Gales e colaboradores (2003) analisando 43 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a imipenem provenientes de cinco estados brasileiros. Em 15 isolados identificados como produtores de MBL pelo teste de aproximação de disco foi identificado o gene *bla_{SPM-1}* da mesma forma que se caracterizou um surto clonal por estes isolados clínicos.

Finalmente, uma quarta família de MBL foi descrita muito recentemente por Castanheira e colaboradores (2004). Em 5 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de diferentes pacientes internados na mesma unidade de um hospital em Düsseldorf, Alemanha, o gene *bla_{GIM-1}* foi identificado. A análise de macrorrestrrição do DNA com enzima *Spe I* seguida por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) demonstrou serem os isolados clones. (CASTANHEIRA 2004).

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase

A aplicação de métodos de amplificação dos ácidos nucléicos permite a geração de milhões de cópias de uma seqüência de interesse de DNA ou RNA. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método enzimático para amplificação exponencial de um fragmento específico de DNA. A amplificação é realizada com uma DNA polimerase termoestável, dois oligonucleotídeos sintéticos denominados iniciadores (*primers*) e quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato que são incorporados no DNA gerado. Cada amplificação de DNA é subdividida dentro de três passos que são repetidos em

ciclos: o aquecimento, para separação da fita dupla de DNA molde; o anelamento (hibridização) dos dois *primers* às seqüências correspondentes no DNA molde; a extensão dos *primers* pela polimerase adicionando nucleotídeos para produção de cópia da fita de DNA molde. Os *primers* são oligonucleotídeos sintéticos compostos por 20-30 nucleotídeos sendo desenhados a partir da seqüência de DNA molde contida em bancos de dados. Cada par de *primers* deve ser específico para sua seqüência de ligação, uma vez que se um ou ambos os *primers* falharem ao hibridizar, não ocorrerá amplificação específica dos produtos. O aprimoramento dos reativos (Taq polimerase, *primers*) e equipamentos (termocicladores) envolvidos na técnica de PCR colaboraram para tornar comum o uso dessa técnica para detectar genes de resistência em microorganismos. Seu uso na detecção dos genes *vanA*, *vanB* e *vanC* em *Enterococcus* sp. resistente a vancomicina (ERV) bem como do gene *mec* em isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MARSA) são exemplos clássicos dos primeiros determinantes de resistência que foram pesquisados através da técnica de PCR. Em se tratando de resistência a carbapenêmicos, diferentes trabalhos descrevem a detecção dos genes envolvidos (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}) através da técnica de PCR (SENDA 1996; JONES 1997; GALES 2003; SADER 2005 a ; SADER 2005 b).

4- Materiais e Métodos

4.1 Materiais e Equipamentos

4.1.1 Materiais

- Iniciadores *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1} (Invitrogen®, São Paulo, Brasil)
- Didesoxinucleotídeos (Amersham Biosciences®, Buckinghamshire, Reino Unido)
- Marcador de Peso Molecular 100bp DNA Ladder (Invitrogen®, EUA)
- Enzima *Taq* Dna Polimerase (Invitrogen®, São Paulo, Brasil)
- Placas Ágar Mconkey (Oxoid®, Brasil)
- Pipeta Transferpette® (Brand®, Wertheim, Alemanha)
- Agarose em pó (Sigma®, St. Louis, USA)
- Ponteiras Axygen (USA)
- Microtubo para PCR 0,2mL (Labcon®, San Rafael, USA)
- Brometo de Etídio 10mg/mL (Sigma®, USA)
- Ácido 2-mercaptopropiônico em pó (Sigma Chemical Co., USA).
- Discos de Ceftazidima (Oxoid®)
- Discos de papel filtro (Laborclin, Brasil)

4.1.2 Aparelhos e Equipamentos

- Termociclador Mini Cyclor (MJ Research®, EUA)
- Cuba eletroforese EC 320 Mini Cell (Thermo EC®, Suécia)
- Microcentrífuga (Eppendorf®,EUA)
- Máquina fotográfica Polaroid (Kodak®, Reino Unido)
- Transluminador UV (Vilber Lourmat ®, França)
- Fonte eletroforese Modelo 250 (Gibco BRL ®, USA)
- Capela de fluxo laminar (Labconco®, Kansas City, USA)

- Vórtex (Biomatic, Porto Alegre, Brasil)

4.1.3 Cepas Bacterianas

- *P. aeruginosa* ATCC 27853 (controle negativo para MBL)
- *P. aeruginosa* 48 (controle positivo para SPM-1 e negativo para as demais MBL);
- *P. aeruginosa* 81 (controle positivo para VIM-2 e negativo para as demais MBL);
- *P. aeruginosa* 319 (controle positivo para IMP-1 e negativo para as demais MBL).

4.2 Métodos

4.2.1 Extração do DNA bacteriano

A partir de uma cultura pura semeada em placa de ágar Mconkey, 3 a 5 colônias foram raspadas com alça microbiológica descartável. Esse inóculo foi suspenso em um microtubo com 300µL de água destilada estéril, agitado num vórtex e aquecido a 65°C por 30 minutos. Após, o material foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi aspirado e armazenado em temperatura de 4°C.

4.2.2 Detecção fenotípica das metalo-β-lactamases:

A detecção fenotípica dos isolados produtores de MBL entre amostras clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem foi realizada através da técnica de aproximação do disco conforme preconizado por Arakawa e colaboradores (2000). Partindo-se de uma solução estoque de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) uma alíquota de 3µL era aplicada num disco de papel inerte, que estava a uma distância de 4 centímetros de um disco contendo ceftazidima. O aparecimento ou aumento de área de inibição entre o disco de ceftazidima e o disco com 2-MPA foi considerado indicativo de produção de MBL.

4.2.3 Detecção do gene *bla*_{SPM-1}:

A detecção do gene *bla*_{SPM-1} foi feita com o *primer* IMP-1 5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3' (direto) e o *primer* 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3' (reverso) e os reativos para a técnica de PCR foram preparados conforme abaixo:

Reagente	Concentração Estoque	Concentração Final	Volume (µL)
H2O	-	-	13,25
Tampão 10x			2,5
dNTP	10mM	0,2mM	0,5
MgCl2	15mM	1,5mM	0,75
Primer direto	100pmol/µL	50pmol/µL	2,5
Primer reverso	100pmol/µL	50pmol/µL	2,5
Taq Polimerase	5U/µL	2,5U	0,5
Amostra	-	-	2,5
Volume total	-	-	25

O produto da reação de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% o qual foi corado com brometo de etídio a 1% e o gel foi fotografado sob luz ultravioleta. Foi utilizado como controle positivo *P. aeruginosa* 48 portadora do respectivo gene e como controle negativo todos os demais isolados de *P. aeruginosa* descritos em 4.1.3. Os isolados de *P. aeruginosa* utilizados como controles positivo e negativos foram provenientes do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, LEMC, da Universidade Federal de São Paulo.

4.2.4 Detecção do gene *bla*_{VIM-2} :

A detecção do gene *bla*_{VIM-2} foi feita com o *primer* VIM-2 5'-ATGTTCAAACCTTTTGAGTAGTAAG-3' (direto) e o *primer* 5'-CTACTCAACGACTGAGCG-3' (reverso) e os reativos para a técnica de PCR foram preparados conforme abaixo:

Reagente	Concentração Estoque	Concentração Final	Volume (µL)
H2O	-	-	13,25
Tampão 10x			2,5
dNTP	10mM	0,2mM	0,5
MgCl ₂	15mM	1,5mM	0,75
Primer direto	100pmol/µL	50pmol/µL	2,5
Primer reverso	100pmol/µL	50pmol/µL	2,5
Taq Polimerase	5U/µL	2,5U	0,5
Amostra	-	-	2,5
Volume total	-	-	25

O produto da reação de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% o qual foi corado com brometo de etídio a 1% e gel foi fotografado sob luz ultravioleta. Foi utilizado como controle positivo *P. aeruginosa* 81 portadora do respectivo gene e como controle negativo todos os demais isolados de *P. aeruginosa* descritos em 4.1.3. Os isolados de *P. aeruginosa* utilizados são provenientes do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, LEMC, da Universidade Federal de São Paulo .

4.2.5 Detecção do gene *bla*_{IMP-1}:

A detecção do gene *bla*_{IMP-1} foi feita com o *primer* IMP-1 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC-3' (direto) e o *primer* 5'-GAACAACCAGTTTTGCCTTACC-3' (reverso) e os reativos para a técnica de PCR foram preparados conforme abaixo:

Reagente	Concentração Estoque	Concentração Final	Volume (µL)
H ₂ O	-	-	13,25
Tampão 10x			2,5
dNTP	10mM	0,2mM	0,5
MgCl ₂	15mM	1,5mM	0,75
Primer direto	100pmol/µL	50pmol/µL	2,5
Primer reverso	100pmol/µL	50pmol/µL	2,5
Taq Polimerase	5U/µL	2,5U	0,5
Amostra	-	-	2,5
Volume total	-	-	25

O produto da reação de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% o qual foi corado com brometo de etídio a 1% e gel foi fotografado sob luz ultravioleta. Foi utilizado como controle positivo *P. aeruginosa* 319 portadora do respectivo gene e como controle negativo todos os demais isolados de *P. aeruginosa* descritos em 4.1.3. Os isolados de *P. aeruginosa* utilizados são provenientes do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, LEMC, da Universidade Federal de São Paulo .

5 - Resultados e Discussão

5.1 Padronização da técnica de PCR para detecção do gene *bla*_{SPM-1}:

Inicialmente, utilizou-se a solução-mãe descrita no item 4.2.4 com o seguinte programa no termociclador: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 40°C (anelamento), 1 minuto a 68°C (extensão) complementados por uma extensão final de 68°C por 5 minutos, conforme Gales e colaboradores (2003). Nas condições citadas, houve a presença da banda esperada de 650pb no controle positivo de SPM-1 (*P. aeruginosa* 48), mas também nos controles negativos (*P. aeruginosa* ATCC 27853, 319 e 81). Visando aumentar a especificidade da reação a temperatura de anelamento foi elevada para 45°C. Nessa condição, persistiu a banda de 650pb no controle positivo de SPM-1 bem como nos controles negativos. A temperatura de anelamento, então, foi elevada para 50°C tendo como resultado final a ocorrência da banda esperada de 650pb no controle positivo sem que houvesse qualquer banda nos demais controles negativos. Dessa forma, a reação foi considerada padronizada tendo como programa de uso no termociclador para detecção do gene *bla*_{SPM-1} desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 50°C (anelamento), 1 minuto a 68°C (extensão) complementados por uma extensão final de 68°C por 5 minutos.

5.2 Padronização da PCR para detecção do gene *bla*_{VIM-2}:

A partir do verificado em 5.1, houve aumento de 10°C na temperatura de anelamento do programa inicial para a detecção do gene *bla*_{VIM-2}: desnaturação inicial por 3 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 60°C (anelamento) 2 min a 72°C (extensão) complementados por uma extensão final de 7 min a 72°C. Com as condições

de ciclagem citadas, foi observada a presença da banda esperada de 800pb no controle positivo VIM-2 (*P. aeruginosa* 81), porém bandas de 800pb também foram visualizadas nos controles negativos (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* 48 e *P. aeruginosa* 319). A temperatura de anelamento foi elevada para 65°C e isso resultou em ausência de banda tanto no controle positivo quanto nos controles negativos. Portanto, foi necessária uma redução na temperatura de anelamento em escala inferior a 5°C. Com a temperatura de anelamento a 63°C manteve-se a mesma situação visualizada a 65°C. Assim, nova redução foi efetuada (novamente em 2°C – temperatura final de 61°C), e houve a presença da banda esperada no controle positivo VIM-2 de 800pb, porém surgiram duas bandas inespecíficas, uma de 500pb e outra de 1300pb. Em nenhum dos outros controles negativos testados (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* 48 e *P. aeruginosa* 319) foi verificada a ocorrência de qualquer tipo de banda. Visando à eliminação das duas bandas inespecíficas citadas, foi realizada curva de Mg^{2+} nas concentrações de 1,0mM, 2,0mM, 2,5mM, 3,0mM, 3,5mM e 4,0mM. Não ocorreu qualquer mudança quanto à ocorrência de bandas inespecíficas no controle positivo VIM-2 (*P. aeruginosa* 81). Então, foi realizada uma alteração na concentração dos *primers*, sendo usados na concentração de 10pmol e 25pmol. Da mesma maneira que a curva de Mg^{2+} , nenhuma alteração quanto à eliminação das bandas inespecíficas no controle positivo VIM-2 foi visualizada. A reação foi considerada padronizada, mesmo com a presença de duas bandas inespecíficas, sendo o programa a ser usado o seguinte: desnaturação inicial por 3 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 61°C (anelamento) 2 min a 72°C (extensão) complementados por uma extensão final de 7 min a 72°C.

5.3 Padronização da PCR para detecção do gene *bla*_{IMP-1}:

A partir do verificado em 5.1, foram utilizadas as seguintes condições iniciais para a detecção do gene IMP-1: desnaturação inicial por 2 min a 95°C seguido por mais uma desnaturação inicial de 2 min a 94°C seguidos por 33 ciclos de 1 min 94°C (desnaturação), 1 min a 65°C (anelamento) e 4 min a 72°C (extensão). Foi visualizada apenas uma banda no controle positivo IMP-1 (*P. aeruginosa* 319) na altura de 580pb, correspondente ao esperado. Não foram visualizadas bandas nos controles

negativos (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* 48 e *P. aeruginosa* 81). Assim a reação foi considerada padronizada com as referidas condições de termociclagem.

5.4 Avaliação dos resultados da técnica de PCR com amostras clínicas de *P. aeruginosa*:

Foram analisadas um total de 48 amostras clínicas de *P. aeruginosa* não sensíveis ao imipenem (45 amostras) e/ou resistentes a ceftazidima (3 amostras). Essas amostras foram mantidas a -80°C e obtidas aleatoriamente de um banco de amostras durante os anos de 2003-2004 (2 amostras do HCPA, 10 amostras do HSL e 30 amostras da ISCMPA) e durante os anos de 1998-1999 (3 amostras do HSL e 3 amostras da ISCMPA). De uma forma geral, a maioria das amostras clínicas de *P. aeruginosa* apresentou resultado não ambíguo na técnica de PCR para pesquisa do gene *bla*_{SPM-1}, ou seja, os resultados positivos apresentaram apenas uma banda estimada de 650pb e os negativos não apresentaram bandas nesta posição (figura 3). Eventualmente, foram observadas bandas inespecíficas em algumas amostras de *P. aeruginosa* as quais não prejudicaram a interpretação dos resultados (figuras 3, 4 e 5).

A pesquisa do gene *bla*_{IMP-1} por PCR em amostras clínicas de *P. aeruginosa* também indicou resultados não ambíguos na grande maioria dos casos, embora a grande maioria dos resultados desse gene tenha sido negativa (figura 6). Cabe ressaltar que, eventualmente, algumas amostras clínicas pesquisadas para o gene *bla*_{IMP-1} apresentaram bandas estimadas em 580pb, mas muito tênues. Com o intuito de confirmar ou descartar a presença visual dessas bandas, a técnica de PCR era repetida utilizando-se uma temperatura de anelamento mais baixa (60°C). Assim, duas amostras apresentaram uma banda estimada em 580pb com suficiente intensidade. Como exemplo, indica-se a amostra 53 (coluna 8 da figura 6 e coluna 6 da figura 7).

As condições da reação para pesquisa do gene *bla*_{VIM-2} foram padronizadas, embora a presença da banda esperada (800 pb) tenha sido, sistematicamente, tênue no controle positivo (*P. aeruginosa* 81). Além disso, diversas bandas inespecíficas, tanto no controle positivo quanto nas amostras

clínicas, foram visualizadas. Como nenhuma destas bandas tinha o tamanho de 800 pb, não houve interferência na interpretação dos resultados (figura 8). Assim, concluímos que em nenhuma amostra clínica de *P.aeruginosa* foi detectado o gene *bla*_{VIM-2} .

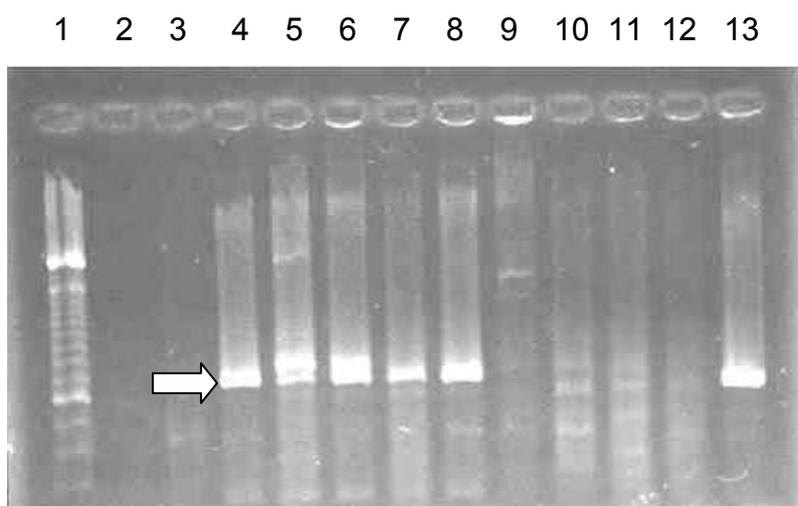


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para pesquisa do gene *bla*_{SPM-1} amostras clínicas de *P. aeruginosa*. Coluna 1: marcador de peso molecular de 100 pb; Coluna 2: controle negativo da reação (reativos da técnica de PCR sem amostra bacteriana); Coluna 3: controle negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853; Coluna 4: controle positivo *P. aeruginosa* 48; Colunas 4-8 e 13: amostras consideradas positivas para a pesquisa do gene *bla*_{SPM-1}. Colunas 9-12: amostras consideradas negativas para a pesquisa do gene *bla*_{SPM-1}. Amostras das colunas 9,10 e 11 com bandas inespecíficas. Seta indica banda de 650pb referente ao gene *bla*_{SPM-1}.

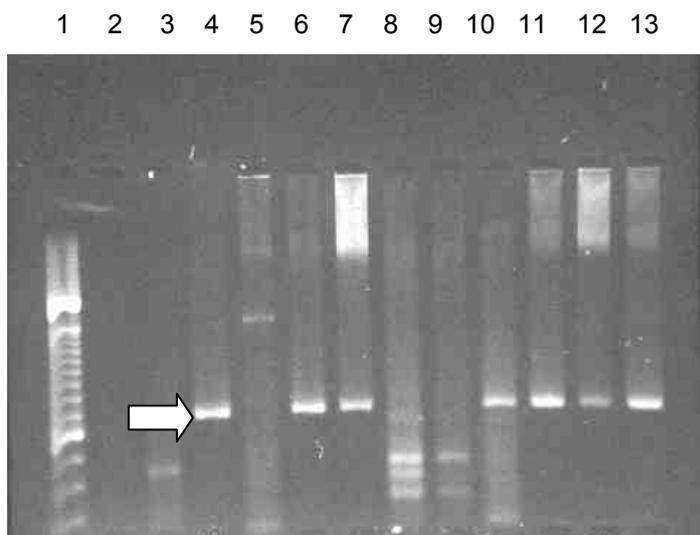


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para pesquisa do gene *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas de *P. aeruginosa*. Coluna 1: marcador de peso molecular de 100 pb; Coluna 2: controle negativo da reação (reativos da técnica de PCR sem amostra bacteriana); Coluna 3: controle negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853; Coluna 4: controle positivo *P. aeruginosa* 48; Colunas 6, 7 e 10-13: amostras consideradas positivas para a pesquisa do gene *bla*_{SPM-1}. Colunas 5, 8 e 9: amostras consideradas negativas para a pesquisa do gene *bla*_{SPM-1}. Amostras nas colunas 5, 8 e 9 com bandas inespecíficas. Seta indica banda de 650pb referente ao gene *bla*_{SPM-1}.

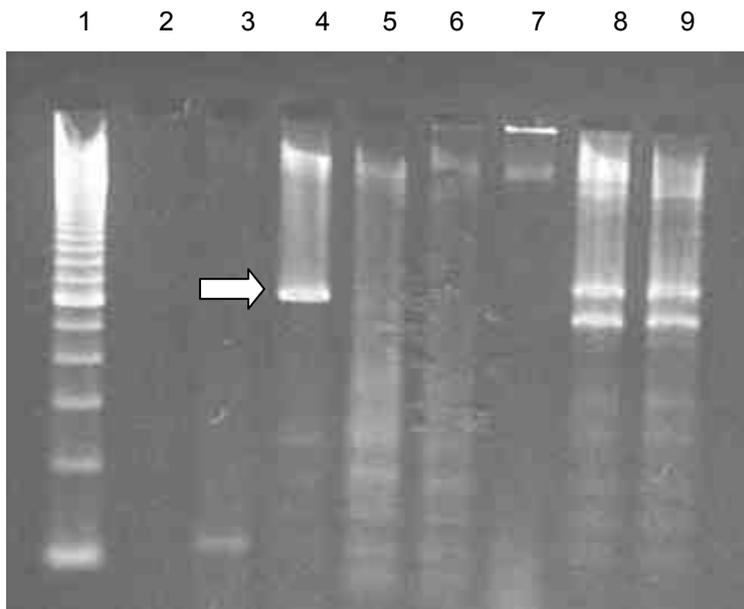


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para pesquisa do gene *bla*_{SPM-1} amostras clínicas de *P. aeruginosa*. Coluna 1: marcador de peso molecular de 100 pb; Coluna 2: controle negativo da reação (reativos da técnica de PCR sem amostra bacteriana); Coluna 3: controle negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853; Coluna 4: controle positivo *P. aeruginosa* 48; Colunas 5-9: amostras consideradas negativas para a pesquisa do gene *bla*_{SPM-1}. Amostras nas colunas 8 e 9 com bandas inespecíficas. Seta indica banda de 650pb referente ao gene *bla*_{SPM-1}.

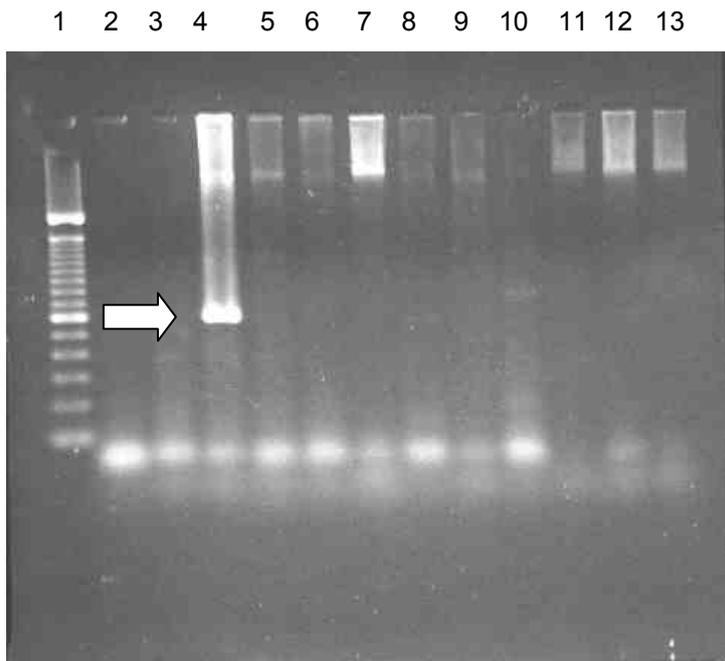


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para pesquisa do gene *bla*_{IMP-1} em amostras clínicas de *P. aeruginosa*. Coluna 1: marcador de peso molecular de 100 pb; Coluna 2: controle negativo da reação (reativos da técnica de PCR sem amostra bacteriana); Coluna 3: controle negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853; Coluna 4: controle positivo *P. aeruginosa* 319; Colunas 5 a 13: amostras consideradas negativas para a pesquisa do gene *bla*_{IMP-1}. Seta indica banda de 580pb referente ao gene *bla*_{IMP-1}.

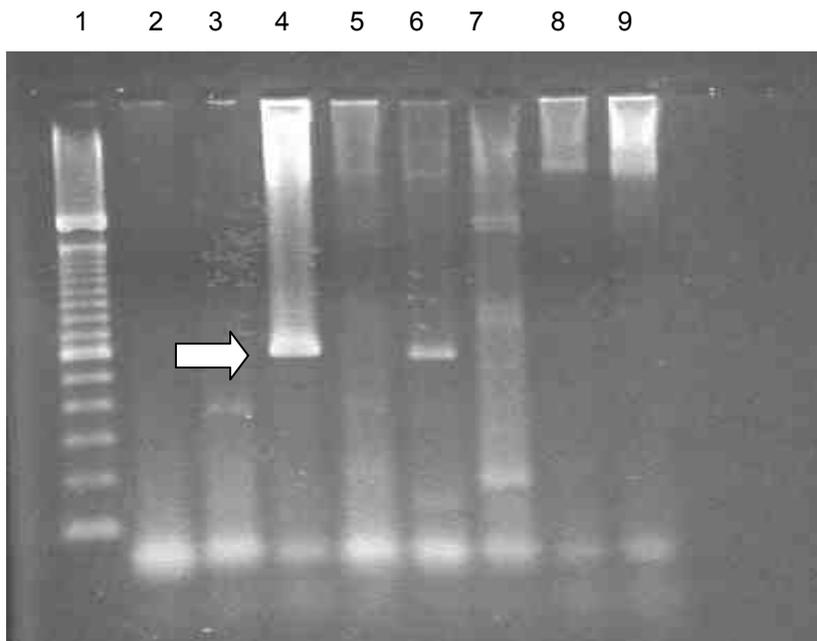


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para pesquisa do gene *bla*_{IMP-1} em amostras clínicas de *P. aeruginosa*. Coluna 1: marcador de peso molecular de 100 pb; Coluna 2: controle negativo da reação (reativos da técnica de PCR sem amostra bacteriana); Coluna 3: controle negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853; Coluna 4: controle positivo *P. aeruginosa* 319; Colunas 5 e 7-9: amostras consideradas negativas para a pesquisa do gene *bla*_{IMP-1}. Coluna 6: amostra considerada positiva para pesquisa do gene *bla*_{IMP-1}. Amostra na coluna 7 com banda inespecífica. Seta indica banda de 580pb referente ao gene *bla*_{IMP-1}.

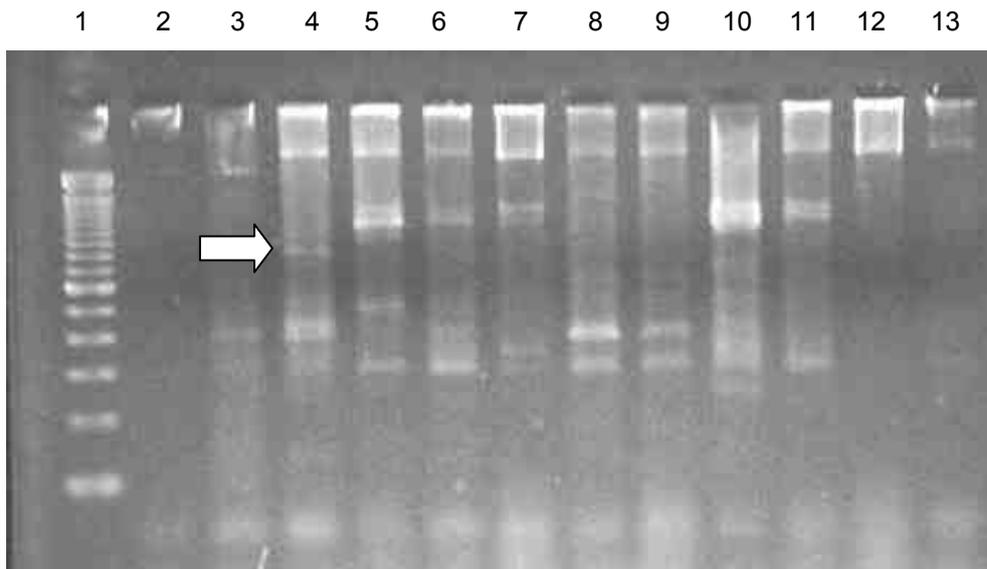


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para pesquisa do gene *bla_{VIM-2}* em amostras clínicas de *P. aeruginosa*. Coluna 1: marcador de peso molecular de 100 pb; Coluna 2: controle negativo da reação (reativos da técnica de PCR sem amostra bacteriana); Coluna 3: controle negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853; Coluna 4: controle positivo *P. aeruginosa* 81; Colunas 5 a 13: amostras consideradas negativas para a pesquisa do gene *bla_{VIM-2}*. Amostras nas colunas 5 a 11 com bandas inespecíficas. Seta indica banda de 800pb referente ao gene *bla_{VIM-2}*.

5.5 Comparação das técnicas fenotípicas com técnica molecular (PCR):

Os resultados da técnica de PCR para detecção dos genes de MBL (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}) foram comparados com os resultados da técnica fenotípica para a mesma população de 48 amostras clínicas de *P. aeruginosa*. No total, 11/48 amostras clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a CFZ e/ou IMP apresentaram resultado negativo no teste fenotípico sendo que nenhuma delas apresentou-se positiva na técnica de PCR para detecção dos genes de MBL (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}). No entanto, em 8/37 amostras clínicas de *P. aeruginosa* que apresentaram resultado positivo no teste fenotípico não foi detectado nenhum dos três genes de MBL pesquisados por PCR (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}) (tabela 1). Assim, considerando-se o teste fenotípico como padrão-ouro pode-se estabelecer que a pesquisa dos genes de MBL (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}) por PCR apresentou 100% de especificidade e 78,40% de sensibilidade (tabela 2). Isso indica que, provavelmente, entre as amostras clínicas de *P. aeruginosa* em nosso meio, a resistência a imipenem e/ou ceftazidima (a qual é inibida por agentes quelantes de metais = teste fenotípico positivo) pode ser devida a outros genes de metalo-β-lactamases. Sader e colaboradores (2005 b) relataram resultados semelhantes com dois isolados de *P. aeruginosa* os quais eram produtores de metalo-β-lactamase pelo teste fenotípico, mas não tiveram nenhum produto amplificado na reação de PCR para os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}. É importante destacar que tanto no trabalho citado quanto no presente estudo foram utilizados *primers* com a mesma seqüência.

Talvez a reação de PCR com *primers* gerais para genes de metalo-β-lactamase, que não são específicos para um gene, mas para uma família de genes e/ou a realização de Eletroforese de Focalização Isoelétrica (IFE), técnica que permite a separação de enzimas consistindo no procedimento usual quando da caracterização de novas metalo-β-lactamases (TOLEMAN 2002), venham a identificar qual MBL esses isolados produzem

Tabela 1: Resultados obtidos através das técnicas fenotípica e molecular em amostras clínicas de *P. aeruginosa*

Isolado	Origem	Perfil CFZ/IMP	Teste fenotípico	Teste molecular
2	HCPA	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
4-E	HCPA	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
101	HSL	CFZ (S) / IMP (R)	P	negativo
106	HSL	CFZ (S) / IMP (R)	P	negativo
636	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
1	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	N	negativo
2	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
3	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
4	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	N	negativo
5	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
6	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
7	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
8	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
9	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
10	HSL	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
15	CHSC	CFZ (S) / IMP (I)	P	negativo
39	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
37	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
38	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
39	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
40	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
42	CHSC	CFZ (S) / IMP (R)	N	negativo
45	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	IMP-1
50	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	N	negativo
58	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	negativo
60	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
63	CHSC	CFZ (R) / IMP (S)	N	negativo
46	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	negativo
47	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
51	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
53	CHSC	CFZ (R) / IMP (S)	P	IMP-1
54	CHSC	CFZ (R) / IMP (S)	P	negativo
76	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
77	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
83	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
86	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
71	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
78	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
82	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
87	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	SPM-1
56	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	negativo
64	CHSC	CFZ (I) / IMP (R)	N	negativo
65	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	N	negativo
66	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	N	negativo
68	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	N	negativo
69	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	N	negativo
70	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	N	negativo
221	CHSC	CFZ (R) / IMP (R)	P	negativo

Tabela 2: Comparativo entre os resultados obtidos entre as técnicas fenotípicas e molecular em amostras clínicas de *P. aeruginosa*

Fenotípico	PCR	
	Positivo	Negativo
Positivo	29	8
Negativo	0	11

5.6 Prevalência dos genes de MBL entre amostras clínicas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos:

A prevalência de MBL determinada pela técnica fenotípica entre amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem foi de 77,08% (37/48 amostras). No entanto, considerando-se a pesquisa de genes de MBL (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}) apenas 28 amostras foram positivas entre as 44 amostras resistentes ao imipenem num percentual de 63,6% (tabela 1). Entre os três genes de MBL pesquisados, *bla*_{SPM-1} foi o mais prevalente sendo encontrada em 27/29 (93%) seguida por IMP-1 em 2/29 (7%) sendo que o gene *bla*_{VIM-2} não foi detectado. No entanto, a prevalência do gene *bla*_{SPM-1} entre todas as amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem foi de 61,4% (27/44) (tabela 1). No Brasil, o fato da existência de uma metalo-β-lactamase, SPM-1, cuja disseminação clonal já foi verificada (GALES 2003) é motivo de preocupação. No Rio Grande do Sul, especificamente Porto Alegre, nenhum trabalho até o momento descreveu a presença de genes de resistência a carbapenêmicos em *P. aeruginosa*. Os índices encontrados são preocupantes em vista do que foi descrito por Sader e colaboradores (2005 a), que descreveu 21 isolados produtores de MBL com PCR positivo para o gene *bla*_{SPM-1} no período de 2001-2003, sendo 19 isolados provenientes de São Paulo e 2 isolados originários de Brasília. Assim, a presença de metalo-β-lactamases num único hospital (ISCOMPA) indicou 16 isolados com o gene *bla*_{SPM-1} (69,60%) superior ao publicado por Sader e colaboradores (2005 b), que durante 2000-2001 coletou 82 *P. aeruginosa* resistentes a imipenem no Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina sendo apenas 36 (43,90%) definidas como produtoras de MBL. Dessas, 20 amostras (55,60%) foram caracterizados por

PCR como possuidores do gene *bla*_{SPM-1} e três (8,3%) apresentando o gene *bla*_{IMP-1}.

6 - Conclusões

- Foi estabelecida a padronização da Reação em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{IMP-1}, sendo que para os genes *bla*_{IMP-1} e *bla*_{SPM-1} a técnica apresentou resultados mais claros com relação à presença de bandas inespecíficas enquanto que para a detecção do gene *bla*_{VIM-2} não foi possível a obtenção de resultados muito nítidos, considerando também a ocorrência de bandas inespecíficas.
- Foi possível comparar a técnica de PCR com a técnica fenotípica, sendo que a metodologia molecular apresentou 100% de especificidade e 78,40% de sensibilidade
- O gene de MBL mais prevalente foi *bla*_{SPM-1} encontrado em 27/29 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem. O gene *bla*_{IMP-1} foi detectado em apenas 2/29 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem. O gene *bla*_{VIM-2} não foi detectado nas amostras de *P.aeruginosa* analisadas neste estudo.

7 - Referências Bibliográficas

ARAKAWA, Y; SHIBATA, N; SHIBAIAMA, K; KUROKAWA, H; YAGI, T; FUJIWARA, H; MASAFUMI, G. Convention test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol**; 38:40-43, 2000.

BARTH, AL; PITT, TL. Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with Cystic Fibrosis. 1995, **J Clin Microbiol**; 33 (1):37-40.

CASTANHEIRA, M; TOLEMAN, MA; JONES, RN; SCHMIDT, FJ; WALSH, TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother** 48(12):4654-61, 2004.

FREITAS, ALP; BARTH, AL; Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **Br J Inf Dis**; 6(1):1-7, 2002.

GALES, AC; MENEZES, LC; SILBERT, S; SADER, HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **J Antimicrob Chemother**; 52: 699-702, 2003.

GIBB, AP; TRIBUDDHARAT, C; MOORE, RA; LOUIE, TJ; KRULICKI, W; LIVERMORE, DM; PALEPOU, MFI; WOODFORD, N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. **J Clin Microbiol**; 46(1):255-258, 2002.

JONES, RN; PFALLER, MA; MARSHALL, SA; HOLLIS, RJ; WILKE, WW. Antimicrobial activity of 12 broad-spectrum agents tested against 270 nosocomial blood stream infection isolates caused by non-enteric gram-negative bacilli: occurrence of resistance, molecular epidemiology and screening for metallo-enzymes. **Diagn Microbiol Infect Dis**; 29:187-192, 1997.

KISKA, DL; GILLIGAN, PH. *Pseudomonas*. In: PR MURRAY, EJ BARON, MA PFALLER, FC TENOVER, RH YOLKEN, *Manual of Clinical Microbiology*. Seventh edition, Washington DC, ASM Press, 1999. Vol. 1, p. 516-526.

LAURETTI, L; RICCIO, ML; MAZZARIOL, A. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother** 43:1584-90, 1999.

LIVERMORE, DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J Antimicrob Chemother**, 47:247-250, 2001.

LOUREIRO, MM; QUADRA, MRR; ASENSI, MD. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97(3):387-394, 2002.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Pennsylvania, 1999.

NORDMANN, P. Mechanism of resistance to betalactam in *Pseudomonas aeruginosa*. **Ann Franca Anes Réanimat** 22:527-30, 2003.

PITT, TL; BARTH, AL. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important Pseudomonads. In: A.M., EMMERSON; P.M., HAWKEY; S.H., GILLESPIE. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. First edition. London, Scientific Books, 1997, p. 493-517.

POIREL, L; NAAS, T; NICOLAS, D; COLLET, L; BELLAIS, S; CAVALLO, JD; NORDMANN, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid and integron borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrob Agents Chemother** 44:891-7, 2000.

QUINTILIANI, R; SAHM, DF; COURVALIN, P. Mechanisms of resistance to Antimicrobial Agents, In: PR MURRAY, EJ BARON, MA PFALLER, FC TENOVER, RH YOLKEN, *Manual of Clinical Microbiology*, Sétima edição, Washington, DC: ed. American Society for Microbiology. 1999, p. 1505-1525.

SADER, HS; CATANHEIRA, M; MENDES, RE; TOLEMAN, M; WALSH, TR; JONES, RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance program. **Intern J Antimicrob Agents** 25:57-61, 2005 a.

SADER, HS; GALES, AC. Emerging Strategies in Infectious Diseases: New Carbapenem and Trinem Antibacterial Agents. **Drugs**; 61(5):553-564, 2001.

SADER, HS; REIS, AO; SILBERT, S; GALES, AC. IMPS, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbiol Infect** 11(1):73-6, 2005 b.

SENDA, K; ARAKAWA, Y; ICHIYAMA, S; NAKASHIMA, K; ITO, H; OHSUKA, S; SHIMOKATA, K; KATO, N; OHTA, M. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla*_{IMP}) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. **J Clin Microbiol**; 34(12):2909-2913, 1996.

SILBERT, S; BARTH, AL; SADER, H. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian Cystic Fibrosis patients. **J Clin Microbiol**; 39(11):3976-3981, 2001.

TOLEMAN, MA; SIMM, AM; MURPHY, TA; GALES, AC; DIEDENBACH, DJ; JONES, RN; WALSH, TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report for the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother**; 50: 673-9, 2002.

TOWNER, KJ; COCKAYNE, A. 1993. Nucleic acid amplification and sequencing techniques p.93-112. *In*: Molecular Methods for microbial Identification and typing. Chapman e Hall, London

TSAKRIS, A; POURNARAS, S; WOODFORD, N; PALEPOU, MF; BABINI, GS; DUBOYAS, J; LIVERMORE, DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. **J Clin Microbiol**; 38(3):1290-1292, 2000.

TYSALL, L; STOCKDALE, MW; CHADWICK, PR; PALEPOU, MFI; TOWNER, KJ; LIVERMORE, DM; WOODFORD, N. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. **J Antimicrob Chemother**; 49:217-218, 2002.

8 – Biografia

Patrick Barcelos Gaspareto nasceu em Novo Hamburgo, RS, em 19/09/1977 sendo filho de Ivan Botega Gaspareto e Elusa Pereira Barcelos Gaspareto. Graduou-se Farmácia com ênfase em Análises Clínicas na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande de Sul (PUCRS) em dezembro de 2002. Na PUCRS, realizou sua iniciação científica no Laboratório de Pesquisa em Biofísica da Faculdade de Biociências sob orientação do Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira. Publicou os seguintes artigos:

NUNES, FB; GASPARETO, PB; SANTOS, RCV; ASSIS, M; GRAZIOTTIN, CM; BIOLCHI, V; ALVES, JCF; LUNARDELLI, A; ÁVILA, L; PIRES, MGS; WACHTER, PH; OLIVEIRA, JR. Intravenous toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in rats. *Toxicology Letters*, Irlanda, v. 143, p. 73-81, 2003.

MARCHESAN, A; AZAMBUJA, AA; GASPARETO, PB; ASSIS, M; PIRES, MGS; OLIVEIRA, JR. O antígeno prostático específico e sua importância na decisão clínica no câncer de próstata. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p. 221-224, 2002.

ASSIS, M; BORGES, FP.; SANTOS, RCV; LUNARDELLI, A; GASPARETO, PB; GRAZIOTTIN, CM; MICHEL, R; TASCIA, T; DE CARLI, GA. Prevalência de enteroparasitos em moradores de vilas periféricas de Porto Alegre, RS. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.35, n. 4, p. 215-217, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)