

FERNANDA MARQUES CASTRUCCI

Relação Ancestral do Clone Endêmico de *Pseudomonas aeruginosa*
produtor de SPM-1: Análise Comparativa entre Eletroforese em
Campo Pulsátil e Tipagem por Seqüenciamento de Múltiplos *Loci*

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDA MARQUES CASTRUCCI

Relação Ancestral do Clone Endêmico de *Pseudomonas aeruginosa*
produtor de SPM-1: Análise Comparativa entre Eletroforese em
Campo Pulsátil e Tipagem por Seqüenciamento de Múltiplos *Loci*

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Gales
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Co-orientadora: Dra. Suzane Silbert
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro
fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP). Processo nº
2005/57496-1).

São Paulo

2008

CASTRUCCI, Fernanda Marques

Relação Ancestral do Clone Endêmico de *Pseudomonas aeruginosa* produtor de SPM-1: Análise Comparativa entre Eletroforese em Campo Pulsátil e Tipagem por Seqüenciamento de Múltiplos *Loci*. Fernanda Marques Castrucci - São Paulo, 2008. xix, 138f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Título em inglês: Ancestral relationship of endemic clone of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1: Comparative analysis among Pulsed field gel electrophoresis and Multilocus sequence typing.

Key-words: 1. *Pseudomonas aeruginosa* 2. Tipagem Molecular 3. PFGE 4.MLST

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do curso de Pós-graduação:

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

São Paulo

2008

FERNANDA MARQUES CASTRUCCI

Relação Ancestral do Clone Endêmico de *Pseudomonas aeruginosa*
produtor de SPM-1: Análise Comparativa entre Eletroforese em
Campo Pulsátil e Tipagem por Seqüenciamento de Múltiplos *Loci*

BANCA EXAMINADORA:

Titular: Prof^ª. Dr^ª Luci Corrêa

Titular: Prof^ª Dr^ª Beatriz Meurer Moreira

Titular: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Suplente: Prof^ª. Dr^ª. Libera Maria Dalla Costa

Aprovada em: ___/___/___

*“Há mais dos meus pais em mim do
que eu supunha...”*

(anônimo)

Ao meu pai **Antonio**,
que abriu mãos de suas realizações
pessoais para proporcionar as nossas ...

Dedico

Também...

À minha mãe **Shirley**, exemplo de dedicação e amor incondicional...

À minha avó **Romilda**, que admiro e tanto amo...

Aos meus irmãos **Simone** e **Bruno**, por saber que sempre teremos uns aos outros...

Ao meu marido **Luiz**, por participar dos meus sonhos, proporcioná-los e ser tão companheiro...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Dr^a Suzane Silbert por abrir as portas do LEMC e do Setor de Tipagem Molecular, por aceitar a co-orientação e por todos os ensinamentos e amizade.

Agradeço à Dr^a Ana Cristina Gales por aceitar orientar-me e por todos os ensinamentos, e ser um exemplo de sabedoria e profissionalismo.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari, por todos os ensinamentos e por ser um exemplo a seguir.

Agradeço à Miriam do Carmo, Adriana Nicoletti e à Raquel Girardelo pela ajuda técnica e grande amizade.

Agradeço à Jussima Monteiro e Andréa Pereira por terem sido tão maravilhosas!

Agradeço aos alunos de iniciação científica Vinícius Sales e Bruna Teixeira, e à mestranda Paula Ignez por toda ajuda no setor de Tipagem Molecular.

Agradeço a Fernanda Inoue e ao Rodrigo Cayô por toda amizade, ombro amigo, companheirismo e força. A contribuição que vocês deram foi inestimável! Devo muito à vocês!

Agradeço ao secretário da Disciplina de Infectologia Charlys por ter sido tão prestativo, eficiente e amigo. E a secretária do Laboratório Rosana Capecce pelo coleguismo e ajuda profissional.

Agradeço ao meu grande amigo Wagner Cid Parente por ter sido precursor e responsável por tudo isso.

Agradeço a todos os meus amigos e companheiros do LEMC/ALERTA por me fazer crer que o melhor do mestrado são as pessoas!!!

SUMÁRIO

| | |
|---|-------|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS | XIII |
| ÍNDICE DE TABELAS | XV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XVI |
| RESUMO..... | XVIII |
| 1 - JUSTIFICATIVA..... | 1 |
| 2 - REVISÃO DA LITERATURA | 4 |
| 2.1 – O microrganismo: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4 |
| 2.1.1 - Fatores de Virulência..... | 4 |
| 2.1.2 - Mecanismos de Resistência | 5 |
| 2.1.2.1 - Resistência Intrínseca..... | 6 |
| 2.1.2.2 - Resistência Adquirida | 7 |
| 2.1.2.2.1 - Diminuição de Permeabilidade da Membrana e Sistema de Efluxo..... | 7 |
| 2.1.2.2.2 - Produção de Enzimas..... | 8 |
| 2.1.2.2.3 - Resistência Conferida por Mutações | 11 |
| 2.1.3 - Resistência a Múltiplas Drogas..... | 11 |
| 2.2 - Epidemiologia e Importância Clínica das infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i> | 12 |
| 2.3 - Tipagem Molecular..... | 16 |
| 2.3.1 - Aplicação | 16 |
| 2.3.2 - Características..... | 19 |
| 2.3.3 - Eletroforese em Campo Pulsátil - <i>Pulsed Field Gel Electroforesis</i> - PFGE | 22 |
| 2.3.4 - Ribotipagem Automatizada..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 2.3.5 - Tipagem por seqüenciamento de Múltiplos <i>Loci</i> - <i>Multilocus Sequence Typing</i> - MLST | 29 |
| 2.4 - Dendrogramas..... | 33 |
| 2.5 - Métodos de Reconstrução Filogenética | 34 |
| 2.5.1 - Métodos Cladísticos..... | 37 |
| 2.5.1.1 - Método de Máxima Parcimônia..... | 37 |
| 2.5.2 - Métodos Probabilísticos..... | 37 |
| 2.5.2.1 - Método de Máxima Verossimilhança | 37 |
| 2.5.3 - Métodos Fenéticos..... | 38 |
| 2.5.3.1 - UPGMA - Método de Grupamento de Pares Não Ponderados Baseados na Média Aritmética (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” - UPGMA). | 38 |
| 2.5.3.2 - Método de Ligação Vizinha (<i>Neighbor-Joining Method</i> - NJ) ... | 39 |
| 2.5.3.3 - Modelo de Jukes-Cantor | 40 |
| 3 - OBJETIVOS | 41 |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS..... | 42 |
| 4.1 - Amostras Estudadas | 42 |
| 4.2 - Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos loci - MLST | 45 |
| 4.3 - Simplificação do protocolo de MLST descrito por Curran e colaboradores (2004)..... | 51 |
| 4.4 - Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado (PFGE)..... | 51 |
| 4.5 - Ribotipagem Automatizada | 54 |
| 4.6 - Criação de Dendrogramas | 54 |
| 4.7 - Cálculo do Poder Discriminatório e Reprodutibilidade | 55 |
| 4.8 - Criação de Árvores Filogenéticas..... | 56 |

| | |
|---|-----|
| 5 - RESULTADOS..... | 57 |
| 5.1 - MLST..... | 57 |
| 5.1.1 - Padronização da Metodologia Convencional..... | 57 |
| 5.1.2 - Padronização da Metodologia Modificada de MLST..... | 58 |
| 5.1.3 - Perfis Alélicos e STs Obtidos com a Técnica MLST..... | 59 |
| 5.2 - Ribotipagem automatizada – Consulta ao banco de dados do RiboPrinter® | 63 |
| 5.3 - PFGE | 71 |
| 5.4 - Análise Filogenética | 78 |
| 5.5 - Comparação dos resultados obtidos com as três técnicas de tipagem molecular utilizadas neste estudo. | 82 |
| 5.6 - Cálculo do poder discriminatório e reprodutibilidade..... | 86 |
| 6 - DISCUSSÃO | 87 |
| 7 - CONCLUSÕES | 99 |
| 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 100 |
| 9 - ANEXOS | 129 |
| 9.1 - Seqüências das STs encontradas neste estudo..... | 129 |
| 9.2 - Resumo deste trabalho aceito no 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC™) / 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America | 136 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
- CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
- CHEF - Eletroferese em campo elétrico homogêneo
- CVC - Cateter venoso central
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- ERIC-PCR - Reação em cadeia da polimerase de regiões repetitivas intragênicas de enterobactérias
- ES β L - β -Lactamase de Espectro Extendido
- FC - Fibrose cística
- FIGE - Eletroferese em campo elétrico invertido
- HSP - Hospital São Paulo
- IOP - Instituto de Oncologia Pediátrica
- IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
- LPS - Lipopolissacarídeo da parede celular
- MLEE - Eletroforese de enzimas de múltiplos *loci*
- MLST - Tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci*
- M β L - Metallo- β -Lactamase
- NNIS - *National Nosocomial Infection Surveillance System*
- pb - Pares de bases
- PBP - Proteínas ligadoras de penicilinas
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- PFGE - Eletroforese em campo pulsátil
- rRNA - RNA ribossomal

SPM-1 - São Paulo Metalo β Lactamase

ST - Tipo de seqüência

TGI - Trato gastro intestinal

TRI - Trato respiratório inferior

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

UPGMA - Grupamento de Pares Não Ponderados Baseados na Média

Aritmética

UTO - Unidade taxonômica operacional

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Relação das amostras selecionadas para o estudo..... | 42 |
| Tabela 2 - Descrição dos genes selecionados para tipagem de amostras de <i>P. aeruginosa</i> pela técnica MLST..... | 45 |
| Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes alvos..... | 47 |
| Tabela 4 - Descrição dos iniciadores utilizados para a reação de seqüenciamento. | 50 |
| Tabela 5 - Relação dos perfis alélicos e STs obtidos das amostras de <i>P. aeruginosa</i> com a técnica MLST realizada de acordo com o protocolo descrito por Curran e colaboradores (2004)..... | 60 |
| Tabela 6 -. Relação de amostras e seus respectivos ribogrupos..... | 67 |
| Tabela 7 -. Relação de padrões obtidos com a técnica PFGE das amostras de <i>P. aeruginosa</i> estudadas..... | 72 |
| Tabela 8 - Relação dos ribogrupos, perfis de PFGE e STs obtidos com as amostras de <i>P. aeruginosa</i> analisadas neste estudo..... | 85 |
| Tabela 9 - Poder discriminatório e reprodutibilidade das metodologias testadas para a tipagem molecular das amostras de <i>P. aeruginosa</i> | 87 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Árvore filogenética mostrando os grupamentos formados e a relação da SPM-1 com as outras MβLs..... | 10 |
| Figura 2 - Sistema de caracterização microbiana RiboPrinter® | 26 |
| Figura 3 - Fluxograma ilustrando como o RiboPrinter® caracteriza em ribogrupo o padrão gerado..... | 27 |
| Figura 4 - Fluxograma mostrando como o RiboPrinter® identifica em gênero e espécie o padrão gerado..... | 28 |
| Figura 5 - Matriz de entrada de dados e respectiva árvore filogenética..... | 36 |
| Figura 6 - Amplificação dos sete genes utilizados na técnica MLST..... | 57 |
| Figura 7 - Amplificação dos sete genes utilizados na técnica MLST realizada utilizando os iniciadores descritos para o seqüenciamento..... | 58 |
| Figura 8 - Relatório do RiboPrinter® para amostras que apresentam ribogrupo igual ao 72-3..... | 65 |
| Figura 9 - Relatório do RiboPrinter® para os outros ribogrupos das amostras estudadas | 66 |
| Figura 10 - Dendrograma das amostras estudadas, analisando o perfil de ribotipagem gerado por PvuII..... | 71 |
| Figura 11 - Perfis de restrição com a enzima SpeI das amostras de <i>P. aeruginosa</i> avaliadas neste estudo pela técnica de PFGE..... | 76 |

| | |
|--|----|
| Figura 12 - Dendrograma dos perfis obtidos das amostras de <i>P. aeruginosa</i> avaliadas pela técnica PFGE..... | 78 |
| Figura 13 - Relação filogenética entre amostras deste estudo e amostras com possível relação genética pertencentes ao banco de dados do MLST..... | 80 |
| Figura 14 - Árvore evolucionária com as STs encontradas neste estudo e com representantes de diversas partes do mundo..... | 82 |
| Figura 15 - Perfil de ribotipagem automatizada das amostras que apresentaram resultados discordantes entre esta técnica e PFGE..... | 87 |

RESUMO

Introdução: No Brasil, a disseminação de um clone endêmico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1, uma metalo- β -lactamase (M β L) codificada por um plasmídeo, tem sido freqüentemente reportada. Recentemente, uma alta variedade genômica foi observada entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1. Assim, os principais objetivos deste trabalho foram realizar a implantação da metodologia MLST para tipagem molecular destes microrganismos em nosso laboratório e dessa forma caracterizar a evolução filogenética do clone de *P. aeruginosa* produtor da M β L SPM-1; comparar o poder discriminatório e a reprodutibilidade desta técnica com as técnicas de PFGE e ribotipagem automatizada para tipagem molecular de *P. aeruginosa* e avaliar a capacidade do MLST de discriminar amostras que foram classificadas sob ribogrupos distintos, mas com padrões de PFGE idênticos. Métodos: Um total de 50 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 foram coletadas de nove centros brasileiros. Três amostras de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 e duas amostras de *P. aeruginosa* não produtoras de M β L foram incluídas no estudo. A técnica de MLST foi padronizada conforme descrito por Curran *et al.* As seqüências obtidas foram comparadas com as existentes no banco de dados mundial de MLST para *P. aeruginosa* (www.pubmlst.org/paeruginosa) para que dessa forma fosse determinado o perfil alélico e, subseqüentemente, o tipo de seqüência (ST). Para a análise filogenética foi utilizado o método de Jukes-Cantor e Neighbor-Joining. Um total de cinco STs foram identificadas entre as 55 amostras de *P. aeruginosa* estudadas. Todos os isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 apresentaram perfil alélico idêntico e, dessa forma, receberam a mesma ST

(ST277), com exceção de uma amostra proveniente de Belo Horizonte, a qual recebeu a ST235. As três amostras de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 foram classificadas sob a mesma ST (ST593), enquanto que as amostras não produtoras de M β L apresentaram perfis alélicos ainda não existentes no banco de dados, e assim, duas novas STs foram criadas para estas amostras (ST594 e ST595). O clone endêmico brasileiro de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 (ST277) mostrou perfil alélico idêntico ao de uma cepa isolada na Áustria (ID 275), em setembro de 2006. Variação em um único locus da ST277 foi encontrada em uma amostra proveniente da Áustria (ID279), isolada em janeiro 2007. Similaridade entre cinco dos sete alelos foi encontrada entre as amostras deste estudo pertencentes a ST277 e uma amostra isolada no Canadá (ID 148), em 1990. Conclusão: Nossos dados sugerem que as amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 descendem de um ancestral comum e que podem possuir relação ancestral com os isolados da Áustria e mais remotamente com a amostra do Canadá.

1 - JUSTIFICATIVA

Recentemente, uma nova MβL adquirida, cujo gene codificador é geralmente localizado em plasmídeo, foi descrita no Brasil e denominada SPM-1 (Toleman *et al.*, 2002; Castanheira, 2005). *P. aeruginosa* produtoras de MβL são responsáveis por diversos surtos hospitalares relatados de diversas partes do mundo. (Nordmann & Poirel, 2002), causando infecções graves como sepse e pneumonia. Infecções causadas por amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MβL estão associadas à maior taxa de mortalidade, principalmente, ligada ao início da terapia empírica inadequada (Laupland *et al.*, 2005; Marra *et al.*, 2006).

Isolados de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 não foram previamente descritas em outras regiões geográficas do mundo. Um estudo prévio realizado por Menezes e colaboradores em nosso laboratório mostrou a disseminação clonal deste patógeno por todo o território brasileiro (Menezes, 2005). A presença deste clone endêmico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 em hospitais com localização próxima poderia ser explicada pela transferência inter-hospitalar de pacientes ou pelo compartilhamento do quadro funcional dos profissionais da área da saúde. Entretanto, isto não justificaria facilmente a detecção deste clone em hospitais que distam milhares de quilômetros entre si no território brasileiro. A transferência inter-hospitalar de pacientes poderia ainda constituir uma justificativa.

Técnicas de tipagem molecular são normalmente utilizadas para a compreensão da dinâmica da disseminação de microrganismos patogênicos. A eletroforese em campo pulsátil (PFGE) é normalmente a técnica de escolha dentre as ferramentas de tipagem, mas os resultados obtidos com esta técnica

são difíceis de serem comparados, ficando restritos ao laboratório, onde foram realizados. Além disso, esta metodologia não é aplicada a estudos de longo prazo. Uma nova ferramenta para tipagem molecular foi desenvolvida por Maiden e colaboradores (1998), denominada tipagem por seqüenciamento de múltiplos *loci* (MLST). Esta técnica possibilita a comparação dos resultados via internet entre laboratórios e criação de um banco de dados mundial. Além disso, esta técnica oferece a possibilidade de analisar a filogenia das amostras testadas (Spratt, 1999).

Apesar da disponibilidade de diversas metodologias para tipagem molecular de patógenos nas instituições, existe a necessidade cada vez maior da comparação entre as informações obtidas em laboratórios de várias partes do mundo. Deste modo, a introdução da técnica de MLST para *P. aeruginosa* nos laboratórios que realizam tipagem molecular é de grande utilidade

Embora o clone endêmico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 tenha sido amplamente estudado utilizando as técnicas de tipagem molecular de PFGE e ribotipagem automatizada, resultados discordantes entre estas técnicas foram observadas. O presente estudo avaliou isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 por uma terceira técnica de tipagem, MLST, como uma tentativa de resolver os resultados discordantes entre as técnicas de PFGE e ribotipagem, e adicionalmente, realizar a comparação do MLST à estas duas técnicas de tipagem molecular.

Além disso, o MLST fornece resultados que ajudam a determinar a variabilidade genética entre isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1, e delinear a disseminação do clone endêmico deste microrganismo pelo território

nacional, e somado a isso, auxiliar na compreensão da relação ancestral, possibilitando a criação da árvore filogenética destes isolados.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – O microrganismo: *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um organismo metabolicamente versátil, capaz de crescer em meios de cultura compostos simplesmente de sais minerais, glicose e ágar. São bacilos Gram-negativos, aeróbios, não formadores de esporos, sem curvatura ou ligeiramente curvados, que medem 0.5 a 0.8 µm por 1.5 a 3.0 µm. Na coloração de Gram, apresentam-se como bacilos mais finos que as enterobactérias (Blondel-Hill, Henry & Speert, 2007). *P. aeruginosa* produz no mínimo quatro pigmentos distintos: piocianina (azul), pioverdina (amarelo-esverdeado), piorrubina (vermelho) e piomelanina (marrom para o preto) (Daly, Boshard & Matsen, 1984). Além da produção de pigmentos, *P. aeruginosa* produz um odor de frutas característico (Gillard, 1991).

2.1.1 - Fatores de Virulência

P. aeruginosa é considerada uma das espécie mais virulenta dentre os bacilos Gram-negativos não fermentadores, como resultado da produção de grande variedade de fatores de virulência celulares e extracelulares. Dentre os fatores de virulência celulares se destacam: a) *pilli*, que são apêndices superficiais que promovem aderência do microrganismo a receptores de gangliosídeo GM-1, presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro; b) flagelos, que também participam da aderência da bactéria ao hospedeiro e c) lipopolissacarídeo da parede celular, LPS, que é uma endotoxina responsável por alguns dos sinais e sintomas da sepse, resultante

da ativação e liberação de mediadores de vasodilatação (Bone, 1993; Pimenta, Di Martino & Blight, 2006).

Dos fatores de virulência extracelulares de *P. aeruginosa* que se destacam: a) produção de alginato, que é um polissacarídeo capsular que permite a aderência às superfícies epiteliais pulmonares, com a formação de grandes conglomerados bacterianos; b) produção de enzimas como, por exemplo, a elastase, que degrada as imunoglobulinas e os componentes do sistema complemento e a exoenzima S, que possui função de adesina, além de inibir a síntese protéica; c) leucocidina, substância que inibe a função de neutrófilos e linfócitos; d) piocianina, que impede o crescimento de outras bactérias e inibe a atividade ciliar da mucosa respiratória e e) exotoxina A, que promove destruição tecidual inibindo a síntese protéica (Pearson *et al.*, 2000; Sawa *et al.*, 1998). Além disso, este microrganismo possui a capacidade de formar biofilme, que protege a bactéria da ação dos antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro. Esta característica é mais freqüentemente observada em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com fibrose cística (FC) (Head & Yu, 2004).

2.1.2 - Mecanismos de Resistência

A resistência antimicrobiana, além de constituir um desafio clínico, é atualmente considerada um grande problema de saúde pública. As bactérias Gram-negativas, entre as quais se inclui a *P. aeruginosa*, dispõem de um arsenal de mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica. *P. aeruginosa* apresenta baixa sensibilidade a uma variedade de agentes antimicrobianos, como a maioria dos β -lactâmicos, às tetraciclina, ao

cloranfenicol e grande parte das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, como resultado de mecanismos de resistência natural e adquirido (Livermore & Woodford, 2006).

Dentre os principais mecanismos de resistência às drogas observados em *P. aeruginosa* estão: diminuição da permeabilidade de membrana externa às drogas; sistemas de efluxo ativo; mecanismos enzimáticos de resistência, como por exemplo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos e a produção de β -lactamases cromossomais e adquiridas; e modificações do sítio de ação dos antimicrobianos, como alterações nas PBPs resultando na diminuição da sensibilidade aos β -lactâmicos e modificações nas topoisomerasas observadas em cepas resistência às fluoquinolonas (Li *et al.*, 1994; Li, Nikaido & Poole, 1995).

2.1.2.1 - Resistência Intrínseca

P. aeruginosa apresenta dois principais mecanismos de resistência intrínseca: a) produção de β -lactamase cromossomal induzível do tipo AmpC, (Livermore & Woodford, 2006); e b) sistemas de efluxo ativo de drogas (Livermore, 2002).

A β -lactamase cromossomal AmpC desempenha um importante papel na resistência antimicrobiana em isolados clínicos de *P. aeruginosa* uma vez que sua expressão pode ser induzida na presença de alguns antimicrobianos β -lactâmicos diminuindo sua sensibilidade aos mesmos (Livermore & Woodford, 2006).

A ejeção ativa de compostos tóxicos por sistemas de efluxo é parte de um mecanismo complexo desenvolvido pela própria bactéria para se proteger

contra produtos adversos do ambiente em que vivem, aos quais incluem os antimicrobianos. A exclusão destes compostos conseqüentemente, compromete o tratamento das infecções causadas por *P. aeruginosa* (Lomovskaya & Bostian, 2006).

2.1.2.2 - Resistência Adquirida

2.1.2.2.1 - Diminuição de Permeabilidade da Membrana e Sistema de Efluxo

A membrana externa de bactérias Gram-negativas é formada por uma bicamada lipídica que apresenta baixa permeabilidade a solutos hidrofílicos, como diversos nutrientes e a alguns antimicrobianos. Tanto a entrada como a ejeção destes solutos ocorre através das porinas, que são canais protéticos de difusão inespecíficos presentes em todas as espécies de bactérias Gram-negativas (Chuanchuenm, Narasaki & Schweizer, 2002; Nikaido, 2003).

A principal porina expressa por *P. aeruginosa* é a OprF, que é uma porina inespecífica, utilizada por vários tipos de substratos; além da porina OprD, utilizada pelo imipenem para atravessar a membrana externa e acessar seu sítio de ação (Trias & Nikaido, 1990). Alterações nos genes que codificam essas porinas e/ou diminuição na sua expressão levam à redução da permeabilidade da membrana externa às drogas, resultando na redução do transporte de antimicrobianos para o interior da célula, acarretando na diminuição de sensibilidade às drogas como os aminoglicosídeos, além de alguns β -lactâmicos, aos carbapenêmicos, a colistina e às quinolonas (Aires *et al.*, 1999; MacLeod *et al.*, 2000).

Além das porinas, a hiperexpressão de sistemas de efluxo, exercem importante papel para a diminuição da concentração de antimicrobianos no interior da célula bacteriana, principalmente aqueles pertencentes a família RND de sistemas de efluxo, de ampla especificidade de substratos e que são codificados por genes cromossomais localizados em operons, cuja expressão é regulada pelo produto da codificação de genes reguladores. Eventuais mutações nos genes que regulam a expressão desses sistemas de efluxo levam à hiperexpressão desses sistemas acarretando na diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos (Nikaido, 1996; Poole *et al.*, 1996; Livermore, 2001).

O primeiro sistema de efluxo do tipo RND caracterizado nesse microrganismo foi o MexAB-OprM. Dos sistemas RND de efluxo caracterizados em *P. aeruginosa*, somente MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM têm sido relacionados, até o momento, à resistência intrínseca e adquirida a uma ampla variedade de drogas antimicrobianas de importância clínica. (Poole, 2001).

2.1.2.2.2 - Produção de Enzimas

A maioria das amostras de *P. aeruginosa* produz uma β -lactamase chamada de AmpC que é cromossômica e induzível (Livermore, 1991). Uma mutação no locus AmpD, provocada espontaneamente ou pelo uso de antimicrobianos pode resultar em total ou parcial desrepressão da enzima AmpC, o que corresponde a aproximadamente 30% da resistência por β -lactamases nestes microrganismos (Bratu *et al.*, 2007; Livermore, 1987; Moya *et al.*, 2008).

Dentre os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em *P. aeruginosa*, a produção de β -lactamases é o mecanismo mais freqüente e importante, mas, alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) também são descritas (Mesaros *et al.*, 2007; Giske *et al.*, 2008). As β -lactamases mais comuns em *P. aeruginosa* são denominadas PSE-I e PSE-4 (Livermore, 1997; Livermore, 2002). Algumas β -lactamases de espectro ampliado (ES β Ls) como a enzimas OXA também são freqüentemente encontradas (Poirel *et al.*, 2001; Weldhagen, Poirel & Nordmann, 2003; Jacoby & Munoz-Price, 2005). Com a exceção da ES β L GES-1 e das suas variantes com atividade anti-carbapenens, todas as carbapenemases produzidas por *P. aeruginosa* pertencem a Classe B de Ambler e são comumente denominadas de metalo-enzimas (Ambler, 1980).

As metalo- β -lactamases (M β Ls) são enzimas zinco dependente, sensíveis a agentes quelantes de íons divalentes, como o EDTA, e não inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Haruta *et al.*, 2000). As M β Ls apresentam substratos preferenciais diversos, incluindo cefalosporinas de amplo espectro e os carbapenêmicos. Aztreonam é estável à hidrólise. Estas enzimas estão associadas a altos níveis de resistência aos carbapenêmicos (Watanabe *et al.*, 1991; Osano *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1995; Arakawa *et al.*, 1995).

A primeira M β L, reportada, em 1991, foi da família IMP-1, cuja produção é geralmente mediada por um gene situado em um integron que encontra-se, por sua vez, inserido um plasmídeo (Osano *et al.*, 1994; Nordmann & Poirel, 2002; Poirel, Pitout & Nordmann, 2007) e a segunda da família VIM (Nordmann

& Poirel, 2002; Poirel, Pitout & Nordmann, 2007; Corvec *et al.*, 2008; Gupta, 2008).

Em 2002, uma nova enzima não pertencente às famílias IMP e VIM foi descrita por Toleman e colaboradores (2002). Foi denominada SPM-1, São Paulo metalo- β -lactamase, identificada em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada primeiramente na urina e depois na hemocultura de uma criança de quatro anos de idade, internada no Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O gene *bla*_{SPM-1} foi localizado em um plasmídio. A enzima SPM-1 apresenta homologia de 35,5% com a enzima IMP-1 (Figura 1)

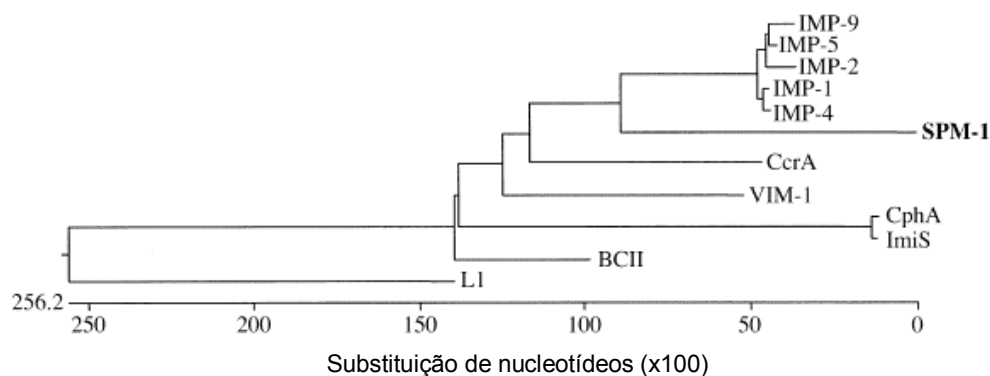


Figura 1 - Árvore filogenética mostrando os grupamentos formados e a relação da SPM-1 com as outras M β Ls. A SPM-1 aparece mais próxima ao agrupamento formado pelas IMPs (Toleman *et al.*, 2002).

A rápida identificação de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L é importante no sentido de contenção da disseminação de tais genes de resistência para outros microrganismos e conseqüentemente, impedir o surgimento e a propagação de patógenos multirresistentes (Walsh *et al.*, 2005;

Sacha *et al.*, 2008). A presença de isolados capazes de hidrolisar carbapenems e outros β -lactâmicos poderá restringir o número de opções terapêuticas disponíveis para tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de M β Ls (Walsh *et al.*, 2008).

2.1.2.2.3 - Resistência Conferida por Mutações

Mutações localizadas nas topoisomerasas II (subunidades gyrA e gyrB) e topoisomerasas IV (subunidades parC e parE) conferem resistência a quinolonas em *P. aeruginosa*, onde a seleção de mutantes ocorre após exposição à esta classe. Evidências sugerem que a levofloxacina tenha maior potencial para induzir mutações que a ciprofloxacina (Gilbert *et al.*, 2001).

2.1.3 - Resistência a Múltiplas Drogas

Isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos, incluindo resistência a múltiplas drogas (três ou mais classes de antimicrobianos) estão amplamente disseminados por todo o mundo e este fenômeno tende a crescer (Sekiguchi *et al.*, 2007; Irfan *et al.*, 2008, Szabó *et al.*, 2008).

Em 2003, o programa MYSTIC relatou importantes variações nas taxas de resistência a múltiplas drogas em isolados de *P. aeruginosa* de diversos locais da Europa. Tais taxas variaram de menos de 3% a 50% (Goossens, 2003). O Programa de Vigilância de Resistência Antimicrobiana SENTRY também mostrou que as taxas de resistência variam de acordo com a região geográfica da América Latina. O rápido aumento de cepas resistentes a múltiplas drogas, com taxas de aproximadamente 35%, também foi notado por este programa nesta região (Sader *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos, de 1993 a 2002, as

taxas de resistência a múltiplas drogas aumentaram de 4% para 14%; os antimicrobianos que apresentaram as maiores taxas foram: ciprofloxacina, imipenem, tobramicina e aztreonam. Mundialmente, a resistência múltipla foi detectada em 10% de todas as cepas de *P. aeruginosa* analisadas (Gales *et al.*, 2001; Obritsch *et al.*, 2004).

A freqüente aquisição de resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa* limita a utilização dos perfis de sensibilidade aos antimicrobianos como ferramenta em tipagem epidemiológica (Gupta, 2008; Nicasio, Kuti & Nicolau, 2008).

2.2. - Epidemiologia e Importância Clínica das infecções causadas por *P. aeruginosa*

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são uma importante causa de morbidade e mortalidade em hospitais, atingindo 2 milhões de pacientes por ano nos Estados Unidos. Este número representa 5% dos pacientes hospitalizados e resulta, em aproximadamente, 88 mil mortes e 4,5 bilhões de dólares em cuidados médicos extras (Bou *et al.*, 2008; Mach *et al.*, 2007; Pirson *et al.*, 2008). Embora os vírus, fungos e protozoários possam ser agentes etiológicos das IRAS, os agentes bacterianos permanecem como a causa mais freqüente deste tipo de infecção (Chant *et al.*, 2008; Tsan *et al.*, 2008).

Vários fatores de risco para aquisição de infecções causadas por patógenos multirresistentes são freqüentemente reportados, como a doença de base, períodos prolongados de hospitalização, procedimentos cirúrgicos, terapia antimicrobiana prévia e presença de catéter urinário. Os principais

problemas de resistência aos antimicrobianos são normalmente associados a patógenos nosocomiais (Carmeli *et al.*, 1999). Dentre os bacilos Gram-negativos os de maior importância são *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESβLs, *P. aeruginosa* produtora de MβL e *P. aeruginosa* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas (Agrawal *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2008; Jonsdottir & Kristinsson, 2008; Kiratisin *et al.*, 2008).

P. aeruginosa é um microrganismo hidrofílico e pode ser facilmente recuperado de ambientes úmidos, como ralos de pia, água de rio, legumes, e até mesmo soluções anti-sépticas, porém, nenhum destes reservatórios ambientais apresenta um grande risco à maioria dos indivíduos saudáveis (Remington & Schimpff, 1981). *P. aeruginosa* raramente causam infecções em humanos saudáveis (Speert *et al.*, 1993).

Entretanto, esta espécie bacteriana assume importante papel como patógeno oportunista na etiologia de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), acometendo freqüentemente pacientes gravemente enfermos (Speert *et al.*, 1993). Na maioria dos casos, o processo infeccioso tem início com algum procedimento invasivo, como por exemplo, a utilização de catéter urinário e ou sonda orotraqueal (Lee *et al.*, 1999; Pollack, 2000; Ronald, 2002). Além destes, outros fatores de risco para a aquisição de infecções causadas por *P. aeruginosa* foram identificados e desses podemos citar: idade, diabetes *mellitus*, hospitalização prolongada e terapia antimicrobiana prévia (Barth & Pitt, 1998; Pollack, 2000).

Pacientes neutropênicos com câncer, pacientes com queimaduras, pacientes com fibrose cística e os internados em unidades de neurocirurgia e de terapia intensiva apresentam maior risco de colonização, e,

conseqüentemente, infecção por *P. aeruginosa* (Tancredi & Andremont, 1985; Koh, Priebe & Pier, 2005, Pruitt *et al.*, 1998, Hancock *et al.*, 1983; Mahenthiralingam, Campbell & Speert, 1994; Burke *et al.*, 1991; Trick *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2001; Torre, Sferratore & Crispino, 2004; Aumeran *et al.*, 2007; Eckmanns *et al.*, 2008; Johansen *et al.*, 2008). Pacientes que recebem ventilação mecânica apresentam alto risco para desenvolver pneumonia associada a isso ou outras pneumonias causadas por *P. aeruginosa*, particularmente depois ou durante o tratamento com agentes antimicrobianos de amplo-espectro (Chastre & Fagon, 2002; Garau & Gomez, 2003; Rossolini & Mantengoli, 2005).

Em um estudo conduzido por Gaynes & Edwards (2005) em parceria com o *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS) do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) foram analisados mais de 410 mil isolados bacterianos associados às infecções adquiridas em unidades de terapia intensiva (UTI), no período de 1986 a 2003, nos Estados Unidos. *P. aeruginosa* foi o segundo patógeno mais freqüentemente isolado de pneumonias hospitalares. Ainda segundo esses dados, *P. aeruginosa* foi a terceira causa mais comum de infecções urinárias, o quarto patógeno mais comuns em infecções de sítio cirúrgico e o sexto patógeno mais freqüentemente isolado em corrente sangüínea (Gaynes & Edwards, 2005).

Dados coletados pelo programa SENTRY na América Latina, no período entre 2001 e 2006, mostram que *P. aeruginosa* aparece como a principal causa de pneumonia em pacientes hospitalizados, a terceira maior causa de infecções de pele e partes moles, e o quinto patógeno mais freqüentemente isolado de infecções de corrente sangüínea e trato urinário na América Latina.

Além disso, aparece como o segundo principal isolado de UTI e o quarto patógeno mais importante em infecções pediátricas (dados do Programa Sentry, não publicados).

No Brasil, *P. aeruginosa* foi também a causa mais freqüente de pneumonias em pacientes hospitalizados, representava o segundo patógeno mais freqüente em infecções de pele e partes moles, o terceiro patógeno mais freqüentemente isolado de infecções urinárias e o quinto mais comum em infecções da corrente sangüínea. Além disso, foi o segundo isolado mais freqüente em UTI no período de 2001 a 2006, de acordo com dados do programa SENTRY (dados do Programa Sentry, não publicados).

Dados do Programa de Vigilância Global fornecidos pela Comissão de Epidemiologia Hospitalar do Hospital São Paulo (HSP), mostram que no Hospital São Paulo, no período de fevereiro de 2006 a abril de 2007, *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais isolado em IRAS, representando 20,3% de todos os isolados bacterianos clínicos. Este patógeno foi seguido em ordem de freqüência por: *A. baumannii* e *K. pneumoniae* (14,9%), *Staphylococcus coagulase negativo* (10,2%), *S. aureus* (9,2%) e *Enterococcus spp* (8,4%). No período de junho de 2007 a dezembro de 2008, *P. aeruginosa* foi responsável por 10,0% das infecções de corrente sanguínea, 28,3% das pneumonias e 34,0% das infecções de trato urinário notificadas pela Comissão de Epidemiologia Hospitalar do HSP (dados da Comissão de Epidemiologia Hospitalar do Hospital São Paulo, não publicados).

No Brasil, *P. aeruginosa* apresenta taxas de resistência aos carbapenens bastante elevadas, cerca de 26% e 31% das amostras de *P.*

aeruginosa são resistentes a imipenem e meropenem, respectivamente (Silva *et al.*, 2007).

Em alguns hospitais brasileiros, cerca de 15 a 35% das amostras são resistentes a praticamente todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente no Brasil (Sader *et al.*, 1999; Gales *et al.*, 2000). Assim, para o tratamento destas infecções voltou a ser utilizada a polimixina B. Trata-se de um agente antimicrobiano catiônico, tóxico e que foi utilizado até meados dos anos 80 para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos. A recuperação de cepas de *P. aeruginosa* resistentes às polimixina ainda é rara em nosso meio (Zavascki *et al.*, 2007; Michalopoulos & Falagas, 2008)

A dificuldade no controle das IRAS e o aparecimento de microrganismo multirresistentes acarretam em maior custo, onerando ainda mais o tratamento dessas enfermidades e a internação hospitalar de pacientes acometidos por estas infecções. Um estudo caso-controle realizado por Martins (2002) em pacientes hospitalizados em unidade de terapia intensiva no Hospital São Paulo, demonstrou que o custo médio total por paciente com infecção por *P. aeruginosa* ou *A. baumannii* multirresistentes é estimado em US\$ 20.795,18 enquanto que o custo médio total por pacientes do grupo controle é de US\$ 2.774,46 ($p < 0.001$) (Martins, 2002).

2.3 - Tipagem Molecular

2.3.1 - Aplicação

A compreensão da distribuição e da relação entre os patógenos é essencial para determinar a epidemiologia das IRAS e auxiliar na introdução de medidas de barreira e prevenção de patógenos (Patel & Graham, 2007). A

função da tipagem de patógenos é determinar se isolados epidemiologicamente relacionados apresentam também relação genética. Historicamente, a tipagem de patógenos nosocomiais foi baseada em comparações de métodos fenotípicos, como biotipagem, sorotipagem, tipagem de bacteriófagos ou bacteriocinas e perfis de sensibilidade aos antimicrobianos. A utilização destas técnicas diminuiu consideravelmente, nas últimas duas décadas, devido ao desenvolvimento e implementação de novas tecnologias baseado na análise do DNA (Sader, Hollis & Pfaller, 1995; Hollis *et al.*, 1999).

Estas metodologias moleculares incluem eletroforese em campo elétrico pulsátil (PFGE) e outros métodos de restrição do DNA, análise de plasmídeos e métodos de tipagem baseados em amplificação por PCR. A introdução de métodos moleculares para a tipagem de microrganismos nosocomiais tem auxiliado de maneira importante a determinação da inter-relação entre cepas bacterianas. O estabelecimento da relação clonal entre patógenos pode: a) ajudar na identificação da fonte de microrganismos ou de contaminação (ambiental ou pessoal); b) distinguir entre cepas infecciosas, não infecciosas e colonizantes e c) diferenciar entre falha terapêutica e re-infecção (Aber & Mackel, 1981; Emori & Gaynes, 1993; Goering, 1993; Jarvis, 1994; Arbeit, 1995; Arbeit, 1999; Cockerill & Smith, 2004).

Muitas espécies que são causas principais de IRAS também são organismos comensais comuns ou ambientais. Assim sendo, é importante determinar se o isolado recuperado do paciente é a cepa patogênica que está possivelmente causando a infecção, ou é um contaminante comensal ou ambiental que, provavelmente, não é a cepa causadora da infecção (Jarvis, 1996; Goering, 2000).

Também é importante que seja determinado se uma segunda infecção em um paciente é causada por uma cepa diferente da causadora da infecção inicial, ou se a infecção é uma recaída da infecção original. Se a infecção for devida a uma recaída, pode-se sugerir que o regime de tratamento inicial não foi efetivo na erradicação do patógeno e terapias alternativas devem ser aplicadas (Versalovic & Lupski, 2002).

Estudos comprovaram que a inclusão de métodos de tipagem molecular associados à vigilância epidemiológica hospitalar convencional tem provado ser custo-efetivo, pois leva à redução posterior dos casos de IRAS (Haley *et al.*, 1987; Peterson *et al.*, 1993; Hacek *et al.*, 1999; Dieckeman *et al.*, 2004). Esta custo-efetividade é maximizada pela colaboração entre o laboratório de microbiologia, o laboratório de tipagem epidemiológica e pelo serviço de controle de infecção hospitalar durante as investigações de surtos (Scheckler *et al.*, 1998; Peterson & Brossette, 2002; Versalovic & Lupski, 2002; Soll, Lockhart & Pujol, 2003).

Técnicas moleculares podem ser muito eficientes para traçar a disseminação de microrganismos em infecções nosocomiais causadas por patógenos geneticamente relacionados, permitindo assim a identificação de potenciais fontes de contaminação e conseqüentemente o controle rápido e efetivo da disseminação. Além disso, pode ajudar no direcionamento do regime de tratamento dos pacientes infectados com microrganismos relacionados geneticamente. Estas são algumas das muitas circunstâncias que servem para justificar o quão essencial é o uso de técnicas moleculares, demonstrando que estes métodos são importantes para estabelecer a epidemiologia das doenças, favorecendo a saúde dos pacientes e ocasionando benefícios econômicos para

o hospital, pela redução do número de IRAS (Peterson *et al.*, 1993; Scheckler *et al.*, 1998).

Do mesmo modo, a determinação de isolados não relacionados provenientes de infecções esporádicas, evita a realização de investigações epidêmicas desnecessárias. Também contribuiu para a redução de custos, por meio da reavaliação da política de uso de antimicrobianos. Portanto, a implantação de métodos moleculares para a genotipagem de bactérias está entre as diretrizes indicadas para o controle de IRAS (Hacek *et al.*, 1999; Mackie, 2004; Gornick, 2005).

2.3.2 - Características

Alguns atributos são importantes para os métodos de tipagem, como a metodologia unificada, a aplicabilidade, a objetividade e a análise crítica. Todos os métodos de tipagem podem ser qualificados em termos de tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de realização e interpretação e custo (Olive & Bean, 1999).

Tipabilidade refere-se à habilidade da técnica de fornecer um resultado (padrão molecular/tipo) para cada isolado. Isolados não-tipáveis são mais comuns por métodos fenotípicos, mas também podem ser encontrados nos métodos genotípicos (Sader, Hollis & Pfaller, 1995).

A reprodutibilidade de um método refere-se à habilidade de fornecer o mesmo resultado quando o mesmo isolado é testado diversas vezes sob as mesmas condições. Baixa reprodutibilidade pode ser resultado de variações técnicas na metodologia ou variação biológica que pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro* dos microrganismos analisados (Aber & Mackel, 1981).

O poder discriminatório de uma técnica condiz com a habilidade de diferenciar cepas epidemiologicamente não relacionadas, fornecendo um padrão distinto para cada amostra testada. Em geral, métodos fenotípicos apresentam poder discriminatório menor que os métodos genotípicos. (Tarasevich, Shaginyan & Mediannikov, 2003).

A maioria dos métodos moleculares requer equipamentos e materiais que apresentam alto custo, porém, são de fácil execução e manuseio e aplicáveis a um grande número de espécies. Métodos fenotípicos envolvem materiais com menores custos, mas podem ser laboriosos, além de terem aplicação restrita a algumas espécies (Andrei & Zervos, 2006; van Belkum, 2003).

Nos últimos anos, técnicas moleculares ou de genotipagem receberam especial atenção como ferramentas para análise de inter-relações epidemiológicas. Métodos genotípicos aplicados ao estudo e controle de IRAS devem, preferencialmente, permitir que isolados epidemiologicamente relacionados coletados durante um episódio de surto possam ser correlacionados geneticamente entre si (Lipuma, 1998).

Em tipagem molecular o termo isolado clínico refere-se a qualquer microrganismo em questão, o termo cepa é utilizado quando o microrganismo já foi caracterizado por métodos de tipagem e o termo clone denota cepas de uma mesma espécie que apresentam as mesmas características genéticas (Sader *et al.*, 1995; Olive & Bean, 1999; Pfaller *et al.*, 2001; Pfaller, 2001).

Os métodos genotípicos de tipagem molecular podem ser divididos em duas grandes categorias: a) métodos comparativos e b) métodos para criação

de um banco de dados. Ambas as categorias podem ser utilizadas em estudos de vigilância epidemiológica.

Os métodos comparativos são mais comumente utilizados na investigação de um surto e possuem a finalidade de detectar a disseminação de um determinado clone em um ambiente específico. Nesta situação, o método de tipagem molecular é utilizado para comparar um número limitado de microrganismos, num período de tempo relativamente curto (dias ou semanas) e tem como finalidade identificar se há ou não uma relação clonal entre os isolados clínicos testados. Para um bom desempenho e para obtenção de resultados fidedignos, é essencial que estas técnicas tenham uma boa reprodutibilidade, um alto poder discriminatório ($> 0,95$) e habilidade para tipar cada organismo testado (tipabilidade) (Hollis *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 2001).

Vários métodos preenchem estes critérios, mas, no entanto, o método que vem sendo utilizado com maior frequência universalmente tem sido a macrorestrição (clivagem com endonucleases de ação rara) de DNA seguida da eletroforese em campo pulsátil. O PFGE é um método de tipagem molecular comparativo, que apresenta excelente poder discriminatório e possui uma ampla aplicabilidade para a maioria das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Tenover *et al.*, 1995; Grundmann *et al.*, 1995; Pfaller *et al.*, 1996; Hollis *et al.*, 1999; Swaminathan *et al.*, 2001).

Os métodos de tipagem para a criação de um banco de dados são mais utilizados em programas de vigilância epidemiológica. Nestes casos é feita a coleta e caracterização de um grande número de microrganismos por um longo período de tempo (meses a anos) e todos estes microrganismos são tipados dentro de um mesmo sistema (composto por um ou mais aparelhos)

padronizado, utilizando-se cepas conhecidas como referência. Além de oferecerem uma nomenclatura comum e alta reprodutibilidade, os resultados obtidos são transferidos para um computador, que analisa e compara o perfil de similaridade entre os microrganismos, anteriormente armazenados, determinando o perfil molecular de cada isolado, além de acrescentar os resultados obtidos no banco de dados do sistema. Deve-se considerar a estabilidade evolucionária dos microrganismos de interesse na determinação do poder discriminatório destes métodos para o reconhecimento da disseminação clonal após períodos prolongados de tempo. Estes métodos para criação de um banco de dados são utilizados principalmente para monitorar a disseminação de clones endêmicos e epidêmicos de regiões geográficas diversas, assim como na avaliação de estratégias preventivas (Struelens *et al.*, 1998).

A crescente utilização das técnicas de tipagem molecular nas últimas décadas levou ao aprimoramento desses métodos, minimizando os problemas de tipabilidade, aumentando a reprodutibilidade e otimizando a análise dos dados coletados e armazenados durante longo período de tempo. Várias destas técnicas de tipagem molecular estão se destacando como importantes ferramentas para investigações epidemiológicas. Entre elas, destacam-se: PFGE, Ribotipagem Automatizada e MLST.

2.3.3 - Eletroforese em Campo Pulsátil - *Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE

PFGE é uma das técnicas de tipagem molecular mais conhecida e utilizada, principalmente, pelo excelente poder discriminatório e pela

aplicabilidade desta técnica à maioria das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Sader *et al.*, 1993; Grundmann *et al.*, 1995; Romling & Tummeler, 2000).

Nesta técnica, é empregado o uso de enzimas de restrição que reconhecem sítios infreqüentes no cromossoma bacteriano, gerando um menor número de fragmentos, que facilita a interpretação dos resultados. Os fragmentos de DNA resultantes são de alto peso molecular e, portanto, para separação destes fragmentos emprega-se a eletroforese em campos alternados (Carle, Frank & Olson, 1986; Ausubel *et al.*, 1994; Chang & Chui, 1998; Roberts *et al.*, 1998).

Este método foi desenvolvido por Schwartz & Cantor (1984) e consiste em uma alteração periódica de direção do campo elétrico aplicado ao gel, onde é possível separar moléculas de DNA de mais de 1.000 kb.

Existem algumas variações na metodologia de PFGE e estas diferem apenas no modo como o campo elétrico pulsátil é aplicado ao gel. As variações mais freqüentemente utilizadas são o campo elétrico aplicado homogeneamente ao gel – “contour-clamped homogenous electric field” - CHEF - e o campo elétrico invertido aplicado ao gel – “field inversion gel electrophoresis” - FIGE (Carle, Frank & Olson, 1986; Finney, 1993). Na variação FIGE o campo elétrico é invertido periodicamente a um ângulo de 180°. Para a variante CHEF é necessária uma cuba de eletroforese equipada com múltiplos elétrodos que alternam a direção do campo elétrico a um ângulo de 120°, reorientando as moléculas de DNA, resultando num perfil migratório em linha reta (Chu *et al.*, 1986).

Muitas vantagens são atribuídas tornando a metodologia PFGE uma técnica de referência para tipagem molecular, sendo utilizada com sucesso em estudos epidemiológicos e para traçar surtos hospitalares (Sader *et al.*, 1993; Livesley *et al.*, 1998; D'Agata *et al.*, 2001). Porém, algumas limitações foram detectadas nessa técnica, entre elas: o longo período para obtenção dos resultados, sendo necessário até seis dias para realização da técnica pelo protocolo convencional (Matushek *et al.*, 1996; Gauton, 1997), menor tipabilidade quando comparada às outras técnicas de tipagem molecular conhecidas (Silbert *et al.*, 2004) e a falta de armazenamento dos resultados obtidos em um banco de dados para futuras pesquisas e comparações.

2.3.4 - Ribotipagem Automatizada

A técnica de ribotipagem foi descrita por Grimont & Grimont (1986) e tem como princípio avaliar o polimorfismo do DNA bacteriano na região onde localiza-se o operon *rrn*, composto pelos genes 16S e 23S, que codificam o RNA ribossomal (rRNA) bacteriano. Estes genes são altamente conservados nas espécies bacterianas e assim, permitem que esta técnica seja aplicada com sucesso para diferenciar cepas bacterianas. Inicialmente, a ribotipagem foi desenvolvida para fins taxonômicos. Estudos posteriores (Stull *et al.*, 1988; Ribeiro *et al.*, 2006) demonstraram a utilidade desta técnica para fins epidemiológicos e desde então, a ribotipagem se tornou uma das ferramentas mais conhecidas nos estudos de epidemiologia molecular.

O procedimento da técnica ribotipagem envolve a extração e digestão do DNA com enzimas de restrição, eletroforese, transferência do DNA para uma membrana de “nylon” ou nitrocelulose (“Southern blotting”) e hibridização com

um sonda que contém a seqüência complementar 16S + 23S do rRNA de uma cepa de *E. coli* (sonda universal). A variedade de fragmentos e padrões moleculares gerados por este processo se dá pelo fato desta seqüência (16S + 23S) ser altamente conservada nas espécies bacterianas, por estes genes aparecerem em diversas cópias no DNA cromossomal e pelos intervalos entre as cópias dos operons serem heterogêneos, diferindo de operon para operon numa mesma espécie e em diferentes espécies bacterianas (Bingen *et al.*, 1994).

A técnica de ribotipagem apresenta grandes vantagens quando comparada a outros métodos que utilizam sondas genéticas. São elas: a) todas as bactérias possuem o operon *rrn* e dessa forma codificam o rRNA, que é altamente conservado entre as espécies, permitindo assim que uma única sonda genética seja utilizada para todas espécies bacterianas e b) pelo fato da maioria das espécies bacterianas possuírem múltiplos operons *rrn*, um número razoável de bandas é obtido com a hibridização (Bingen *et al.*, 1994; Struelens *et al.*, 1998)

Os padrões de RFLP gerados pela ribotipagem revelam dois níveis de diversidade genética. Algumas das bandas geradas e observadas não variam e são específicas para cada espécie, enquanto que outras são bem variáveis dentro de uma mesma espécie bacteriana. Estes níveis de diversidade genética permitem que a ribotipagem seja utilizada como ferramenta para estudos taxonômicos e epidemiológicos (Bingen *et al.*, 1994; Struelens *et al.*, 1998).

A ribotipagem vem sendo utilizada para um grande número de espécies bacterianas. No entanto, os perfis moleculares obtidos por esta técnica

(ribotipos ou ribogrupos) podem apresentar características relativamente estáveis dentro de uma mesma espécie e com isto, bactérias não relacionadas epidemiologicamente podem demonstrar padrões moleculares iguais ou semelhantes (Pfaller *et al.*, 1996; Hollis *et al.*, 1999). Além disso, a ribotipagem apresenta outras desvantagens, como: a) a técnica é laboriosa e demorada; b) a ribotipagem não pode ser utilizada para algumas bactérias, que possuem apenas um ou dois operons *rrn*, como por exemplo os gêneros *Mycobacterium* e *Mycoplasma* e c) bandas com sinais fracos de hibridização podem dificultar a interpretação dos resultados.

Aproveitando as vantagens e tentando resolver as desvantagens da técnica de ribotipagem, uma empresa americana (Qualicon, Wilmington, DE, EUA) desenvolveu um sistema de ribotipagem automatizada, denominado RiboPrinter[®] *Microbial Characterization System*. Este sistema foi desenvolvido inicialmente para atender as necessidades da indústria alimentícia; porém, nos últimos anos, vem sendo utilizado com êxito na identificação e caracterização de bactérias relacionadas às doenças humanas (Bruce, 1996; Pfaller *et al.*, 2001) (Figura 2).



Figura 2 - Sistema de caracterização microbiana RiboPrinter[®].

Neste sistema um computador acoplado ao RiboPrinter® capta a imagem do gel com uma câmara fotográfica e analisa os perfis moleculares automaticamente. Os perfis moleculares obtidos são comparados com todos aqueles previamente testados no sistema e os coeficientes de similaridade são calculados, baseando-se na posição e na intensidade das bandas. Coeficiente de similaridade $\geq 0,90$ entre dois perfis moleculares indica que os microrganismos pertencem ao mesmo clone e são agrupados sob um mesmo ribogruppo. Quando o coeficiente de similaridade for $< 0,90$, indica cepas diferentes e um novo ribogruppo é criado para a amostra em questão (Bruce, 1996) (Figura 3 e 4)

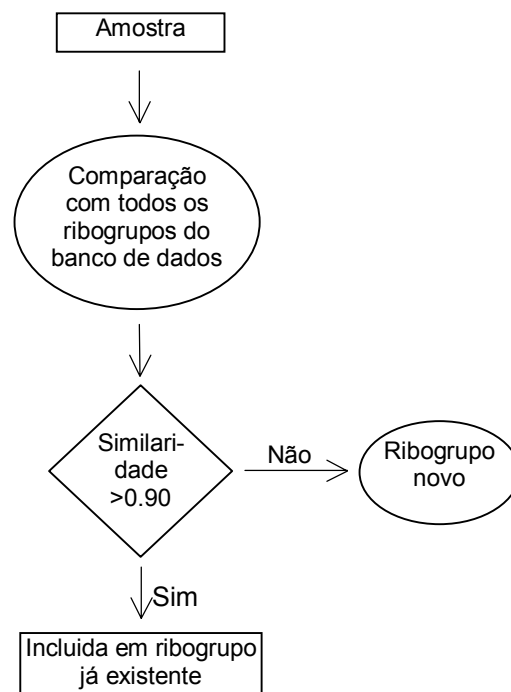


Figura 3 - Fluxograma ilustrando como o RiboPrinter® caracteriza em ribogruppo o padrão gerado.

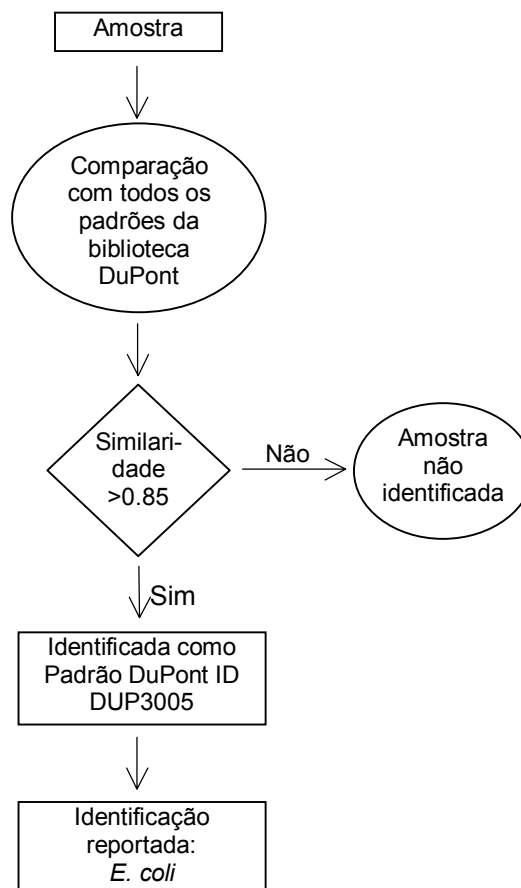


Figura 4 - Fluxograma mostrando como o RiboPrinter® identifica em gênero e espécie de acordo com o padrão gerado pela amostra bacteriana testada.

A alta tipabilidade, alto poder discriminatório, a rapidez do processo (32 amostras em 11 horas), a automação, a facilidade na interpretação dos resultados e a possível padronização inter- e intra-laboratorial dos resultados de tipagem molecular fazem deste sistema uma ferramenta útil em estudos

epidemiológicos de longa duração (Struelens *et al.*, 1998; Hollis *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 2001).

2.3.5 - Tipagem por seqüenciamento de Múltiplos *Loci* - *Multilocus Sequence Typing* - MLST

Recentes avanços na epidemiologia molecular estão associados às análises baseadas nos resultados do seqüenciamento dos nucleotídeos. A rápida expansão do número de genomas bacterianos seqüenciados publicados tem levado ao desenvolvimento de uma variedade de técnicas de tipagem molecular focadas na análise de um único *locus* ou de múltiplos *loci* cromossomais. Técnicas de tipagem epidemiológicas baseadas em seqüenciamento são atrativas, pois proporcionam resultados reproduzíveis e comparáveis, pois, são obtidos com a padronização da metodologia, a uniformidade de interpretação e o armazenamento dos dados em um banco de dados mundial de seqüências (Kemp *et al.*, 2005).

O seqüenciamento de um *locus* específico, como um gene de virulência, de patogenicidade ou de resistência aos antimicrobianos, revela a variabilidade específica no gene, como um polimorfismo de um único nucleotídeo, ou revela áreas com seqüências repetitivas, o que demonstra uma potencial aplicação epidemiológica. Atualmente a tipagem por seqüenciamento de único *locus* (“Single-locus Sequence Typing” - SLST) é muito utilizada na análise de uma região em particular, como o gene para a proteína A estafilocócica. Mas esta metodologia ainda apresenta baixo discriminatório e necessita protocolos padronizados (Zanelli *et al.*, 2004).

Derivado inicialmente da eletroforese de enzimas de múltiplos *loci* (“multilocus enzyme electrophoresis” - MLEE), o MLST utiliza uma porção

maior que é mais representativa do genoma que o SLST. O MLST compara uma seqüência de 400 a 500 pb de nucleotídeos da região interna de uma série de genes, cujos produtos exercem funções metabólicas essenciais, conhecidos como “housekeeping genes” . Para cada fragmento de gene, os polimorfismos genéticos das seqüências internas são considerados alelos distintos. Cada isolado é definido pelos alelos identificados em cada um dos genes seqüenciados, formando o perfil alélico da amostra, constituído por sete números, cada um representando um gene. No final cada perfil alélico é nomeado por um tipo de seqüência (ST) que pode ser usada para descrever a cepa e produzir uma nomenclatura de agrupamentos clonais. Porém, diferentemente do MLEE os perfis alélicos obtidos com o MLST são precisos, não apresentam ambigüidade e podem ser comparáveis e trocados entre laboratórios (Maiden *et al.*, 1998; Enright & Spratt, 1999; Spratt, 1999; Spratt, Feil & Smith, 2001).

Como existem distintas seqüências de alelos diferentes para cada gene, é improvável que um perfil alélico idêntico ocorra por casualidade. Assim, isolados com o mesmo perfil alélico são apontados como representantes de um mesmo clone. O MLST foi inicialmente desenvolvido para identificar cepas hipervirulentas de *Neisseria meningitides* (Maiden *et al.*, 1998), entretanto, esta técnica tem sido aplicada a uma grande variedade de patógenos, incluindo cepas multirresistentes a antimicrobianos (Enright & Spratt, 1998; Deurenberg *et al.*, 2007; Hamal, 2007; Woodford, 2008; Singh & Mohapatra, 2008).

O método MLST, como o MLEE, foi originalmente desenvolvido para apontar inter-relações genéticas em populações bacterianas, comparando a diversidade dos genes estudados e realizando estudos evolucionários. Porém,

o período analisado em investigações epidemiológicas de surtos hospitalares, geralmente, representa um curto espaço de tempo. Deste modo, enquanto o MLST é excelente para estudar a inter-relação de uma grande população em longos períodos, em um cenário hospitalar esta técnica se mostra menos discriminatória que outros métodos de tipagem, que destacam alterações recentes do DNA bacteriano (Spratt, Hanage & Feil, 2001).

O MLST apresenta o potencial de uma técnica baseada em seqüenciamento, que inclui perfis reprodutíveis, resultados intercambiáveis, alta padronização e formação de banco de dados. Mas, por ser uma técnica que utiliza seqüenciamento, a aplicação do MLST em cenários hospitalares pode ser prejudicada em investigações de surtos, onde resultados rápidos são necessários, pois o seqüenciamento dos sete e em alguns casos oito genes, geram aproximadamente 3.500 a 4.000 pb a serem analisados para cada isolado estudado e com isto, o resultado pode ser demorado (Maiden *et al.*, 1998; Spratt, 1999). Por outro lado, este fato tem sido resolvido com a bioinformática, que dispõe de programas que realizam o alinhamento das seqüências de nucleotídeos obtidas. Estes programas baseiam-se na análise do alinhamento de nucleotídeos para realizar um agrupamento (*clusters*).

No MLST os alelos são considerados distintos se apresentarem diferença em um único nucleotídeo ou em vários nucleotídeos. Nenhuma medida é utilizada para analisar os números de nucleotídeos diferentes entre os alelos no MLST, pois não é possível distinguir se diferenças na seqüência de nucleotídeos são devidas a múltiplas mutações ou a um único evento de recombinação, que introduziu múltiplas alterações (Maiden *et al.*, 1998; Enright & Spratt, 1999; Spratt, 1999).

Os fragmentos de 450 a 500 pb usados no MLST são pequenos o bastante para serem seqüenciados com precisão, utilizando um único par de primers. Além do que, possuem o tamanho suficiente para apresentarem variações satisfatórias, para determinar múltiplos alelos diferentes (seqüências diferentes) para cada *locus*. Assim, com somente sete genes é possível obter uma grande variedade de perfis alélicos. A probabilidade de dois isolados sem relação epidemiológica apresentarem o mesmo perfil alélico, por casualidade, é extremamente baixa e pode ser calculada a partir do produto das freqüências dos alelos individuais (Feil et al., 2004; Hanage *et al.*, 2005).

O MLST apresenta alto poder discriminatório e a característica dos genes estruturais de acumular lentamente as variações, torna-o uma ferramenta ideal para estudos de epidemiologia global (Enright & Spratt, 1999; Maiden *et al.*, 1998; Spratt, 1999). Pelo fato de ser uma técnica baseada em dados provenientes de seqüenciamentos, é possível fazer uso da Internet para comparar resultados entre laboratórios (Enright & Spratt, 1998; Spratt, 1999). Pesquisadores em diversos locais do mundo podem seqüenciar os fragmentos dos sete genes de uma amostra de interesse e acessar o *website* (<http://www.mlst.net> ou <http://pubmlst.org/>) para determinar o número do alelo de cada *locus* e determinar o seu ST, além de poder comparar o perfil alélico obtido com os outros perfis alélicos dos isolados já existentes no banco de dados central. Dessa forma, foi superada uma das principais dificuldades do MLEE, que era a comparação dos dados intra-laboratorialmente.

2.4 - Dendrogramas

Um modo de analisar os resultados obtidos com técnicas de tipagem molecular é efetuar a análise de agrupamentos hierárquicos que interligam as amostras por associações; produzindo assim um dendrograma, onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si.

A suposição básica de sua interpretação é que quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendrogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível (Neto & Moita, 1998).

Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço n -dimensional. O método matemático mais simples consiste em agrupar os pares de pontos que estão mais próximos, usando a distância euclidiana e substituí-los por um novo ponto localizado na metade da distância entre eles. Este procedimento, quando repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, leva a construção do dendrograma, onde no eixo horizontal são colocadas as amostras e, no eixo vertical o índice de similaridade entre os pontos i e j , calculado segundo a seguinte expressão:

$$s_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{m\acute{a}x}}$$

Onde:

s_{ij} = índice de similaridade entre quaisquer dois pontos

i e j = dois pontos quaisquer que estão sendo analisados

d_{ij} = distância entre os pontos i e j

$d_{máx}$ = distância máxima entre qualquer par de pontos.

Os dendrogramas, portanto, consistem em diagramas que representam a similaridade entre pares de amostras (ou grupos de amostras, ou pontos analisados) numa escala que vai de um (idênticas) a zero (nenhuma similaridade) (Brooks & Wiley, 1985) e são construídos por programas estatísticos que fazem classificação dos dados através de agrupamento hierárquico (“Hierarchical Analysis ou Cluster Analysis”) (Setúbal & Meidanis 1997).

Os dendrogramas são construídos diretamente por todos os programas estatísticos que fazem classificação dos dados através de agrupamento hierárquico. Devido às facilidades computacionais para obtenção de dendrogramas, é importante se atentar para alguns pontos: a) a identificação do grupamento pode ser realizada por diversos algoritmos, que podem gerar resultados conflitantes entre si e b) as variáveis escolhidas para a identificação dos grupamentos tem grande relevância na interpretação do resultado final (Neto & Moita, 1998).

2.5 - Métodos de Reconstrução Filogenética

A metodologia filogenética consiste basicamente na separação de organismos em grupos que compartilham propriedades específicas. A classificação assim obtida pode ser representada em uma estrutura de árvore conhecida como árvore filogenética ou filogenia (Avise, 1989).

Uma filogenia sempre representa uma hipótese de relações entre grupos, inferida com base nos dados estudados, que podem ser caracteres morfológicos moleculares. Essa hipótese está sujeita à confirmação ou refutada no futuro, isso dependerá das análises realizadas, como também, da escolha dos métodos utilizados para a análise. O termo unidade taxonômica operacional (“Operational Taxonomic Unit” - UTO) é utilizado para denominar as unidades objeto da análise (Sneath & Sokal, 1962).

Quando se discute a relação de parentesco entre espécies ou amostras dentro de uma mesma espécie, o conceito mais básico em termos de evolução é que, para quaisquer duas espécies ou duas amostras de uma mesma espécie, é necessário formular uma hipótese de que existiu ao menos um ancestral comum a ambos. Já no caso de três elementos, a hipótese feita é que há um ancestral comum a dois deles que não é comum ao terceiro (Setúbal & Meidanis, 1997).

Ampliando esse pensamento de forma a abranger todas as espécies ou um grande grupo de amostras de uma mesma espécie, é possível obter uma espécie ancestral a todos, que sofreu divisões subseqüentes até as espécies atuais, o que se costuma chamar de árvore filogenética (Amorim, 1997).

Árvores filogenéticas representam as relações de ancestralidade comum entre táxons (elementos) ou grupos. A construção de árvores filogenéticas auxilia a biologia a explicar os possíveis relacionamentos entre as espécies atuais e a deduzir suas histórias evolutivas. Tais árvores possuem ramos que representam as espécies e nós que correspondem à seus ancestrais (Brooks & Wiley, 1985).

A construção de uma árvore filogenética baseada em características de determinados elementos, tem como entrada uma matriz de características. A Figura 5 mostra como dados dispostos em uma matriz são transpostos em uma árvore filogenética perfeita.

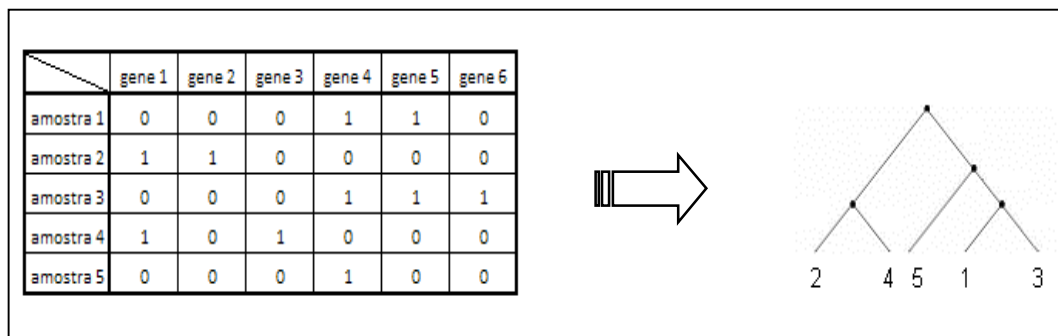


Figura 5 - Matriz de entrada de dados e respectiva árvore filogenética.

As árvores filogenéticas contêm informações úteis na investigação científica em uma grande variedade de questões biológicas, como na biogeografia, zoologia, microbiologia e botânica, pois, a função da metodologia filogenética nestes campos é a de ordenar o conhecimento sobre a diversidade biológica das espécies (Amorim, 1997).

Para combinar as diferentes características de cada amostra e reconstruir as árvores filogenéticas são utilizados vários métodos. Estes métodos podem ser divididos em três formas: a) métodos cladísticos, baseados em métodos de parcimônia; b) métodos probabilísticos, baseados em verossimilidade, e c) métodos fenéticos, que são baseados em distância.

2.5.1 - Métodos Cladísticos

2.5.1.1 - Método de Máxima Parcimônia

O método mais utilizado se baseia no princípio da máxima parcimônia que consiste na teoria de que a melhor hipótese para explicar um processo é aquela que requer o menor número de passos. Para a análise filogenética, isso significa minimizar o número de mudanças evolutivas que devem ser assumidas em relação a todos os caracteres, em todos os grupos da árvore (Pinteiro & Viana, 2005; Yang, 1996).

O método de máxima parcimônia analisa todas as possíveis disposições de uma árvore ótima (que seja mais próxima do mínimo número de passos). A análise se baseia em substituições de aminoácidos presentes no DNA ou perda e ganho de sítios de restrição. Este método, quando aplicado a dados de seqüenciamentos, pode considerar cada aminoácido como um ponto a ser analisado (Eck & Dayhoff, 1966), ou pode considerar o código genético como um todo e analisar apenas as mutações ou substituições observadas.

2.5.2 - Métodos Probabilísticos

2.5.2.1 - Método de Máxima Verossimilhança

Para a reconstrução de filogenias baseadas em dados moleculares também é utilizado o método da máxima verossimilhança. Este método desenvolvido por Felsenstein (1981) é baseado na reconstrução filogenética através da busca por uma árvore que maximize a probabilidade dos dados observados (Sankararaman *et al.*, 2008).

Assim, este método procura pela árvore com maior probabilidade ou maior verossimilhança. Os algoritmos computacionais empregados nesses

métodos são desenvolvidos para lidar com o fato de que mutações que resultam na substituição de nucleotídeos são comuns, mas que suas frequências podem ser estimadas independentemente por meio de outras informações genéticas (Purves *et al.*, 2002; Pinteiro & Viana, 2005).

O método de verossimilhança avalia a probabilidade de que um modelo evolucionário escolhido tenha gerado as seqüências observadas. A filogenia é deduzida ao se encontrar a árvore com maior verossimilhança, sob a hipótese de que cada sítio do DNA evolui independentemente. Conforme o modelo de evolução de Markovian, descrito pelo matemático russo Andrey Andreyevich Markov, por volta de 1900, é possível calcular a verossimilhança para cada local separadamente e combinar as verossimilhanças num valor total. Para calcular a verossimilhança para um sítio n devem ser consideradas todas as possibilidades (todos os cenários possíveis) pelos quais os nucleotídeos presentes nas pontas da árvore possam ter evoluído. Então, a verossimilhança para um local particular é a soma das probabilidades de todas as reconstruções possíveis de estados ancestrais (Hasegawa, Kishino & Saitou, 1991; Kolaczkowski & Thornto, 2004).

2.5.3 - Métodos Fenéticos

2.5.3.1 - UPGMA - Método de Grupamento de Pares Não Ponderados Baseados na Média Aritmética (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” - UPGMA).

Desenvolvido por Sneath & Sokal (1973), o UPGMA é o método mais simples de construção de árvores filogenéticas a partir de dados de distância. Este método foi desenvolvido originalmente para construção de fenogramas

taxonômicos, ou seja, árvores que refletem as similaridades fenotípicas entre as unidades taxonômicas operacionais - UTOs (Sokal & Sneath, 1963) ou também denominados táxons, mas que pode também ser usado para construir árvores filogenéticas, se as taxas de evolução forem aproximadamente constantes entre as diferentes cepas estudadas. O UPGMA emprega um algoritmo seqüencial de agrupamento, no qual as relações são identificadas em ordem de similaridade e a árvore é construída passo a passo.

A metodologia é realizada da seguinte forma: primeiro são identificados entre todas as UTOs estudadas as duas mais similares e que a partir disso serão tratadas como uma única unidade taxonômica ou UTO composta. Subseqüentemente é identificada outra UTO no grupo estudado, que tenha maior similaridade com esta unidade taxonômica formada (UTO composta), e assim por diante, até serem analisadas todas as UTOs do grupo estudado.

2.5.3.2 - Método de Ligação Vizinha (*Neighbor-Joining Method* - NJ)

Este método foi desenvolvido por Saitou & Nei (1987), e se baseia no princípio de evolução mínima descrita por Cavalli-Sforza & Edwards (1967), porém apresenta maior rapidez que seu precursor. O princípio deste método é aproximar um par de UTOs que estão próximas uma da outra, mas, distantes das restantes. Assim, identifica os vizinhos mais próximos e conseqüentemente o tamanho total da árvore é minimizado.

O método se inicia com uma árvore em forma de estrela, onde baseado nos valores de uma matriz de distância, as duas UTOs mais semelhantes são ligadas entre si e separadas das demais. Consecutivamente, novamente a

partir da matriz de distância, as UTOs que apresentarem as seqüências mais próximas são ligadas e apartadas das demais. Esta matriz de distância é calculada para cada par de UTOs e este procedimento é repetido até que restem apenas dois nós. Para confirmar a veracidade de árvores criadas por métodos que utilizam matrizes de distância, é realizada uma análise estatística denominada “bootstrap”, que se baseia no rearranjo aleatório do conjunto de dados para criar novas replicas, indicando os ramos que estão melhor apoiados pelos dados (Davison & Hinkley, 1997)

2.5.3.3 - Modelo de Jukes-Cantor

A realização de análises utilizando seqüências atuais, não fornece a possibilidade de determinar todas as substituições que realmente ocorreram durante a evolução das seqüências. Isso se deve pelo fato de que em uma única posição pode ter ocorrido mais de um evento, e dessa forma, mudanças adicionais são mascaradas por ocorrerem em sítios que já foram mutados anteriormente (Jukes & Cantor, 1969).

Para evitar este problema, diversas técnicas de compensação foram desenvolvidas; tratam-se de modelos de evolução que buscam corrigir as diferenças observadas através de processos que estimam o total de mudança evolutiva real que pode ter acontecido para gerar aquele padrão de divergência genética. O mais simples desses modelos é o Jukes-Cantor, que estabelece possibilidades iguais para de substituição de bases (Jukes & Cantor, 1969). Um outro modelo, denominado Kimura 2-parâmetros, que considera que transições são mais comuns que transversões, atribuindo “pesos” diferentes para a ocorrência dos dois tipos de mutação (Kimura, 1983).

3 - OBJETIVOS

1. Implantar a técnica MLST para tipagem molecular de *P. aeruginosa* de acordo com a técnica descrita por Curran e colaboradores (2004), no setor de tipagem molecular do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo;
2. Simplificar o protocolo de MLST para *P. aeruginosa* descrito por Curran e colaboradores (2004) e padroniza-lo em nosso laboratório;
3. Avaliar comparativamente o poder discriminatório e a reprodutibilidade da técnica MLST àquelas das técnicas de PFGE e ribotipagem automatizada para tipagem molecular de *P. aeruginosa*, além de avaliar a capacidade do MLST de discriminar amostras que são classificadas sob ribogrupos distintos, mas com padrões de PFGE idênticos;
4. Caracterizar a evolução filogenética do clone de *P. aeruginosa* produtor da metalo- β -lactamase SPM-1.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Amostras Estudadas

A Tabela 1 mostra a relação das 55 amostras selecionadas para o estudo. Onde além das 50 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, foram incluídas para comparação três amostras de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 (P2607, P3486 e P3489) e duas amostras de *P. aeruginosa* não produtoras de MβLs (P2669 E P3135) com a finalidade de demonstrar a capacidade das técnicas de discriminarem amostras não relacionadas ao clone de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1.

Tabela 1 - Relação das amostras de *P. aeruginosa* selecionadas para o estudo.

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Data de Isolamento | Sítio de Isolamento | Característica da Amostra |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|------------------------------|
| P 2669 | Belo Horizonte / MG | 18.06.2002 | Urina | Amostra não produtora de MβL |
| P 3135 | São Luis / MA | 06.11.2002 | CVC | Amostra não produtora de MβL |
| P 2607 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | TGI | Produtora de IMP-1 |
| P 3486 | João Pessoa / PB | 13.03.03 | S. traqueal | Produtora de IMP-1 |
| P 3489 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | S. de pele | Produtora de IMP-1 |
| P 1088 | São Paulo / SP | 25.02.2001 | Sangue | Produtora de SPM-1 |
| P 700 | São Paulo / SP | 2000 | Sangue | Produtora de SPM-1 |
| P 867 | São Paulo / SP | 2000 | Sangue | Produtora de SPM-1 |
| P 1104 | São Paulo / SP | 21.02.2001 | Sangue | Produtora de SPM-1 |
| P 1621 | São Paulo / SP | 08.09.2001 | Sangue | Produtora de SPM-1 |
| P 1971 | São Paulo / SP | 2001 | Sangue | Produtora de SPM-1 |
| P 1280 | São Paulo / SP | 01.05.2001 | Sangue | Produtora de SPM-1 |
| P 2839 | São Paulo / SP | 29.08.2002 | Sangue | Produtora de SPM-1 |
| P 2951 | São Paulo / SP | 26.09.2002 | S. de pele | Produtora de SPM-1 |

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Data de Isolamento | Sítio de Isolamento | Característica da Amostra |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|
| P 3747 | São Paulo / SP | 15.06.2003 | Outras secreções | Produtora de SPM-1 |
| P 3748 | São Paulo / SP | 15.06.2003 | Outras secreções | Produtora de SPM-1 |
| P 2536 | Santo André / SP | 18.03.2002 | TGI | Produtora de SPM-1 |
| P 2430 | Santo André / SP | 30.03.2002 | S. de pele | Produtora de SPM-1 |
| P 2533 | Santo André / SP | 22.04.2002 | TGI | Produtora de SPM-1 |
| P 2535 | Santo André / SP | 22.04.2002 | TGI | Produtora de SPM-1 |
| P 2606 | Santo André / SP | 04.06.2002 | Urina | Produtora de SPM-1 |
| P 4620 | Rio de Janeiro / RJ | 10.03.2004 | N.E. | Produtora de SPM-1 |
| P 3962 | Belo Horizonte / MG | 31.07.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 3964 | Belo Horizonte / MG | 31.07.2003 | Urina | Produtora de SPM-1 |
| P 3299 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | S. de pele | Produtora de SPM-1 |
| P 3300 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | TRI | Produtora de SPM-1 |
| P 3301 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | S. de pele | Produtora de SPM-1 |
| P 3302 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 3303 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 3304 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | S. traqueal | Produtora de SPM-1 |
| P 3305 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | S. de pele | Produtora de SPM-1 |
| P 3306 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | S. traqueal | Produtora de SPM-1 |
| P 3307 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 3310 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | S. traqueal | Produtora de SPM-1 |
| P 3311 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 2525 | Londrina / PR | 15.04.2002 | Outras secreções | Produtora de SPM-1 |
| P 2526 | Londrina / PR | 16.04.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 2527 | Londrina / PR | 15.04.2002 | Urina | Produtora de SPM-1 |
| P 2528 | Londrina / PR | 15.04.2002 | Urina | Produtora de SPM-1 |
| P 2674 | Londrina / PR | 18.06.2002 | S. de pele | Produtora de SPM-1 |
| P 2746 | Londrina / PR | 24.07.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 2818 | Curitiba / PR | 21.08.2002 | TRI | Produtora de SPM-1 |

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Data de Isolamento | Sítio de Isolamento | Característica da Amostra |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|
| P 2819 | Curitiba / PR | 21.08.2002 | Urina | Produtora de SPM-1 |
| P 2477 | Salvador / BA | 02.04.2002 | S. traqueal | Produtora de SPM-1 |
| P 2478 | Salvador / BA | 04.2002 | S. de pele | Produtora de SPM-1 |
| P 2479 | Salvador / BA | 14.04.2002 | Urina | Produtora de SPM-1 |
| P 2640 | Salvador / BA | 07.06.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 3141 | São Luis / MA | 06.11.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 3142 | São Luis / MA | 06.11.2002 | Urina | Produtora de SPM-1 |
| P 2608 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | Urina | Produtora de SPM-1 |
| P 2610 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 2613 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | CVC | Produtora de SPM-1 |
| P 3488 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | S. ferida cirúrgica | Produtora de SPM-1 |
| P 3490 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | S. de pele | Produtora de SPM-1 |
| P 2807 | Brasília / DF | 16.08.2002 | S. traqueal | Produtora de SPM-1 |

CVC: Cateter venoso central; TRI: Trato respiratório inferior; TGI: Trato gastro intestinal; NE: não especificado;

Todas as amostras de *P. aeruginosa* utilizadas neste estudo estavam armazenadas no Banco de Microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), da Disciplina de Infectologia, do Departamento de Medicina, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), onde foi realizado o estudo. As amostras bacterianas permaneceram estocadas em solução glicerol estéril (Caldo Triptona Soja e glicerina bi-destilada 15%) e em água destilada autoclavada armazenadas em freezer -20°C, e também e em temperatura ambiente, respectivamente. Para realizar a reativação destes microrganismos, as amostras foram semeadas em ágar sangue e ágar nutriente e cultivados em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 16 a 18 horas.

4.2 - Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos *loci* - MLST

A técnica de MLST desenvolvida por Curran e colaboradores (2004) para tipagem molecular de *P. aeruginosa* consiste na amplificação e seqüenciamento de sete genes estruturais previamente caracterizados (Tabela 2). Para a tipagem de amostras de *P. aeruginosa*, um par de iniciadores é utilizado para a amplificação de cada um dos genes estruturais e outro par é utilizado para cada uma das reações de seqüenciamento (Curran *et al.*, 2004). Portanto, o protocolo para a tipagem de *P. aeruginosa* pela técnica de MLST diferencia-se dos demais, onde o mesmo par de iniciadores utilizados na amplificação dos genes é utilizado para o seqüenciamento dos mesmos

Tabela 2 - Descrição dos genes selecionados para tipagem de amostras de *P. aeruginosa* pela técnica MLST (Curran *et al.*, 2004).

| Gene | Proteína codificada | Função |
|-------------|---------------------------------------|---|
| <i>acsA</i> | Coenzima acetil-A sintetase | Metabolismo central intermediário |
| <i>aroE</i> | Siquimato desidrogenase | Biossíntese e metabolismo de aminoácidos |
| <i>guaA</i> | GMP sintetase | Biossíntese e metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos |
| <i>mutL</i> | Proteína de reparo de erros no DNA | Replicação, recombinação, modificação e reparo do DNA |
| <i>nuoD</i> | Cadeia C,D de NADH desidrogenase | Metabolismo energético |
| <i>ppsA</i> | Fosfoenolpiruvato sintetase | Catabolismo do Carbono, metabolismo central intermediário, metabolismo energético |
| <i>trpE</i> | Componente I de antranilato sintetase | Biossíntese e metabolismo de aminoácidos, metabolismo energético |

O DNA alvo utilizado para PCR foi preparado a partir do crescimento bacteriano obtido do subcultivo em ágar sangue (Columbia Blood Agar, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. As colônias foram transferidas da placa com o auxílio de uma alça calibrada descartável de 1 μL para um microtubo de 1,5 mL que continha 100 μL de água destilada estéril. Esta suspensão foi submetida a fervura por 5 minutos e posterior centrifugação por 1 min a 16.128 g. Após a fervura, a solução foi centrifugada e o sobrenadante foi aspirado e transferido para um novo microtubo estéril que continha 300 μL de água MilliQ estéril.

Para amplificação dos sete genes foram utilizados os iniciadores específicos listados na Tabela 3. Para cada reação foi utilizado 0,5 μL de cada um dos iniciadoras a uma concentração de 10 μmol , 12,5 μL de Go Taq® Green Master Mix 2X (Tampão de reação pH 8,5, 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3 mM MgCl_2 e Taq DNA Polymerase), 0,5 μL do DNA alvo, e água MilliQ estéril para um volume final de 25 μL .

Para as reações de amplificação foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem:

- Lise celular a 95° por 10 minutos,
- Desnaturação a 95°C por 1 minuto,
- Anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 minuto,
- Extensão a 72°C por 1 minuto,
- Número de ciclos: 34 ciclos,
- Extensão final a 72°C por 10 minutos.

O período de ciclagem total foi de aproximadamente 2 horas e 20 minutos. Os tubos foram mantidos a 4°C até serem retirados do aparelho. Após a amplificação no termociclador (Eppendorf Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 2 µL dos produtos obtidos foram analisados através da eletroforese em gel de agarose a 0,8 %.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes alvos.

| Gene | Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores | Tamanho dos Amplicons (pb) |
|-------------|--|----------------------------|
| <i>acsA</i> | 5' ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC 3' (adiante) | 842 |
| | 5' GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT 3' (contrário) | |
| <i>aroE</i> | 5' TGGGGCTATGACTGGAAACC 3' (adiante) | 825 |
| | 5' TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA 3' (contrário) | |
| <i>guaA</i> | 5' CGGCCTCGACGTGTGGATGA 3' (adiante) | 940 |
| | 5' GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA 3' (contrário) | |
| <i>mutL</i> | 5' CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG 3' (adiante) | 940 |
| | 5' CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC 3' (contrário) | |
| <i>nuoD</i> | 5' ACCGCCACCCGTA CTG 3' (adiante) | 1.042 |
| | 5' TCTCGCCCATCTTGACCA 3' (contrário) | |
| <i>ppsA</i> | 5' GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG 3' (adiante) | 989 |
| | 5' GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG 3' (contrário) | |
| <i>trpE</i> | 5' GCGGCCAGGGTCGTGAG 3' (adiante) | 811 |
| | 5' CCCGGCGCTTGTTGATGGTT 3' (contrário) | |

O gel foi preparado por aquecimento e a agarose foi diluída em tampão TBE 10X (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA, 0,002 M) e água destilada estéril, a uma concentração final de 0,8%. Para cada 50 mL desta solução foi adicionado 2 µL de brometo de Etídeo, antes da distribuição da agarose no molde de acrílico. Os fragmentos de DNA resultantes das reações de

amplificação foram aplicados nas canaletas do gel. Como marcador de peso molecular foi utilizado Ready-load™ 100 pb DNA Ladder (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) 0,1 µg/µL. Após a corrida eletroforética realizada por 30 minutos sob corrente de 100 V em cubas para eletroforese horizontal (Bio-Rad, USA) e com tampão TBE 0,5X, os géis foram observados no transiluminador de luz ultravioleta e fotografados. O produto da reação foi armazenado a 4°C para posterior quantificação e purificação do DNA.

Para a purificação dos produtos amplificados foi utilizado o kit *QIAquick PCR Purification* de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Este procedimento foi realizado com os 23 µL restantes de material amplificado presente no tubo de PCR, pois somente 2 µL foi utilizado na eletroforese. Esta etapa consistiu na adição de tampão PBI (cloreto de guanidinium 25-50%, isopropanol 25-50% fornecido pelo fabricante) em 5 vezes o volume da amostra amplificada presente no tubo (23 µL), seguida pela homogeneização delicada e transferência para a coluna de purificação. Foi realizada centrifugação dos tubos por 1 min a 20°C a 1.008 g. O sobrenadante foi descartado e adicionado 750 µL de tampão de lavagem PE com etanol (10 mM TrisHCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) também fornecido pelo fabricante, seguido de uma nova etapa de centrifugação por 1 min a 20°C a 1.008 g. Após a centrifugação, a solução foi desprezada, a coluna na qual o DNA estava impregnado foi centrifugada novamente por 1 min a 20°C a 1.008 g para eliminação do etanol residual.

A coluna foi transferida para um microtubo limpo e adicionado 50 µL de tampão de eluição EB (10 mM TrisHCl, pH 8.5), seguida de uma nova etapa de centrifugação por 1 min a 20°C a 1.008 g. Após a centrifugação, a coluna foi

desprezada e o DNA eluído no tampão EB foi congelado até o momento da quantificação.

A quantificação do DNA genômico amplificado foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, versão 3.2.1; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Um volume de 2 µL do DNA total purificado foi submetido ao aparelho NanoDrop que fez a leitura da absorbância e forneceu a concentração do DNA em ng/mL.

Para a reação do seqüenciamento foi utilizada a quantidade de 70 ng/mL de DNA de cada amostra.

Os produtos amplificados de cada um dos sete genes foram submetidos à reação preparatória para o seqüenciamento com o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Para cada amostra, duas reações foram preparadas, uma para o iniciador adiante e outra para o iniciador contrário, cada uma contendo 4 µL de tampão de reação, 3,2 µmol do iniciador, a quantidade necessária de DNA e água MilliQ estéril para um volume final de 20 µL. Após o término da reação de PCR preparatória com os iniciadores mostrados na Tabela 4 para a reação de seqüenciamento, o produto foi novamente purificado, por precipitação para a eliminação dos d-dNTPs marcados não incorporados à reação. A precipitação foi realizada com isopropanol em microtubos.

Após a desnaturação das amostras a 95°C por 3 min, foram realizadas as etapas de precipitação e lavagem. A seguir, o produto foi ressuspenso em polímero TSR e colocado no aparelho ABI PRISM 3100, *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Perkin Elmer, CA, USA). As seqüências de DNA obtidas

foram analisadas com a utilização do programa *Lasergene Software Package* (DNASTAR, Madison, WI, USA) e BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) e, então, submetidas à comparação com as bases de dados genéticos disponíveis na internet, nos sites do MLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) e do Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Tabela 4 - Descrição dos iniciadores utilizados para a reação de seqüenciamento (Curran *et al.*, 2004).

| Nome do Gene | Seqüência de nucleotídeos dos primers | Tamanho dos Amplicons (pb) |
|--------------------|--|----------------------------|
| <i>acsA</i> | 5' GCCACACCTACATCGTCTAT 3' (adiante) | 390 |
| | 5' AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC 3' (contrário) | |
| <i>aroE</i> | 5' ATGTCACCGTGCCGTTCAAG 3' (adiante) | 495 |
| | 5' TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG 3' (contrário) | |
| <i>guaA</i> | 5' AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC 3' (adiante) | 372 |
| | 5' GACGTTGTGGTGCGACTTGA 3' (contrário) | |
| <i>mutL</i> | 5' AGAAGACCGAGTTCGACCAT 3' (adiante) | 441 |
| | 5' GGTGCCATAGAGGAAGTCAT 3' (contrário) | |
| <i>nuoD</i> | 5' ACGGCGAGAACGAGGACTAC 3' (adiante) | 366 |
| | 5' TGGCGGTCGGTGAAGGTGAA 3' (contrário) | |
| <i>ppsA</i> | 5' GGTGACGACGGCAAGCTGTA 3' (adiante) | 369 |
| | 5' GTATCGCCTTCGGCACAGGA 3' (contrário) | |
| <i>trpE</i> | 5' TTCAACTTCGGCGACTTCCA 3' (adiante) | 441 |
| | 5' GGTGTCCATGTTGCCGTTCC 3' (contrário) | |

4.3 - Simplificação do protocolo de MLST descrito por Curran e colaboradores (2004)

Para simplificação do protocolo foi realizada a amplificação dos sete genes estruturais com os mesmos iniciadores utilizados para o seqüenciamento, que estão descritos na Tabela 4. A utilização de iniciadores iguais para a amplificação e para o sequenciamento na técnica MLST é aplicada a muitos outros microrganismos, como *Streptococcus pneumoniae* e *S. aureus* (Enright & Spratt, 1998; Enright *et al.*, 2000).

A técnica modificada foi realizada para dez amostras (P1088, P2607, P2669, P3135, P3306, P3486, P3489, P2535, P2478 E P700), em duas ocasiões diferentes.

Para calcular a reprodutibilidade da metodologia de MLST modificada em comparação com a metodologia convencional, foi estabelecido que duas amostras seriam repetidas em triplicata. Assim, os isolados de *P. aeruginosa* (isolado 1 e 2) foram avaliados seis vezes em duas ocasiões distintas para as duas metodologias.

4.4 - Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado (PFGE)

Todas as 55 amostras selecionadas para o estudo foram submetidas à tipagem molecular pela técnica PFGE. Algumas amostras já haviam sido caracterizadas por esta técnica no estudo de Menezes (2005), mas com o intuito de avaliar os resultados discrepantes entre as técnicas de ribotipagem automatizada e PFGE, todas as amostras foram novamente submetidas à tipagem molecular por PFGE neste estudo.

As amostras de *P. aeruginosa* foram subcultivadas em ágar sangue para a obtenção de colônias puras e isoladas. Foram transferidas aproximadamente quatro colônias de cada amostra para um tubo contendo 4 mL de caldo tríptico de soja (TSB - Oxoid, Inglaterra), e incubadas por um período de 18 a 24 horas. Após a incubação os tubos contendo as amostras bacterianas foram centrifugados a 1.512 g por 15 minutos. Em seguida, as células precipitadas foram diluídas em 1 mL de solução salina e transferidas para um tubo de microcentrifuga previamente pesado. Os tubos foram centrifugados novamente a 25.200 g por aproximadamente 30 segundos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado.

Com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células), os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído em salina na proporção de 1:1, isto é, o volume da salina em μL foi equivalente ao peso do centrifugado em μg . Um volume de 5 μL dessa solução foi transferida para outro tubo, onde foi adicionado 300 μL da solução tampão TEM (Tris 100 mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM; água destilada). Essa nova solução foi homogeneizada e misturada à 340 μL de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point* - FMC, Rockland, USA) para a formação de pequenos blocos de géis contendo o DNA cromossômico. Os blocos foram incubados por um período mínimo de cinco horas em solução EC (Tris 6 mM, pH 7,5; NaCl 1 M; EDTA 0,01 M; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada) à 37°C e a seguir incubados à 50°C, em 2 mL de solução ES (EDTA 0,4 M, pH 9,3; Sarcosil 1,0%) contendo proteinase K (20 mg/mL, Sigma - P4914) na seguinte proporção: 2 mg de proteinase K para 2 mL de ES, por um período de 12 horas. Após este período de incubação, os blocos foram lavados por quatro

vezes com solução CHEF-TE (Tris 0,1 M, pH 7,5; EDTA 0,1 M) e armazenados nessa solução até serem submetidos à digestão enzimática e, posterior, eletroforese.

O DNA bacteriano das amostras de *P. aeruginosa* estudadas foram digeridos com a enzima de restrição SpeI (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, USA - 10U por amostra), por 12 a 18 horas à uma temperatura de 37°C, A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) e os padrões de variação da corrente elétrica (*switch time*) foram 5 segundos (inicial) e final de 90 segundos (final). A eletroforese foi realizada por um período de 24 horas, em solução 0,5x TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA, 0,002 M) à temperatura de 13°C e utilizando uma corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,08 µL/mL) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e fotografados sob luz ultravioleta.

Os perfis migratórios obtidos após a fotografia do gel foram analisados visualmente seguindo os critérios de Tenover e colaboradores (1995). Este critério determina que amostras são consideradas idênticas (derivadas de uma mesma cepa ou pertencentes a um mesmo clone), quando apresentam todas as bandas iguais; amostras que apresentam um ou dois eventos genéticos diferentes, representados por diferenças em até seis bandas, são consideradas semelhantes e pertencentes a um mesmo clone; e amostras que apresentam sete ou mais bandas discordantes, representando três ou mais eventos genéticos diferentes, são consideradas amostras não relacionadas epidemiologicamente. Para efeito de representação, são utilizados letras e números, onde uma letra maiúscula é usada para representar um clone; e para

cada perfil relacionado à este clone, ou seja, um subtipo, é utilizada a mesma letra maiúscula seguida de um número arábico.

Além da análise visual, os perfis de PFGE das amostras foram submetidos ao programa de análise de géis BioNumerics (Applied Maths, Austin, USA).

4.5 - Ribotipagem Automatizada

Neste estudo não foi necessário realizar a técnica de ribotipagem automatizada, pois as amostras estudadas já haviam sido ribotipadas e os perfis genéticos estavam armazenados no banco de dados presente no equipamento Riboprinter® (Dupont, Qualicon, DE, USA).

Entretanto, novas pesquisas e comparações utilizando módulos de comparação por similaridade, presente no programa do banco de dados do aparelho foram realizadas novamente. Todas as amostras de interesse foram localizadas e seus dados como perfil migratório, ribogrupos, coeficiente de identificação e similaridade com ribogrupos já existentes foram acessados e analisados.

4.6 - Criação de Dendrogramas

Os perfis de bandas obtidos com as técnicas PFGE e Ribotipagem Automatizada foram analisadas utilizando o programa BioNumerics (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA). Em todas as imagens, a definição de bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida individualmente, por comparação visual. O coeficiente de similaridade utilizado foi o coeficiente de Dice (Dice, 1945). O dendograma foi construído utilizando o algoritmo de

análise filogenética UPGMA (Sneath & Sokal, 1973). No programa BioNumerics, é necessário que todas as bandas sejam marcadas e os pesos moleculares sejam definidos. Para a realização do dendrograma, é necessário escolher o tipo de análise, o coeficiente de otimização do gel que será aplicado e um percentual de tolerância para a comparação das posições das bandas. Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 1,0 e 2,0%, respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada cluster de isolados.

Os dendogramas serão apresentados logo após os respectivos resultados obtidos com as três técnicas avaliadas.

4.7 - Cálculo do Poder Discriminatório e Reprodutibilidade

O poder discriminatório (D) de uma técnica é uma estimativa da habilidade desta técnica de distinguir duas cepas não relacionadas. Hunter (1990) descreveu uma fórmula que tem sido utilizada para o cálculo do poder discriminatório das técnicas de tipagem bacteriana. Esta fórmula foi utilizada neste estudo na avaliação das técnicas de PFGE, ribotipagem automatizada e MLST.

Fórmula de Hunter:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^N a_j$$

Onde:

N = número total de isolados testados,

j = um isolado em questão

a_j = número de isolados dentro do total que foram idênticos ao “ j ”

Quando o resultado do teste for $D=1$, significa que a técnica foi capaz de distinguir todas as cepas. Se o resultado do teste for $D=0$, significa que todos os isolados clínicos foram iguais. Para que uma técnica de tipagem seja utilizada com confiança, um resultado $D \geq 0,90$ é desejável (Hunter, 1990).

4.8 - Criação de Árvores Filogenéticas

As seqüências de nucleotídeos obtidas com os perfis alélicos foram alinhadas no programa BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA), e um arquivo de alinhamento foi gerado. Este arquivo contendo o alinhamento de todas as seqüências foi importado para o programa PAUP - *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA) que cria árvores de inferência evolucionária ou árvores filogenéticas a partir da análise do alinhamento obtido.

Para a criação de árvores, o programa PAUP realiza a construção de uma matriz de similaridade, que contém apenas números e que para serem visualizados em formato de cladogramas ou árvores precisam ser traduzidos por um outro programa denominado TreeView (Roderick D.M. Page, University of Glasgow, Glasgow, UK).

5 - RESULTADOS

5.1 - MLST

5.1.1 - Padronização da Metodologia Convencional

A Figura 6 ilustra a reação de amplificação dos genes *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* e *trpE* de acordo com o protocolo desenvolvido por Curran e colaboradores (2004). Nesta Figura podemos observar que os respectivos amplicons gerados pela PCR para os sete genes, possuem o peso molecular esperado. Assim a padronização do protocolo convencional da técnica MLST em nosso laboratório foi realizada com sucesso.

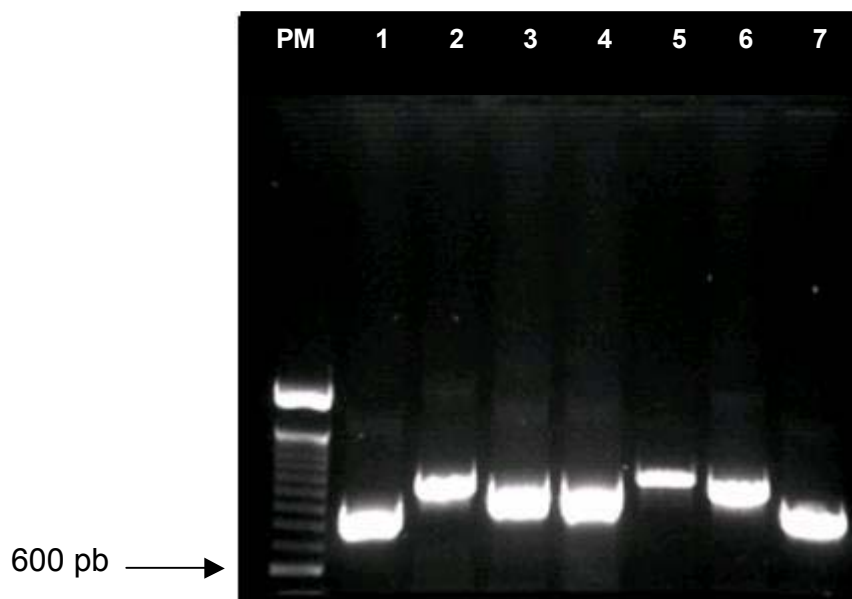


Figura 6 - Amplificação dos sete genes utilizados na técnica MLST. PM: padrão de peso molecular 100 pb. Linha 1, gene *acsA*; linha 2, gene *aroE*; linha 3, gene *guaA*; linha 4, gene *mutL*; linha 5, gene *nuoD*; linha 6, gene *ppsA* e linha 7, gene *trpE*.

5.1.2 - Padronização da Metodologia Modificada de MLST

A alteração no protocolo foi realizada visando à diminuição no tempo para a realização da técnica e nos custos com os iniciadores utilizados nesta metodologia. Na Figura 7, podemos verificar que os fragmentos obtidos com as reações de PCR, realizadas com os iniciadores propostos para a reação de sequenciamento, possuem o tamanho esperado e que não apresentam produtos inespecíficos. Este fato demonstra que os iniciadores descritos para a reação de seqüenciamento funcionam perfeitamente quando utilizados para a reação inicial de amplificação.

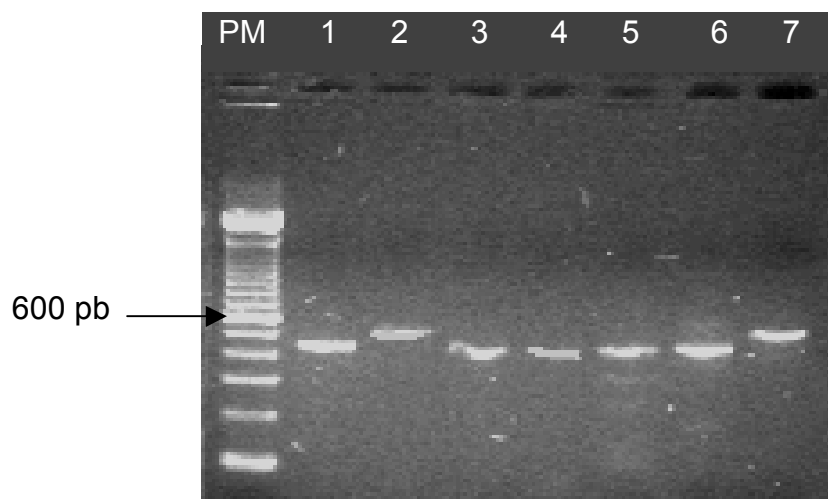


Figura 7 - Amplificação dos sete genes utilizados na técnica MLST realizada utilizando os iniciadores descritos para o seqüenciamento. PM: padrão de peso molecular 100pb. Linha 1, gene *acsA*; linha 2, gene *aroE*; linha 3, gene *guaA*; linha 4, gene *mutL*; linha 5, gene *nuoD*; linha 6, gene *ppsA* e linha 7, gene *trpE*.

A técnica modificada foi realizada para dez amostras (P1088, P2607, P2669, P3135, P3306, P3486, P3489, P2535, P2478 E P700), em duas

ocasiões diferentes, onde os perfis obtidos foram 100% idênticos aos obtidos com a metodologia descrita por Curran e colaboradores (2004).

Para calcular a reprodutibilidade da metodologia de MLST convencional e da metodologia modificada, duas amostras foram testadas em triplicata em todos os dois métodos. Assim sendo, os isolados de *P. aeruginosa* (isolado 1 e 2) foram avaliados seis vezes em duas ocasiões distintas, por cada técnica avaliada, e apresentaram resultados 100% concordantes.

5.1.3 - Perfis Alélicos e STs Obtidos com a Técnica MLST

Após o seqüenciamento de cada gene, as seqüências obtidas foram depositadas no site do MLST para *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa>), onde receberam um número para identificação no banco de dados mundialmente utilizado, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Relação dos perfis alélicos e STs obtidos das amostras de *P. aeruginosa* com a técnica MLST realizada de acordo com o protocolo descrito por Curran e colaboradores (2004).

| Nº da Amostra | Característica da amostra | Nº de Identificação no Banco de Dados do Site MLST | Perfil Alélico de Cada Gene | | | | | | DOS ST | |
|---------------|---------------------------|--|-----------------------------|--------------|------|------|------|------|-------------------|------|
| | | | acsA | aroE | guaA | mutL | NuoD | ppsA | | trpE |
| | | | P 2669 | MβL negativo | 386 | 17 | 5 | 12 | | 31 |
| P 3135 | MβL negativo | 387 | 17 | 5 | 12 | 5 | 14 | 4 | 7 | 595 |
| P 2607 | IMP-1 | 385 | 38 | 89 | 3 | 13 | 1 | 2 | 4 | 593 |
| P 3486 | IMP-1 | 389 | 38 | 89 | 3 | 13 | 1 | 2 | 4 | 593 |
| P 3489 | IMP-1 | 365 | 38 | 89 | 3 | 13 | 1 | 2 | 4 | 593 |
| P 1088 | SPM-1 | 384 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 700 | SPM-1 | 346 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 867 | SPM-1 | 344 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 1104 | SPM-1 | 372 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 1621 | SPM-1 | 347 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 1971 | SPM-1 | 345 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 1280 | SPM-1 | 373 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 2839 | SPM-1 | 341 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |

| Nº da Amostra | Característica da amostra | Nº de Identificação no Banco de Dados do Site MLST | Perfil Alélico de Cada Gene | | | | | | ST | |
|---------------|---------------------------|--|-----------------------------|-------|------|------|------|------|----|------|
| | | | acsA | aroE | guaA | mutL | NuoD | ppsA | | trpE |
| | | | P 2951 | SPM-1 | 376 | 39 | 5 | 9 | | 11 |
| P 3747 | SPM-1 | 383 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 3748 | SPM-1 | 381 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 2536 | SPM-1 | 393 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 2430 | SPM-1 | 361 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 2533 | SPM-1 | 354 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |
| P 2535 | SPM-1 | 355 | 39 | 5 | 9 | 11 | 27 | 5 | 2 | 277 |

Entre as 50 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 estudadas, 49 amostras (98%) foram classificadas como pertencentes à uma única ST (ST277). Uma única amostra de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 não foi incluída nesta ST, recebendo a designação ST235. Esta amostra foi obtida de um paciente com infecção de corrente sanguínea hospitalizado em um centro médico em Belo Horizonte, MG, em dezembro de 2002.

As três amostras estudadas de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 apresentaram perfis alélicos idênticos (38, 89, 3, 13, 1, 2 e 4) e que ainda não haviam sido identificados no banco de dados do MLST. Para estas amostras foi criada uma nova ST, descrita ST235.

As amostras não produtoras de metalo enzima incluídas neste estudo (P2669 e P3135) apresentaram perfis alélicos distintos apenas por um único locus variante (*single locus variante*) e inexistente no banco de dados, desta forma, duas novas STs foram criadas para estas amostras, ST594 e ST595, respectivamente.

5.2 - Ribotipagem automatizada – Consulta ao banco de dados do RiboPrinter®

Das 50 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 analisadas, 29 (58%) apresentaram o ribogrupo 72-3 (Figura 8), que representa o clone endêmico de *P. aeruginosa* produtor de M β L SPM-1.

| Sample | Dupont ID | RiboGroup | RiboPrint® Pattern | | | | |
|--------|-------------------------------|------------|--------------------|---|----|----|----|
| | | | 1kbp | 5 | 10 | 15 | 50 |
| P1088 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2608 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2807 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2951 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3142 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3141 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P4620 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2746 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3748 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3747 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3310 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P1104 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3488 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3964 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2674 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2606 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3962 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2430 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3299 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2818 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2819 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3490 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3303 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3306 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3302 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P3301 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P700 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P1280 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| P2839 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 222-72-S-3 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

Figura 8 - Relatório do RiboPrinter® para amostras que apresentam ribogrupos iguais ao 72-3.

As demais 21 amostras (42%) de *P. aeruginosa* produtoras de MβL SPM-1 analisadas não foram agrupadas no ribogrupos 72-3, representante do clone endêmico, e foram distribuídas em 13 ribogrupos distintos. (Figura 9).

| Sample | Dupont | ID | RiboGroup | RiboPrint® Pattern | | | |
|--------|-------------|------------|-------------|--------------------|---|----|----|
| | | | | 1kbp | 5 | 10 | 15 |
| P2669 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-69-S-5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P3135 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-69-S-5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2478 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-71-S-5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P3486 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-72-S-1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2607 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-72-S-1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P3489 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-72-S-1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2525 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-77-S-1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2527 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-77-S-2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2535 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-77-S-2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2610 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-78-S-4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2526 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-78-S-4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2477 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-78-S-4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2528 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-78-S-4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2479 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-78-S-4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2536 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-78-S-4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2533 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-78-S-4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2640 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-79-S-8 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P2613 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-88-S-2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P1621 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-89-S-5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P1971 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-97-S-7 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P3304 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-97-S-7 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P867 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-103-S-4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P3300 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-105-S-7 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P3307 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-105-S-7 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P3311 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-105-S-7 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P3305 | Pseudomonas | aeruginosa | 222-105-S-7 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Figura 9 - Relatório do RiboPrinter® para os outros ribogrupos das amostras estudadas.

Ao analisarmos os perfis obtidos com a ribotipagem automatizada, podemos verificar que foram gerados padrões bem distintos do padrão do clone endêmico representado pelo ribogruppo 72-3. Os ribogruppos, os locais e datas de isolamento estão listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Relação de amostras e seus respectivos ribogrupos.

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Data de Isolamento | Característica da Amostra | Ribogrupo |
|-------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------|
| P 2669 | Belo Horizonte / MG | 18.06.2002 | Amostra não produtora de MβL | 69-5 |
| P 3135 | São Luis / MA | 06.11.2002 | Amostra não produtora de MβL | 69-5 |
| P 2607 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | Produtora de IMP-1 | 72-1 |
| P 3486 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | Produtora de IMP-1 | 72-1 |
| P 3489 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | Produtora de IMP-1 | 72-1 |
| P 1088 | São Paulo / SP | 25.02.2001 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 700 | São Paulo / SP | 2000 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 867 | São Paulo / SP | 2000 | Produtora de SPM-1 | 103-4 |
| P 1104 | São Paulo / SP | 21.02.2001 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 1621 | São Paulo / SP | 08.09.2001 | Produtora de SPM-1 | 89-5 |
| P 1971 | São Paulo / SP | 2001 | Produtora de SPM-1 | 97-7 |
| P 1280 | São Paulo / SP | 01.05.2001 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2839 | São Paulo / SP | 29.08.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2951 | São Paulo / SP | 26.09.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3747 | São Paulo / SP | 15.06.2003 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3748 | São Paulo / SP | 15.06.2003 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2536 | Santo André / SP | 18.03.2002 | Produtora de SPM-1 | 78-4 |
| P 2430 | Santo André / SP | 30.03.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2533 | Santo André / SP | 22.04.2002 | Produtora de SPM-1 | 78-4 |
| P 2535 | Santo André / SP | 22.04.2002 | Produtora de SPM-1 | 77-2 |
| P 2606 | Santo André / SP | 04.06.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 4620 | Rio de Janeiro / RJ | 10.03.2004 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3962 | Belo Horizonte / MG | 31.07.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3964 | Belo Horizonte / MG | 31.07.2003 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3299 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3300 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 105-7 |
| P 3301 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |

RESULTADOS

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Data de Isolamento | Característica da Amostra | Ribogruppo |
|-------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------|
| P 3302 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3303 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3304 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 97-7 |
| P 3305 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 105-7 |
| P 3306 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3307 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 105-7 |
| P 3310 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3311 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | Produtora de SPM-1 | 105-7 |
| P 2525 | Londrina / PR | 15.04.2002 | Produtora de SPM-1 | 77-1 |
| P 2526 | Londrina / PR | 16.04.2002 | Produtora de SPM-1 | 78-4 |
| P 2527 | Londrina / PR | 15.04.2002 | Produtora de SPM-1 | 77-2 |
| P 2528 | Londrina / PR | 15.04.2002 | Produtora de SPM-1 | 78-4 |
| P 2674 | Londrina / PR | 18.06.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2746 | Londrina / PR | 24.07.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2818 | Curitiba / PR | 21.08.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2819 | Curitiba / PR | 21.08.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2477 | Salvador / BA | 02.04.2002 | Produtora de SPM-1 | 78-4 |
| P 2478 | Salvador / BA | 04.2002 | Produtora de SPM-1 | 71-5 |
| P 2479 | Salvador / BA | 14.04.2002 | Produtora de SPM-1 | 78-4 |
| P 2640 | Salvador / BA | 07.06.2002 | Produtora de SPM-1 | 79-8 |
| P 3141 | São Luis / MA | 06.11.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3142 | São Luis / MA | 06.11.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2608 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2610 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | Produtora de SPM-1 | 78-4 |
| P 2613 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | Produtora de SPM-1 | 88-2 |
| P 3488 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 3490 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |
| P 2807 | Brasília / DF | 16.08.2002 | Produtora de SPM-1 | 72-3 |

As amostras de *P. aeruginosa* não produtoras M β L, apesar de serem de locais de isolamento distantes, uma do Centro-Oeste e outra do Nordeste, apresentaram perfis de ribotipagem muito similares e foram agrupadas no mesmo ribogrupo (69-5).

Das três amostras *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1, duas foram isoladas em João Pessoa, em 2003, e uma em Fortaleza em 2002, estas amostras possuíram perfil de ribotipagem idênticos, e foram incluídas no ribogrupo 72-1.

Dentre as 21 amostras de *P. aeruginosa* produtoras SPM-1, as quais não foram incluídas no ribogrupo representante do clone endêmico 72-3, sete amostras (33,3%) apresentaram perfil de ribotipagem muito similares e foram agrupadas sob o mesmo ribogrupo 78-4. Destas sete amostras, duas (P2536 e P2533) foram isoladas em na cidade de Santo André/SP, outras duas amostras (P2526 e P2527) foram isoladas em Londrina/PR, duas amostras foram provenientes de Salvador/BA e uma amostra foi isolada em Fortaleza/CE, todas no ano de 2002.

Outras quatro amostras (19%) apresentaram padrões de ribotipagem similares e foram agrupadas sob o mesmo ribogrupo 105-7. Estas quatro amostras foram isoladas, em 2002, em Belo Horizonte/MG.

Duas amostras, uma de Santo André/SP e outra de Londrina/PR apresentaram perfis de ribotipagem idênticos e foram agrupadas no ribogrupo 77-2.

Outras duas amostras, uma isolada em São Paulo/SP em 2001 e outra isolada em Belo Horizonte/MG em 2002, tiveram perfis idênticos e por isso

foram agrupadas sob o mesmo ribogruppo 97-7. As demais amostras (n=6) não apresentaram similaridade no perfil de ribotipagem, e assim, receberam ribogruppos distintos.

Após a obtenção de todos os perfis de ribotipagem foi realizada a análise de similaridade utilizando o programa BioNumerics® que forneceu o dendograma a seguir (Figura 10). Neste dendograma, no canto esquerdo superior, há uma escala que mostra o grau de similaridade; esta escala deve sempre ser lida da esquerda, que representa o menor grau de similaridade, para a direita, maior grau de similaridade. Analisando-se o dendograma desta forma, é possível observar cinco *clusters* principais formados com os perfis de ribotipagem das amostras estudadas.

Além disso, é possível constatar a presença de um *cluster* predominante que apresentou similaridade > 94%, onde foram agrupadas todas as amostras pertencentes ao clone endêmico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 72-3. Outro *cluster* menor, representado pelo ribogruppo 78-4 apresentou similaridade maior que 90% com o *cluster* do clone endêmico 72-3. O ribogruppo 105-7 foi agrupado com similaridade superior a 94%. Os demais ribogruppos foram agrupados em diferentes *clusters*, os quais foram menos frequentes.

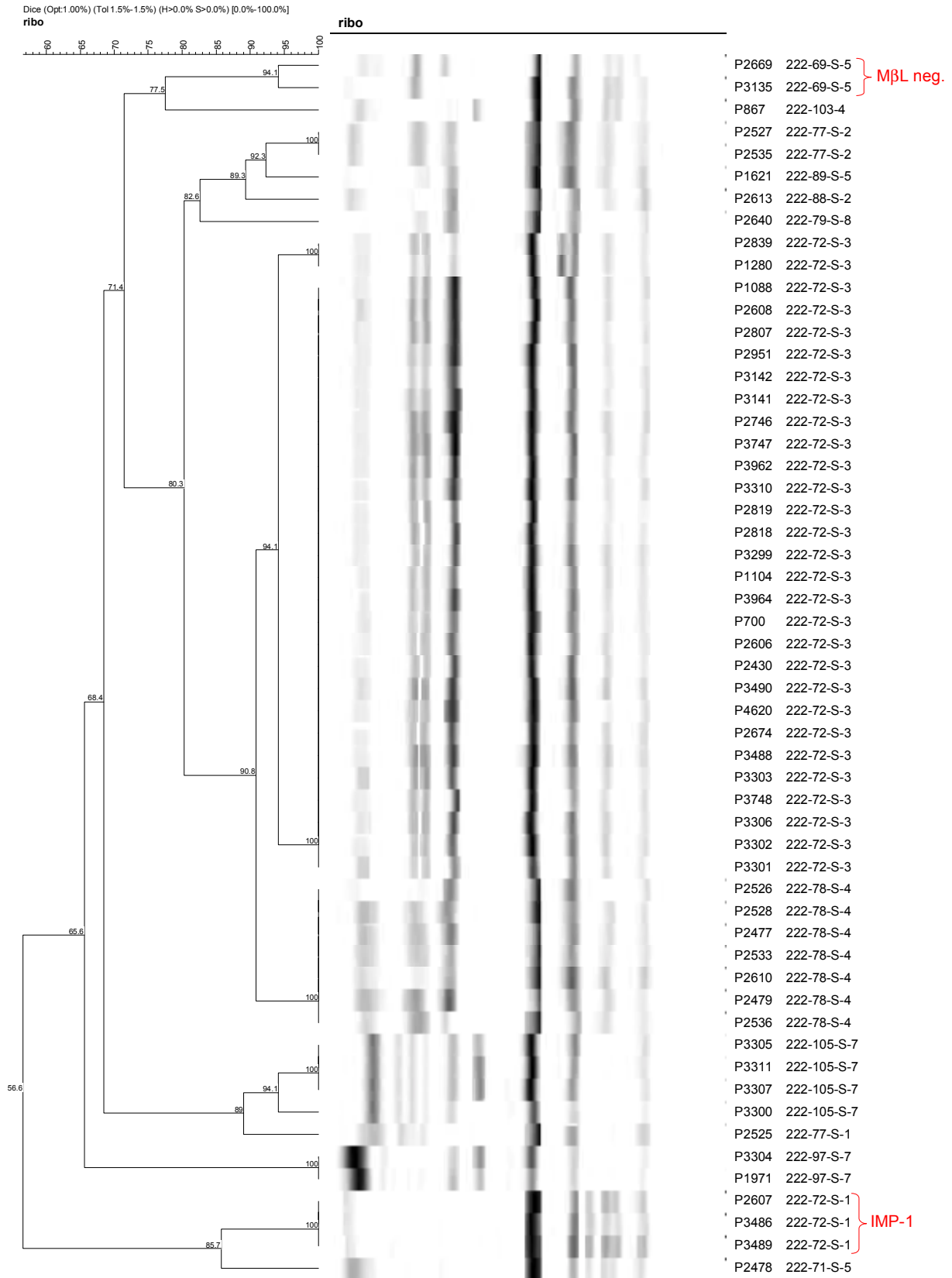


Figura 10 - Dendrograma das amostras estudadas, analisando o perfil de ribotipagem gerado por PvuII.

5.3 - PFGE

Apenas 54 amostras foram submetidas à tipagem por PFGE, pois a amostra P867 não foi viável para a realização desta técnica. Após as amostras serem submetidas à tipagem molecular por PFGE, os perfis de restrição obtidos foram adicionados ao programa BioNumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) para a realização da análise comparativa.

Os respectivos perfis obtidos pela técnica de PFGE das amostras tipadas estão descritos na Tabela 8 e ilustrados na Figura 11.

Tabela 7 - Relação de padrões obtidos com a técnica PFGE das amostras de *P. aeruginosa* estudadas.

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Data de Isolamento | Característica da amostra | Padrão de PFGE |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------------|----------------|
| P 2669 | Belo Horizonte / MG | 18.06.2002 | MβL negativo | A |
| P 3135 | São Luis / MA | 06.11.2002 | MβL negativo | B |
| P 2607 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | IMP-1 | E |
| P 3486 | João Pessoa / PB | 13.03.03 | IMP-1 | F |
| P 3489 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | IMP-1 | F1 |
| P 1088 | São Paulo / SP | 25.02.2001 | SPM-1 | C |
| P 700 | São Paulo / SP | 2000 | SPM-1 | C |
| P 867 | São Paulo / SP | 2000 | SPM-1 | NV* |
| P 1104 | São Paulo / SP | 21.02.2001 | SPM-1 | C |
| P 1621 | São Paulo / SP | 08.09.2001 | SPM-1 | C |
| P 1971 | São Paulo / SP | 2001 | SPM-1 | C1 |
| P 1280 | São Paulo / SP | 01.05.2001 | SPM-1 | C |
| P 2839 | São Paulo / SP | 29.08.2002 | SPM-1 | C |
| P 2951 | São Paulo / SP | 26.09.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3747 | São Paulo / SP | 15.06.2003 | SPM-1 | C |

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Data de Isolamento | Característica da amostra | Padrão de PFGE |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------------|----------------|
| P 3748 | São Paulo / SP | 15.06.2003 | SPM-1 | C1 |
| P 2536 | Santo André / SP | 18.03.2002 | SPM-1 | C |
| P 2430 | Santo André / SP | 30.03.2002 | SPM-1 | C |
| P 2533 | Santo André / SP | 22.04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2535 | Santo André / SP | 22.04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2606 | Santo André / SP | 04.06.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 4620 | Rio de Janeiro / RJ | 10.03.2004 | SPM-1 | D |
| P 3962 | Belo Horizonte / MG | 31.07.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3964 | Belo Horizonte / MG | 31.07.2003 | SPM-1 | C |
| P 3299 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3300 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3301 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3302 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3303 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C |
| P 3304 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3305 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3306 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3307 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3310 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 3311 | Belo Horizonte / MG | 13.12.2002 | SPM-1 | C |
| P 2525 | Londrina / PR | 15.04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2526 | Londrina / PR | 16.04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2527 | Londrina / PR | 15.04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2528 | Londrina / PR | 15.04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2674 | Londrina / PR | 18.06.2002 | SPM-1 | C |
| P 2746 | Londrina / PR | 24.07.2002 | SPM-1 | C2 |
| P 2818 | Curitiba / PR | 21.08.2002 | SPM-1 | C1 |
| P 2819 | Curitiba / PR | 21.08.2002 | SPM-1 | C |

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Data de Isolamento | Característica da amostra | Padrão de PFGE |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------------|----------------|
| P 2477 | Salvador / BA | 02.04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2478 | Salvador / BA | 04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2479 | Salvador / BA | 14.04.2002 | SPM-1 | C |
| P 2640 | Salvador / BA | 07.06.2002 | SPM-1 | C |
| P 3141 | São Luis / MA | 06.11.2002 | SPM-1 | C4 |
| P 3142 | São Luis / MA | 06.11.2002 | SPM-1 | C4 |
| P 2608 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | SPM-1 | C |
| P 2610 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | SPM-1 | C |
| P 2613 | Fortaleza / CE | 04.06.2002 | SPM-1 | C |
| P 3488 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | SPM-1 | C |
| P 3490 | João Pessoa / PB | 13.03.2003 | SPM-1 | C |
| P 2807 | Brasília / DF | 16.08.2002 | SPM-1 | C |

*NV: amostra não viável para a realização da técnica

As amostras não produtoras de M β L (P2669 e P3135) receberam dois perfis de PFGE distintos (“A” e “B” respectivamente), estes perfis foram diferentes entre si e das demais amostras.

Das três amostras produtoras de IMP-1, duas (P3486 e P3489), foram isoladas na cidade de João Pessoa e classificadas como pertencentes ao mesmo padrão de PFGE. Estas amostras apresentaram padrão “F” e subtipo “F1” e, portanto, existência de similaridade genética e um provável ancestral comum próximo. A outra amostra produtora de IMP-1 (P2607) apresentou padrão distinto de PFGE e recebeu padrão “E”.

As 49 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 submetidas à técnica de PFGE apresentaram perfis de restrição muito similares, onde 30 amostras apresentaram perfis considerados idênticos e foram classificadas como perfil de PFGE “C” e desta forma, consideradas como pertencentes à um

único clone. As demais amostras produtoras de SPM-1 apresentaram padrões de PFGE muito similares ao perfil “C” e foram classificadas como pertencentes à três subtipos deste clone, onde o subtipo “C1” foi o mais freqüente (15 amostras), seguido do subtipo “C4” encontrado em duas amostras e do subtipo “C2” observado em apenas uma amostra.

Das amostras produtoras de SPM-1, apenas uma amostra (P4620) apresentou perfil de PFGE diferente do perfil clonal dominante e recebeu um padrão distinto denominado “D”.

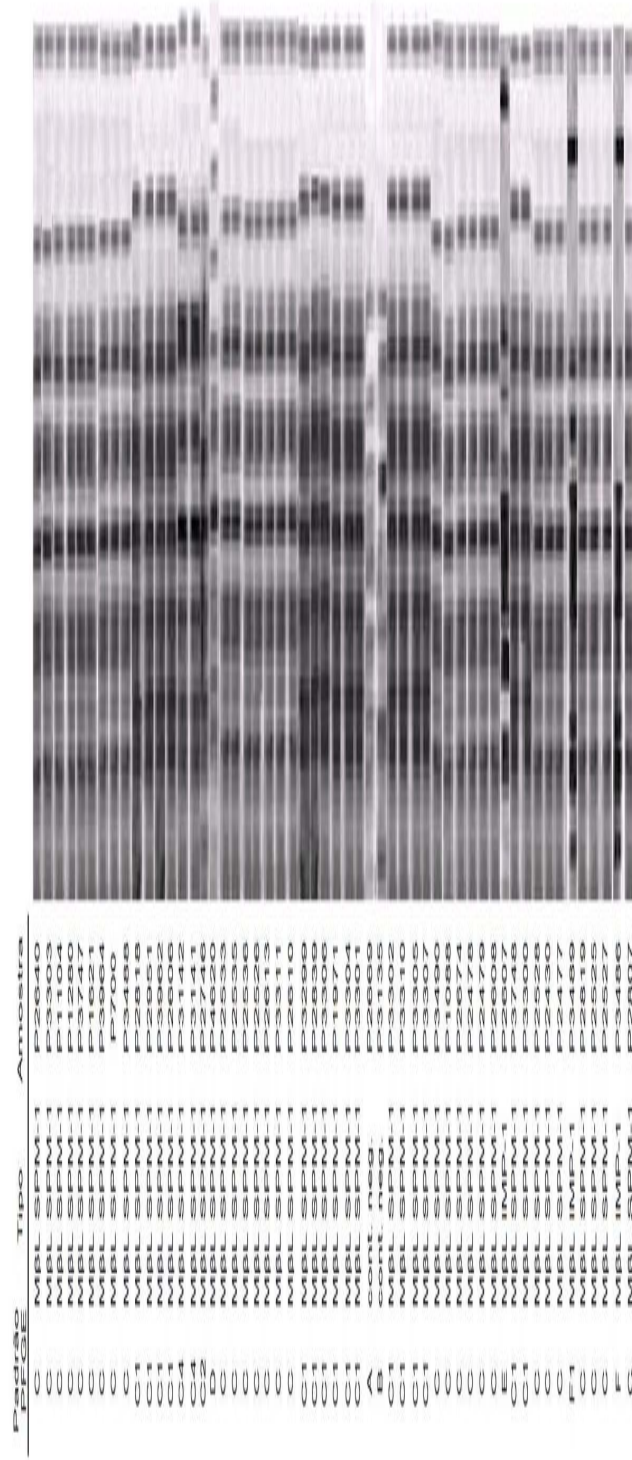


Figura 11 - Perfis de restrição com a enzima SpeI das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas neste estudo pela técnica de PFGE.

Após a realização da análise visual, os padrões gerados pelo PFGE foram submetidos à análise utilizando-se o programa computacional BioNumerics®. Foi realizada a análise de grupamentos por matriz de similaridade, com coeficiente de similaridade de Dice e tipo de dendrograma UPGMA, como demonstrada na Figura 12.

As amostras não produtoras de MβL mostraram 75% de similaridade entre elas. Entre as amostras produtoras de IMP-1, o perfil “F” e “F1” apresentaram similaridade genética maior que 94% e entre estes e o perfil “E” apenas 65% de semelhança genética.

Todas as amostras que receberam padrão de PFGE denominado “C” foram agrupadas em *cluster* principal, com similaridade superior a 95%. O subtipo “C1” foi agrupado em outro grande *cluster* com similaridade de aproximadamente 85% ao *cluster* formado pelo clone “C”. Os subtipos “C2” e “C4” apresentaram aproximadamente 84% de similaridade aos *clusters* principais formados pelo clone “C” e pelo subtipo “C1”.

O padrão “D” apresentou aproximadamente 77% de similaridade ao *cluster* principal “C” e, por isso, não pode ser incluído neste grupamento.

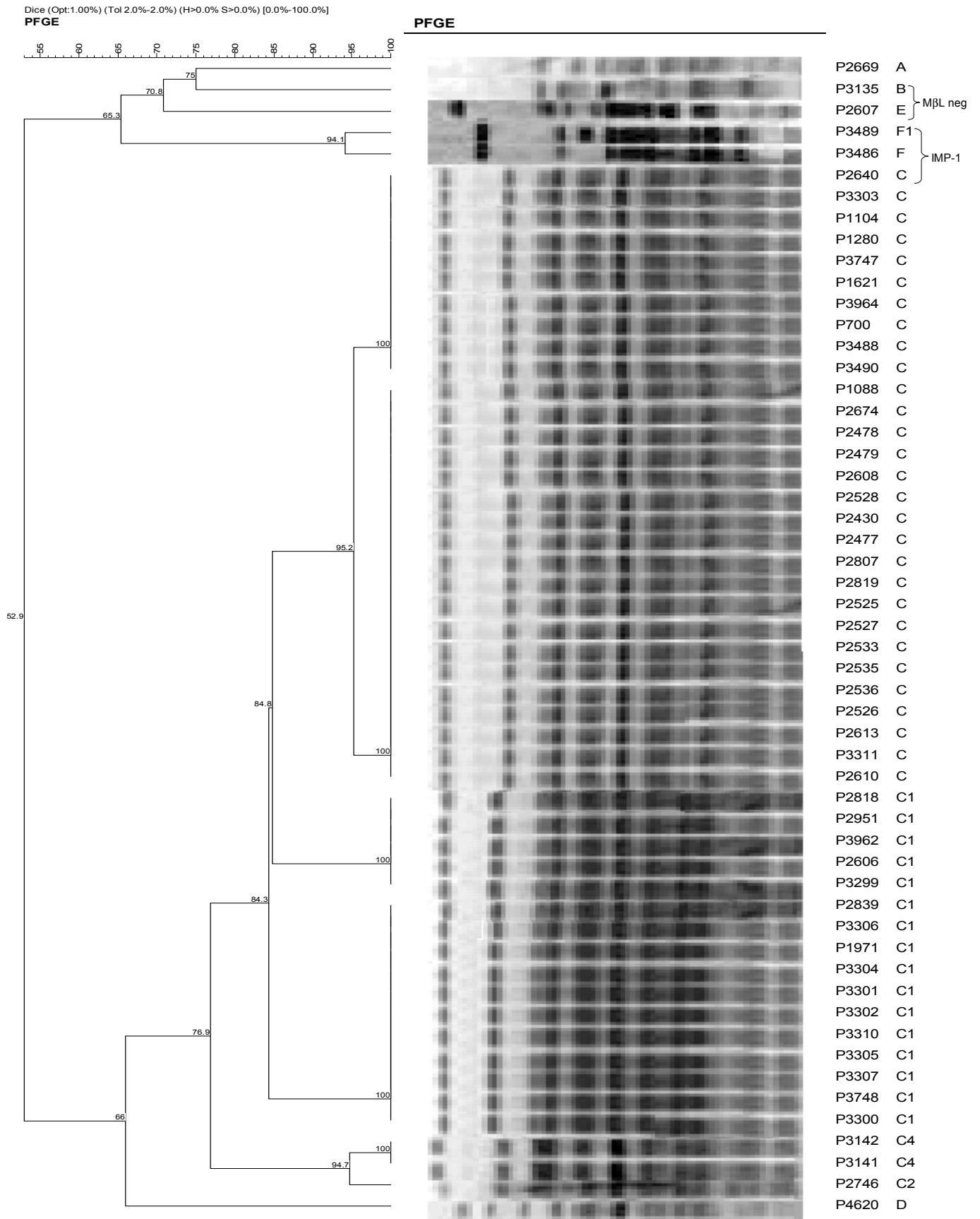


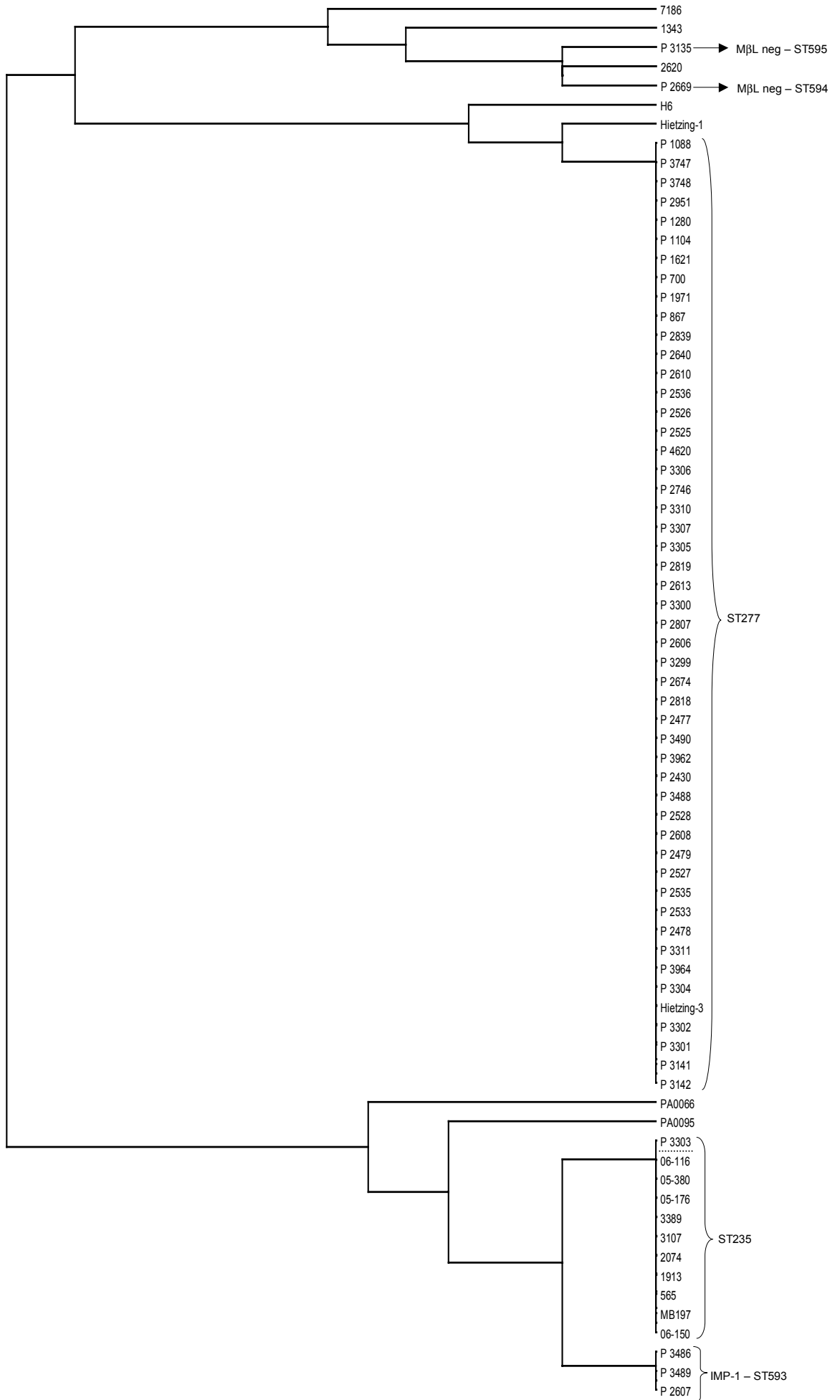
Figura 12 – Dendrograma dos perfis obtidos das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas pela técnica PFGE.

5.4 - Análise Filogenética

Com os resultados obtidos com a metodologia MLST foi possível inferir filogenia. Para tanto, utilizamos as amostras pertencentes ao clone endêmico brasileiro de *P. aeruginosa* produtor de M β L SPM-1 agrupado sob a ST277 e amostras com STs relacionadas a esta, que estavam depositadas no banco de dados mundial de MLST. Assim foi possível observar houve relação genética entre as amostras brasileiras e amostras de dois diferentes países: Canadá (isolado H6, ano de isolamento 1990) e Áustria (amostras Hietzing-3 e Hietzing-11, isoladas em 2006 e 2007, respectivamente).

Além disso, também foi incluído na análise o isolado P3303 (ST235), única amostra produtora de SPM-1 que não foi agrupada na ST277. Esta mesma ST235 encontrada em nossa amostra de Belo Horizonte, já foi descrita em dez isolados provenientes de outros três países europeus, Hungria, Rússia e Sérvia. A similaridade entre elas pode ser vista na figura 13.

RESULTADOS



0.1

Figura 13 - Relação filogenética entre amostras deste estudo e amostras com possível relação genética pertencentes ao banco de dados do MLST. Árvore cladística realizada com o método de máxima parcimônia e construída utilizando o método UPGMA.

De acordo com a Figura 13 podemos observar que são formados três principais grupamentos. O maior formado pelas amostras deste estudo produtoras de SPM-1 e as amostras da Áustria e do Canadá relacionadas à elas. Além disso, pode-se verificar a formação de um *cluster* médio, formado pelas amostras de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 e as amostras que apresentam relação genética de outras partes do mundo (Hungria, Rússia e Sérvia).

E por fim, é possível constatar que existe um pequeno grupamento formado pelas amostras não produtoras de MβL e mais três amostras de outros países (Bélgica, Polônia e Reino Unido) que mostram perfis alélicos similares em diferentes graus.

A Figura 14, a seguir, mostra uma árvore evolucionária construída com as STs encontradas nas amostras deste estudo (ST277, ST235, ST593, ST594 e ST595) além de ser composta por diversas STs de isolados de diferentes partes do mundo, como Canadá, Sérvia, Hungria, Rússia, Reino Unido, Polônia entre outros, com respectivas datas de isolamento entre 1990 a 2008. Para aumentar a confiabilidade da árvore gerada, foi realizada a análise de *bootstrap* com 1000 repetições, onde os valores gerados por essa análise encontram-se entre parênteses nas junções dos ramos gerados.

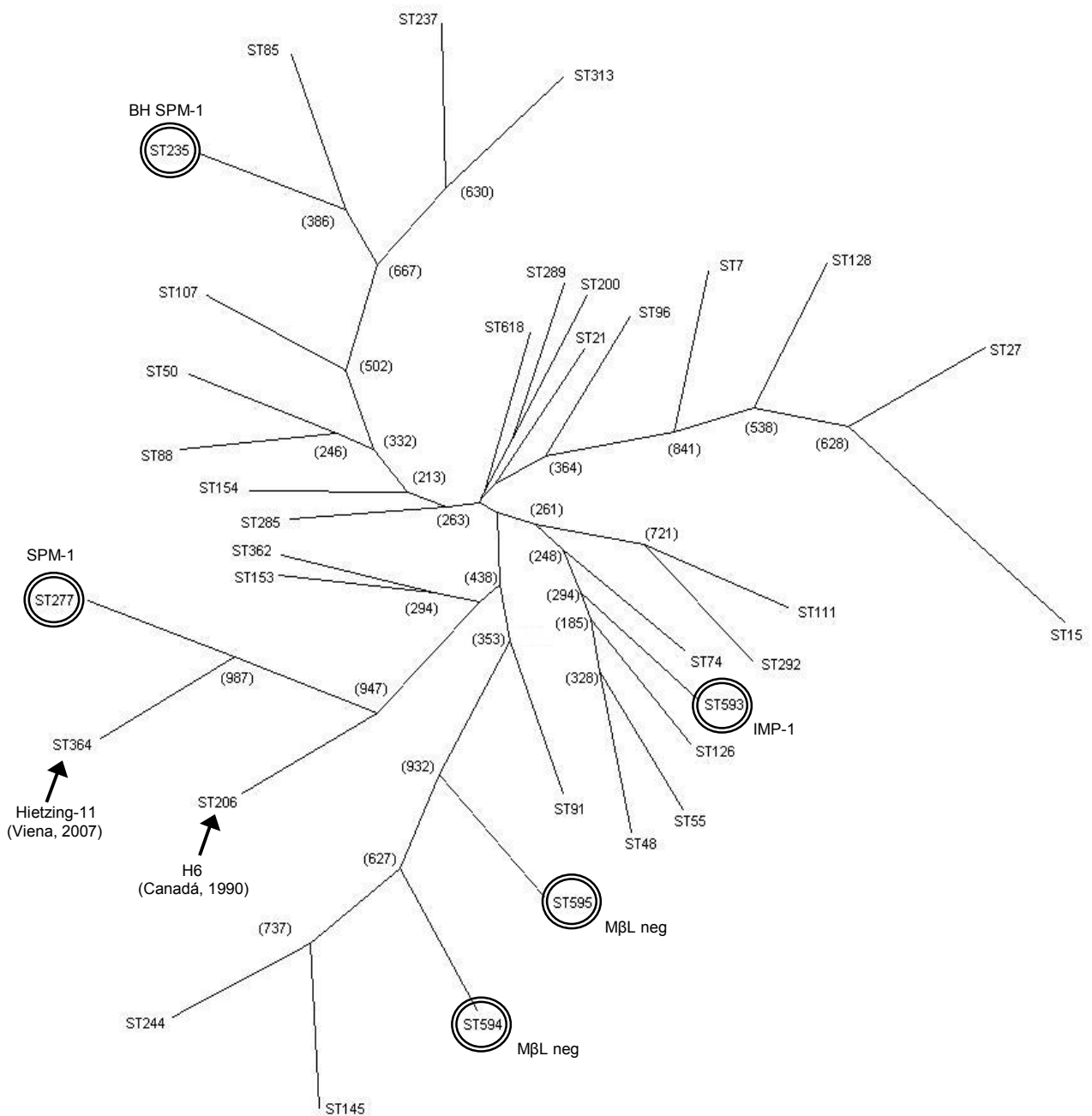


Figura 14 - Árvore evolucionária construída com o modelo de Jukes-Cantor (1969) e método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), com as STs encontradas neste estudo marcadas com duplo círculo e com representantes

de diversas partes do mundo. Os valores de *bootstrapping* estão entre parênteses.

Ao compararmos a árvore cladística mostrada na Figura 13 e a árvore evolucionária mostrada na Figura 14, podemos ver que a ST235 (amostra P3303, de Belo Horizonte) na árvore cladística aparece próxima às amostras produtoras de IMP (ST593), o que não ocorre na árvore evolucionária. Este fato pode ser explicado, pois a árvore cladística foi construída utilizando apenas amostras pertencentes ao nosso estudo e amostras relacionadas a elas presentes no banco de dados mundial do MLST. Já a árvore evolucionária foi realizada utilizando representantes de diversas STs de diferentes partes do mundo, tornando a comparação muito mais ampla. Assim, na árvore evolucionária a ST235 aparece mais próxima às Sts que contêm os perfis alélicos mais similares a ela.

5.5 - Comparação dos resultados obtidos com as três técnicas de tipagem molecular utilizadas neste estudo

A Tabela 8 mostra uma compilação dos resultados obtidos com as três técnicas utilizadas para estudar a relação genética das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1. É possível observar que para as amostras não produtoras de MβL as técnicas PFGE e MLST mostraram resultados concordantes e foram mais discriminatórias que a ribotipagem automatizada. As amostras produtoras de IMP-1 foram discriminadas apenas pela técnica PFGE, enquanto que as metodologias ribotipagem automatizada e MLST proveram resultados similares, classificando-as sob o mesmo padrão.

Dentre as amostras produtoras de SPM-1, o mesmo ribogrupo 72-3 e mesma ST277 foram observados em 28 amostras. Entre estas amostras, 14 foram agrupadas sob o perfil de PFGE "C", dez amostras foram agrupadas no subtipo de PFGE "C1", uma amostra foi classificada como subtipo "C2" e duas amostras receberam o subtipo "C4". Apenas uma entre as 28 amostras classificadas sob o ribogrupo 72-3 e ST277 foi classificada em um padrão de PFGE distinto, padrão "D". Estes resultados mostram que para estas amostras o PFGE mostrou poder discriminatório maior que as técnicas de ribotipagem automatizada e MLST.

Quinze amostras foram classificadas como pertencentes ao padrão de PFGE "C" e ST277, mas foram classificadas sob oito ribogrupos distintos. Outras cinco amostras receberam subtipo de PFGE "C1" e ST277, mas foram agrupadas em dois ribogrupos distintos (figura 15). Nesta figura podemos observar que os padrões de ribotipagem foram realmente distintos daqueles observados para o clone endêmico que também está ilustrado nesta figura. Para estas amostras podemos concluir que a Ribotipagem apresentou maior poder discriminatório que a técnica de PFGE.

Apenas uma amostra produtora de SPM-1, que foi classificada como pertencente ao clone predominante de ribotipagem e PFGE (72-3 e "C", respectivamente) recebeu a ST235, diferente da ST277 a qual é representante do clone endêmico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1.

Tabela 8 - Relação dos ribogrupos, perfis de PFGE e STs obtidos com as amostras de *P. aeruginosa* analisadas neste estudo.

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Característica da Amostra | Ribogrupo | PFGE | MLST |
|------------|---------------------|---------------------------|-----------|------|------|
| P 2669 | Belo Horizonte / MG | MβL negativo | 69-5 | A | 594 |
| P 3135 | São Luis / MA | MβL negativo | 69-5 | B | 595 |
| P 2607 | Fortaleza / CE | IMP-1 | 72-1 | E | 593 |
| P 3486 | João Pessoa / PB | IMP-1 | 72-1 | F | 593 |
| P 3489 | João Pessoa / PB | IMP-1 | 72-1 | F1 | 593 |
| P 1088 | São Paulo / SP | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 700 | São Paulo / SP | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 1104 | São Paulo / SP | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 1280 | São Paulo / SP | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 2839 | São Paulo / SP | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 2951 | São Paulo / SP | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 3747 | São Paulo / SP | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 3748 | São Paulo / SP | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 2430 | Santo André / SP | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 2606 | Santo André / SP | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 4620 | Rio de Janeiro / RJ | SPM-1 | 72-3 | D | 277 |
| P 3962 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 3964 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 3299 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 3301 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 3302 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 3303 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 72-3 | C | 235 |
| P 3306 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 3310 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |
| P 2674 | Londrina / PR | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 2746 | Londrina / PR | SPM-1 | 72-3 | C2 | 277 |
| P 2818 | Curitiba / PR | SPM-1 | 72-3 | C1 | 277 |

| Nº Amostra | Local do Isolamento | Característica da Amostra | Ribogruppo | PFGE | MLST |
|------------|---------------------|---------------------------|------------|------|------|
| P 2819 | Curitiba / PR | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 3141 | São Luis / MA | SPM-1 | 72-3 | C4 | 277 |
| P 3142 | São Luis / MA | SPM-1 | 72-3 | C4 | 277 |
| P 2608 | Fortaleza / CE | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 3488 | João Pessoa / PB | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 3490 | João Pessoa / PB | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 2807 | Brasília / DF | SPM-1 | 72-3 | C | 277 |
| P 2536 | Santo André / SP | SPM-1 | 78-4 | C | 277 |
| P 2533 | Santo André / SP | SPM-1 | 78-4 | C | 277 |
| P 2526 | Londrina / PR | SPM-1 | 78-4 | C | 277 |
| P 2528 | Londrina / PR | SPM-1 | 78-4 | C | 277 |
| P 2477 | Salvador / BA | SPM-1 | 78-4 | C | 277 |
| P 2610 | Fortaleza / CE | SPM-1 | 78-4 | C | 277 |
| P 2479 | Salvador / BA | SPM-1 | 78-4 | C | 277 |
| P 3300 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 105-7 | C1 | 277 |
| P 3305 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 105-7 | C1 | 277 |
| P 3307 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 105-7 | C1 | 277 |
| P 3311 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 105-7 | C | 277 |
| P 2535 | Santo André / SP | SPM-1 | 77-2 | C | 277 |
| P 2527 | Londrina / PR | SPM-1 | 77-2 | C | 277 |
| P 1971 | São Paulo / SP | SPM-1 | 97-7 | C1 | 277 |
| P 3304 | Belo Horizonte / MG | SPM-1 | 97-7 | C1 | 277 |
| P 2478 | Salvador / BA | SPM-1 | 71-5 | C | 277 |
| P 2525 | Londrina / PR | SPM-1 | 77-1 | C | 277 |
| P 2640 | Salvador / BA | SPM-1 | 79-8 | C | 277 |
| P 2613 | Fortaleza / CE | SPM-1 | 88-2 | C | 277 |
| P 1621 | São Paulo / SP | SPM-1 | 89-5 | C | 277 |
| P 867 | São Paulo / SP | SPM-1 | 103-4 | NV | 277 |

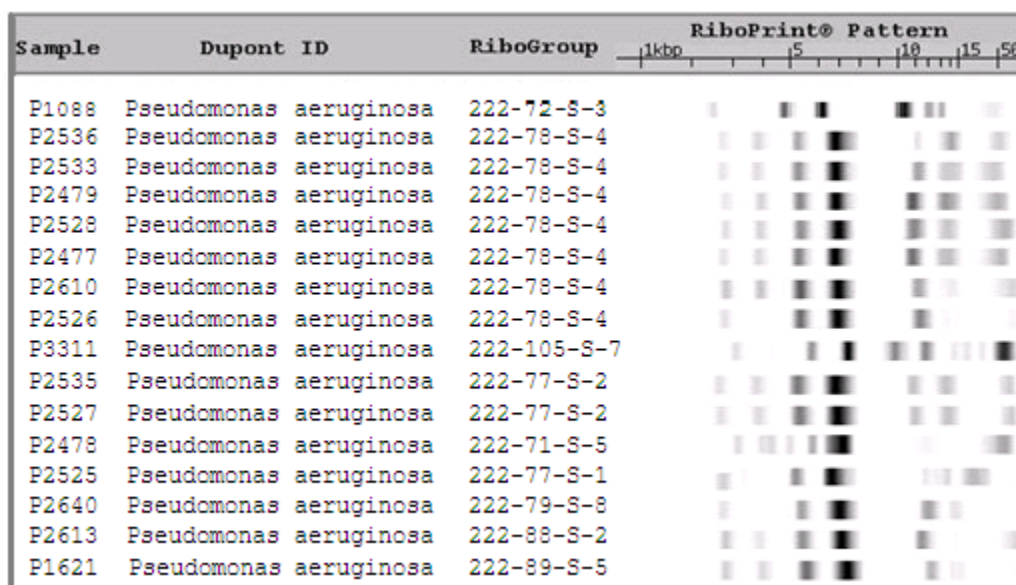


Figura 15. Distintos perfis de ribotipagem automatizada das amostras que apresentaram padrão de PFGE “C” e foram agrupadas sob a ST277.

5.6 - Cálculo do poder discriminatório e reprodutibilidade

O cálculo do poder discriminatório foi realizado utilizando a fórmula de Hunter para todas as amostras estudadas. Os resultados estão listados na Tabela 10. A reprodutibilidade das técnicas também foi determinada.

Tabela 9 – Poder discriminatório e reprodutibilidade das metodologias testadas para tipagem molecular das amostras de *P. aeruginosa*.

| Técnica | Reprodutibilidade | Poder Discriminatório |
|-------------|-------------------|-----------------------|
| PFGE | 100% | 0,61 |
| Ribotipagem | 100% | 0,65 |
| MLST | 100% | 0,18 |

6 - DISCUSSÃO

Determinar um sistema eficiente de tipagem molecular é essencial para médicos epidemiologistas instituírem medidas adequadas para o controle de infecções hospitalares. Métodos de tipagem molecular têm sido utilizados principalmente para elucidar duas questões primordiais: (i) Isolados recuperados em um determinado episódio são derivados de um mesmo clone (cepas idênticas) ou distintas? e, (ii) Se cepas patogênicas isoladas de uma determinada região geográfica estão relacionadas a outras cepas isoladas em diferentes partes do mundo. Estas duas perguntas são, geralmente, realizadas em estudos de curta-duração ou epidemiologia local e, em estudos de longo-prazo ou epidemiologia global, respectivamente (Maiden *et al.*, 1998).

A necessidade de avaliar a relação genética entre isolados clínicos de uma mesma espécie é muito importante na investigação de surtos, principalmente quando o surto se deve a um microrganismo resistente aos antimicrobianos de importância clínica. Desta maneira, a tipagem molecular pode ajudar na elucidação da fonte de origem e na compreensão da disseminação destes patógenos, fazendo com que medidas de prevenção possam ser estabelecidas e o surto seja contido.

Diversos novos métodos para tipagem molecular de microrganismos têm sido desenvolvidos (Hryniewicz *et al.*, 2008; Nowak-Zaleska *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Apesar disso, a PFGE ainda permanece como o padrão-ouro na tipagem molecular para a maioria dos microrganismos, inclusive *P. aeruginosa*. Recentemente, o desenvolvimento e o extenso uso de métodos de tipagem molecular baseados na análise de seqüências genômicas possibilitaram uma melhor compreensão da história evolutiva, da dinâmica das

populações, e dos padrões de disseminação dos microrganismos (Feil *et al.*, 2003; Miragaia *et al.*, 2008).

Durante a história evolutiva, isolados dentro de uma mesma espécie ganharam variedade genética de diversas formas. Por exemplo, por meio do acúmulo de mutações simples, recombinações, aquisições ou deleções trazidas por elementos genéticos móveis, resposta às pressões ambientais, o que deu origem a uma extensa diversidade fenotípica e genotípica (Recchia & Hall, 1997). Tais eventos variam de espécie para espécie e os métodos de tipagem precisam ser hábeis para detectar tais variações, e ao mesmo tempo, robustos o suficiente para não serem influenciados por estes eventos e fornecerem resultados errôneos de falsa relação genética (Feil *et al.*, 2003).

Em 2005, Menezes e colaboradores realizaram um projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), onde participaram 25 centros médicos brasileiros, com 85 amostras coletadas no período de janeiro de 2001 a março de 2004. Nesta ocasião as amostras foram submetidas a testes de sensibilidade aos antimicrobianos, ao teste fenotípico para produção de enzima M β L, e à detecção molecular do gene de resistência *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1}. Estas cepas também foram caracterizadas genotipicamente pelas técnicas de tipagem molecular, ribotipagem automatizada e PFGE. Este estudo concluiu que havia um clone de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 predominante, o qual se encontrava disseminado em diversas regiões geográficas brasileiras (Gales *et al.*, 2003). No entanto, dentre as amostras analisadas, havia 15 amostras que foram agrupadas sob o mesmo perfil de PFGE, mas que apresentaram ribogrupos diferentes. O contrário também ocorreu, onde amostras apresentando

ribogrupos idênticos obtiveram perfis de PFGE diferentes, o que era esperado, já que a técnica de PFGE possui maior poder discriminatório que a ribotipagem automatizada (Silbert *et al.*, 2004).

Como já é conhecido, as técnicas de ribotipagem automatizada e PFGE não são capazes de determinar se as amostras estudadas possuíam um ancestral comum. Assim, para avaliar a relação ancestral do clone de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 foi necessária a utilização de uma técnica que se mostrasse capaz de inferir filogenia; desta maneira, a metodologia da MLST foi selecionada. Esta técnica de tipagem molecular está se tornando mais popular pela facilidade de análise dos dados, comparação dos resultados inter- e intra-laboratorial e, também, pela maior disponibilidade de termocicladores e seqüenciadores nos laboratórios de pesquisa e/ou rotina (Fakhr, Nolan & Logue, 2005; Hallin *et al.*, 2007; Kotetishvili *et al.*, 2003; Noller *et al.*, 2003; Revazishvili *et al.*, 2004). Para atingir este objetivo foi necessária padronização da técnica de MLST em nosso laboratório.

Estudos que avaliem a técnica de MLST para a tipagem de amostras de *P. aeruginosa* são escassos na literatura. Destes, o primeiro descreve o desenvolvimento da metodologia MLST para tipagem de amostras de *P. aeruginosa* (Curran *et al.*, 2004). Outros dois estudos descreveram a utilização da MLST em estudos epidemiológicos (Giske *et al.*, 2006; Empel *et al.*, 2007). Recentemente, Johnson e colaboradores (2007) reportaram a comparação da técnica de MLST com a de PFGE para tipagem de amostras de *P. aeruginosa*.

No processo de implantação da metodologia de MLST em nosso laboratório, foram realizadas algumas adaptações ao protocolo desenvolvido por Curran e colaboradores (2004) tais como: (i) redução do volume final da

reação de PCR de 50 μ L para 25 μ L; (ii) diluição dos iniciadores de uma concentração de 20 μ mol para 10 μ mol e (iii) alteração do volume de DNA alvo de 10 ng para 0,5 ng . Com essas alterações foi possível padronizar a metodologia e ainda reduzir a quantidade de “master mix” e iniciadores utilizados. Dificuldades para a reprodução da técnica de MLST descrita por Curran e colaboradores (2004) também foram demonstradas por Giske e colaboradores (2006). Estes autores relataram ser necessária a adição de dimetil sulfóxido puro a uma concentração de 5 μ L para 100 μ L de “master mix”, além da necessidade de aumentar a temperatura de anelamento de 55°C para 58°C. Porém, estas alterações não foram necessárias no nosso estudo.

A técnica MLST é padronizada para a tipagem molecular de várias espécies bacterianas (Enright & Spratt, 1998; Enright *et al.*, 2000; Homan *et al.*, 2002; Meats *et al.*, 2003). É possível verificar que para a tipagem da grande maioria dos microrganismos pela técnica de MLST, os mesmos pares de iniciadores utilizados na reação de amplificação, são também utilizados na reação de seqüenciamento. Baseada nesta observação, neste estudo foi realizada a modificação da técnica de MLST descrita por Curran e colaboradores (2004). Ela incluía além da menor concentração de iniciadores e do volume final da técnica de PCR, a utilização dos mesmos iniciadores nas etapas de amplificação e seqüenciamento dos sete genes estruturais de *P. aeruginosa* selecionados para a técnica de MLST. A metodologia de MLST modificada apresentou resultados idênticos àqueles da técnica convencional e foram reprodutíveis. Além disto, houve uma redução dos custos com a compra dos iniciadores em 50% e redução do tempo para o início da realização da técnica, já que um número menor de iniciadores necessitam ser diluídos e,

posteriormente, validados. Desta maneira, a técnica modificada de MLST será introduzida na rotina do setor de tipagem molecular do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica.

Ao realizar a análise dos perfis alélicos obtidos com o MLST das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, verificou-se a existência de seqüências alélicas idênticas (39-5-9-11-27-5-2), o que levou estas amostras a receberem uma mesma ST (tipo de seqüência) denominada ST277. Este fato é interessante, pois apenas as amostras produtoras de SPM-1 foram agrupadas na ST277. Das 50 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, 19 e 21 amostras foram classificadas como distintas por técnicas que analisam perfis de bandas, PFGE e a ribotipagem, respectivamente. No entanto, quando analisados os *housekeeping genes*, que são altamente conservados durante a história evolutiva, estes genes mostraram-se idênticos, corroborando para a hipótese da existência da relação ancestral entre estas amostras de *P. aeruginosa*. Tal fato sugere que as amostras produtoras de SPM-1 são, provavelmente, derivadas de um mesmo clone que sofreu variação genética por meio do acúmulo de mutações ao longo do tempo, e não da disseminação de um plasmídeo que continha o gene *spm-1* para amostras de *P. aeruginosa* que possuíam distintos conteúdos genéticos.

Ao compararmos os resultados obtidos com a técnica de MLST com àqueles de amostras depositadas no banco de dados de *P. aeruginosa*, verificamos que a amostra denominada Hietzing-3, isolada em uma amostra de escarro de um paciente em 2007, em Viena, na Áustria, apresenta perfil alélico idêntico ao do clone endêmico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 (ST277) encontrado em nosso estudo. Este dado é interessante, pois sugere que este

clone não está restrito ao território brasileiro. Foi também observado que outra amostra também proveniente de Viena, e isolada no mesmo ano e sítio corpóreo, denominada Hietzing-11 (ST364), apresentou apenas uma diferença no alelo *nuoD* (variante em um único locus). Na amostra Hietzing-11, ocorreu uma única substituição do nucleotídeo C-T na posição 186. Por este motivo, esta amostra pode estar relacionada ancestralmente com a ST277.

A ST 277 também pode ser relacionada à ST206, exibida pela amostra H6. A cepa H6 foi isolada em uma amostra de escarro de um paciente canadense, em 1990. Entre a ST277 e a ST 206, há diferença em apenas dois alelos (variante em dois loci), alelo *guaA* (substituições de C-T, T-C, C-T e G-A na posição dos nucleotídeos: 49, 198, 219, e 3545, respectivamente) e alelo *nuoD*, onde houve a substituição G-A na posição 63.

Infelizmente, não temos informações suficientes que nos permitam estabelecer se houve ou há relação epidemiológica das amostras vienenses e/ou canadense com àquelas isoladas em território brasileiro. Além disto, informações microbiológicas, tais como, o perfil de sensibilidade e a caracterização dos genes de resistência, referentes a estas amostras são também desconhecidas.

Baseado nos resultados de MLST foi possível inferir filogenia e assim desenvolver uma árvore evolucionária. Para a análise da confiabilidade da árvore, utiliza-se comumente o método denominado *bootstrap* (Davison & Hinkley, 1997), onde uma análise matemática genérica é realizada para estimar a variabilidade estatística de um evento ocorrer quando o número de amostras avaliado é reduzido. Sucintamente, o método consiste em considerar o número máximo provável de vezes de um evento ocorrer quando repetido 100 vezes ou

1000 vezes, por exemplo. Quanto mais próximo o valor obtido for do número selecionado, maior é a probabilidade de o evento ter realmente ocorrido. Na árvore gerada, verificamos que a ST277, na qual estão incluídas as cepas do clone endêmico brasileiro produtor de SPM-1, e a cepa Hietzing-3, está ligada por um nó interno com alto valor de *bootstrap* (987) à ST364 (Hietzing-11). Este nó interno possui ligação com a ST206 (cepa H6) também com alto valor de *bootstrap* (947). De acordo com estes resultados, podemos considerar que a cepa Hietzing-3 é idêntica ao clone endêmico brasileiro, que o isolado Hietzing-11 possui um ancestral comum mais recente e que a cepa H6 possui um ancestral mais distante.

Ainda com relação às amostras produtoras de SPM-1, observou-se a existência de uma única amostra (P3303) de Belo Horizonte que não foi classificada na ST do clone endêmico, e que havia sido incluída no maior agrupamento clonal de PFGE (“C”) e de ribotipagem (72-3) neste estudo e no estudo anterior realizado por Menezes (2004). Esta amostra foi classificada como ST235 e não apresentou relação com o perfil clonal predominante. Ao compararmos este resultado no banco de dados MLST, observou-se que existem outras 11 amostras de *P. aeruginosa* entre o período de 2002 e 2005, depositadas neste banco que foram agrupadas sob esta ST. As cepas que apresentaram esta ST foram isoladas em países da Europa, como, Rússia, Hungria e Sérvia.

Empel e colaboradores (2007) reportaram que três isolados de *P. aeruginosa* produtores de OXA-10 pertenciam à ST235. Estes isolados apresentaram grande similaridade ao perfil de PFGE de amostras isoladas na Turquia, em 1992, produtoras de PER-1, OXA-2, OXA-17 e OXA-74, sugerindo

a possível relação genética entre estas amostras (Danel *et al.*, 1999; Danel *et al.*, 1995). Desta forma seria interessante, avaliar se a amostra de *P. aeruginosa* P3303 possui outros mecanismos de resistência, tais como, a produção de ESBL, e se foi isolada de um paciente que possua alguma relação epidemiológica com estas amostras isoladas na Turquia.

Em nosso trabalho estudamos um grande número de amostras de *P. aeruginosa* produtora de M β L SPM-1, representantes do clone endêmico circulante em diversas regiões brasileiras (Pellegrino *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2007). O mesmo formato de estudo foi utilizado por Giske e colaboradores (2006), no qual representantes de clones circulantes de *P. aeruginosa* produtores de M β L VIM-1, originários de diversos países europeus, foram estudados utilizando diversas metodologias, incluindo PFGE e MLST. A partir dos resultados, estes autores conseguiram estabelecer a relação entre cepas de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-1 circulantes no norte e no oeste europeu e, propuseram correlacioná-las a um clone ancestral comum proveniente de países do Mediterrâneo. Entretanto, a análise também mostrou que havia clones independentes em regiões com baixa prevalência de VIM-1, que estes provavelmente possuíam um ancestral distinto do mediterrânico.

Em nosso estudo, as três amostras produtoras de M β L IMP-1, demonstraram perfis alélicos idênticos e não existentes previamente no banco de dados mundial de MLST. Para estas amostras foi criada uma nova ST denominada 593. As amostras produtoras de IMP-1 foram isoladas de capitais nordestinas brasileiras, João Pessoa e Fortaleza, que são relativamente próximas, e foram agrupadas sob o mesmo ribogruppo (72-1). Porém, foram classificadas em dois padrões de PFGE distintos (“F” e “E”). As amostras

isoladas em João Pessoa possuíam subtipos semelhantes de PFGE, “F” e “F1”. Portanto, nossos resultados sugerem que as amostras pertencentes a ST 593 podem possuir um ancestral comum que esteja circulando e sofrendo variação genética localmente.

A única diferença entre a ST593 e a ST235, isolada em Belo Horizonte de uma amostra produtora de SPM-1, é a alteração alélica do gene *aroE* 11 para o alelo 89. Esta diferença é decorrente da alteração de 11 nucleotídeos. A ST593 está relacionada a outras 12 amostras classificadas sob a ST235. Estas amostras foram isoladas na Rússia, na Hungria e na Sérvia. A ST593 também está relacionada à ST622 observada em uma amostra, recentemente, isolada na Alemanha. Atualmente acredita-se que a disseminação clonal de isolados produtores de ESβLs ou MβLs esteja contribuindo para a disseminação global destes genes (Bennett, 2008; Libisch *et al.*, 2008).

As amostras que foram utilizadas como controles negativos em nosso estudo apresentaram perfis alélicos distintos entre elas e inexistentes no banco de dados mundial. Portanto, duas novas STs, ST594 e ST595, foram descritas para agrupar as amostras P2669 e P3135, respectivamente, demonstrando que estas amostras possuíam ancestrais não relacionados. Porém, estas amostras foram agrupadas sob o mesmo ribogrupos (69-5), mas apresentaram perfis de PFGE distintos (“A” e “B”). Este é um exemplo que ilustra o menor poder discriminatório da ribotipagem em relação às técnicas de PFGE e MLST.

Ao analisarmos os resultados obtidos com as três técnicas, verificamos que amostras pertencentes ao clone endêmico de PFGE, perfil “C” (30 amostras) e seus subtipos, C1 (15 amostras), C2 (1 amostra) apresentavam nove ribogrupos distintos pela ribotipagem. Na análise realizada por Menezes

em 2004, estas mesmas amostras foram relacionadas a 19 diferentes ribogrupos. Dado que o banco de dados do RiboPrinter[®] é dinâmico, ou seja, quando o banco de dados é atualizado com a inserção de novos perfis pode ocorrer um rearranjo dos ribogrupos, e ao realizarmos uma nova análise poderá haver mudança nos ribogrupos. Neste estudo, observamos que houve uma diminuição na diversidade de ribogrupos entre as amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1. Este fenômeno é comumente observado visto que, as relações estatísticas de cada amostra podem mudar toda vez que novas amostras com diferentes níveis de similaridade são adicionadas ao banco de dados do RiboPrinter[®]. Com relação ao subtipo de PFGE “C1”, a mesma diminuição no número de ribogrupos foi observada, passando de oito ribogrupos observados por Menezes (2004) para apenas três ribogrupos. O perfil de PFGE “C2”, observado em apenas uma amostra, não sofreu alteração. Já o perfil de PFGE “C4”, anteriormente incluído em dois ribogrupos distintos, na nova análise foi incluído no mesmo ribogrupo do clone endêmico, 72-3.

Em nosso estudo verificou-se que o PFGE apresentou poder discriminatório maior que o da MLST (0,61 contra 0,18, respectivamente); porém, ligeiramente menor que a ribotipagem (0.65). O baixo poder discriminatório gerado pela análise realizada em nosso estudo pode ser explicado devido à utilização de cepas endêmicas para a realização do cálculo. Foi possível verificar com os resultados obtidos que a técnica de ribotipagem automatizada apresentou poder discriminatório discretamente maior que a técnica PFGE. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0.813$).

Entretanto, a MLST apresenta a vantagem de fornecer informações sobre a relação ancestral com outros isolados. Dentre as 55 amostras de *P. aeruginosa* estudadas, 45 foram enquadradas pelo método de PFGE em um mesmo perfil clonal com três subtipos (“C”, “C1”, “C2” e “C4”). A ribotipagem agrupou estas 45 amostras em dez ribogrupos e o MLST mostrou mesmo perfil alélico (ST277) para todas elas, exceto para a amostra P3303 (ST235).

Estes resultados sugerem que o PFGE é mais aplicável a estudos locais, de surtos e/ou de curto-prazo e a MLST para determinar relações genéticas ancestrais e relacionar a estabilidade clonal entre isolados, sendo mais aplicável para estudos de longo prazo. O maior poder discriminatório do PFGE pode ser explicado pelo fato desta técnica ser hábil para detectar as alterações no “relógio molecular”, que são genes que acumulam mutações ocorridas durante a evolução e estão dispostos ao longo do cromossomo, visto que esta técnica analisa o tamanho e a quantidade de fragmentos gerados pela restrição do DNA cromossomal (Zuckerkindl & Pauling, 1962). Tais fragmentos podem possuir inserções, deleções ou mutações que não estão localizadas nos sítios específicos de restrição e que, portanto não são identificados. Já a MLST determina as raras variações genéticas que ocorrem dentro dos genes estruturais altamente conservados ao longo da evolução (Kotetishvili *et al.*, 2003). Além disso, a MLST apresenta alta reprodutibilidade entre laboratórios, indicando que os resultados obtidos com esta técnica são mais fáceis de serem transferidos e comparados, que os resultados obtidos por PFGE.

Johnson e colaboradores (2007), em um estudo semelhante ao nosso, compararam as técnicas de PFGE e MLST para *P. aeruginosa* usando 90 isolados. Ao avaliar os resultados, utilizando análise por valor Simpson’s D,

determinaram que o PFGE obteve maior poder discriminatório que a MLST (valor D= 0.999 e 0.975, respectivamente). Entretanto, estudos para outros microrganismos (*Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*) mostram que a MLST apresentou poder discriminatório maior que o PFGE (Kotetishvili *et al.*, 2003; Nemoy *et al.*, 2005).

A inexistência de publicações científicas utilizando a técnica de MLST para a tipagem molecular de *P. aeruginosa* no Brasil e na América Latina torna este trabalho inovador em nosso meio, e permitirá a realização de estudos futuros que, por exemplo, avaliem o comportamento futuro do clone endêmico brasileiro de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1. Além disso, este trabalho é pioneiro na inserção de dados de amostras brasileiras no banco de dados de MLST para tipagem de amostras brasileiras de *P. aeruginosa*.

7 - CONCLUSÕES

1. A metodologia MLST para *P. aeruginosa*, conforme descrita por Curran *et al.* (2004) bem como a técnica de MLST modificada foram padronizadas;
2. Das 50 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 avaliadas neste estudo, 49 (98%) foram agrupadas sob a ST277, sugerindo que a sua origem pode ser relacionada a um ancestral comum;
3. Foi verificado que o PFGE e a ribotipagem automatizada apresentaram poder discriminatório semelhantes, e que a técnica MLST apresentou poder discriminatório menor que estas técnicas. Todas as três técnicas estudadas, além da metodologia modificada, apresentaram 100% de reprodutibilidade.
4. Nossos resultados sugerem que a variação genética encontrada entre as cepas produtoras de SPM-1 pode ser decorrente da variação genética do próprio clone ao longo do tempo, mas não da aquisição do plasmídeo que carrega o gene *spm-1* por *P. aeruginosa* com diferentes contextos genéticos.
5. As amostras de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1, incluídas neste estudo como controles, também originaram-se de um ancestral comum.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aber RC & Mackel DC. Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. ***Am J Med.*** Apr;70(4):899-905. 1981.

Agrawal P, Ghosh AN, Kumar S, Basu B, Kapila K. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital. ***Indian J Pathol Microbiol.*** Jan-Mar;51(1):139-42. 2008.

Aires JR, Köhler T, Nikaido H, Plésiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. ***Antimicrob Agents Chemother.*** Nov;43(11):2624-8. 1999.

Ambler RP. The structure of β -lactamases. ***Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*** May 16;289(1036):321-31. 1980.

Amorim, DS. Elementos Básicos de Sistemática Filogenética. ***Holos Editora & Soc Bras Entomol.*** Ribeirão Preto. 1997.

Andrei A & Zervos MJ. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. ***Arch Pathol Lab Med.*** May;130(5):662-8. 2006.

Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Ito H, Kato N, Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *blaIMP*. ***Antimicrob Agents Chemother.*** 39:1612–1615. 1995.

Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 190–208. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Manual of clinical microbiology, 6th ed. ***ASM Press***, Washington, D.C. 1995.

Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. **Clin Microbiol.** 6:57-68. Review. 1993.

Bou R, Ramos P, Aguilar A, Perpiñán J. Epidemiological surveillance of nosocomial infection by a multidisciplinary infection control team. **Enferm Infec Microbiol Clin.** Apr;26(4):257-8. 2008.

Bratu S, Landman D, Gupta J, Quale J. Role of AmpD, OprF and penicillin-binding proteins in β -lactam resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol.** Jun;56(6):809-14. 2007.

Brooks DR & Wiley EO. Theories and methods in different approaches to phylogenetic systematics. **Cladistics.** 1:1-11. 1985.

Bruce, JL. Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. **Food Technology.** 50:77-81. 1996.

Burke V, Robinson JO, Richardson CJ, Bundell CS. Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Pathology.** Apr;23(2):145-8. 1991.

Carle GF, Frank M & Olson MV. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science,** 232 (4746):658 1986.

Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrob Agents Chemother.** Jun;43(6):1379-82. 1999.

Castanheira M. Caracterização de genes que codificam β -lactamases mediados por integrons de classe 1 em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. **Tese de Mestrado**, UNIFESP-EPM. 2005.

Cavalli-Sforza LL, Edwards AW. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. **Am J Hum Genet**. May;19(3,1):233-57.1967.

Chang N & Chui L. A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. 31:275–279. 1998.

Chant C, Dos Santos CC, Saccucci P, Smith OM, Marshall JC, Friedrich JO. Discordance between perception and treatment practices associated with intensive care unit-acquired bacteriuria and funguria: a Canadian physician survey. **Crit Care Med**. Apr;36(4):1158-67. 2008.

Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**. Apr;165(7):867-903. Review. 2002.

Chu G, Vollrath D & Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. **Science**. 234:1582-5, 1986.

Chuanchien R, Narasaki CT & Schweizer HP. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. **J Bacteriol**. Sep;184(18):5036-44. 2002.

Cockerill FR 3rd & Smith TF. Response of the clinical microbiology laboratory to emerging (new) and reemerging infectious diseases. **J Clin Microbiol**. Jun;42(6):2359-65. Review. 2004.

Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. **J Hosp Infect.** Jan;68(1):73-82. 2008.

Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol.** Dec;42(12):5644-9. 2004.

D'Agata EM, Gerrits MM, Tang YW, Samore M, Kusters JG. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment-length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 22:550-4. 2001.

Daly JA, Boshard R & Matsen JM. Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol.** Jun;19(6):742-3. 1984.

Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 43(6):1362-6. 1999.

Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 39(8):1881-4. 1995.

Davison AC & Hinkley DV. Bootstrap Methods and Their Application. **Cambridge University Press.** Cambridge, UK. 1997.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect.** 13(3):222-35. Review. 2007.

Dice LR. Measures of the amount of ecological association between species. ***Ecology***, 26(3):297-307. 1945.

Diekema DJ, Dodgson KL, Sigurdardottir B, Pfaller MA. Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: an unmet clinical need. ***J. Clin. Microbiol.*** 42:2879–2883. 2004.

Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Wang A, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Xu X, Wang L, Shen X. The prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. ***Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*** May 1. 2008.

Douglas MW, Mulholland K, Denyer V, Gottlieb T. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burns unit - an infection control study. ***Burns.*** Mar;27(2):131-5. 2001.

Eck RV & Dayhoff MO. Evolution of the Structure of Ferredoxin Based on Living Relics of Primitive Amino Acid Sequences. ***Science.*** Apr 15;152(3720):363-366. 1966.

Eckmanns T, Oppert M, Martin M, Amorosa R, Zuschneid I, Frei U, Rüden H, Weist K. An outbreak of hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated bottled water in intensive care units. ***Clin Microbiol Infect.*** May;14(5):454-8. 2008.

Emori TG & Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. ***Clin. Microbiol.*** 6:428–442. Review. 1993.

Empel J, Filczak K, Mrówka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-

spectrum β -lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. **J Clin Microbiol.** Sep;45(9):2829-34. 2007.

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** Mar;38(3):1008-15. 2000.

Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiology.** Nov;144 (Pt 11):3049-60. 1998.

Enright MC & Spratt BG. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol.** 7(12):482-7. Review. 1999.

Fakhr MK, Nolan LK & Logue CM. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J Clin Microbiol.** 43(5):2215-9. 2005.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol.** Mar;186(5):1518-30. 2004.

Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP. How clonal is *Staphylococcus aureus*? **J Bacteriol.** 185(11):3307-16. 2003.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **J Mol Evol.**;17(6):368-76. 1981.

Finney, M. Pulsed-field gel electrophoresis, p. 2.5.9–2.5.17. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K.

Struhl. ***Current protocols in molecular biology***, vol. 1. Greene-Wiley, New York, N.Y. 1993.

Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. 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***. May 15;32 Suppl 2:S146-55. 2001.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. ***J Antimicrob Chemother***. Oct;52(4):699-702. Epub 2003 Sep 1. 2003.

Gales AC, Jones RN, Pfaller MA, Gordon KA, Sader HS. Two-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial resistance patterns among organisms isolated from skin and soft tissue infections in Latin American hospitals: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-98. SENTRY Study Group. ***Int. J. Infect Dis.***, 4: 75-84, 2000.

Garau J & Gomez L. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. ***Curr Opin Infect Dis***. Apr;16(2):135-43.Review. 2003.

Gautom RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for *E. coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in one day. ***J. Clin. Microbiol.*** 35:2977–2980. 1997.

Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. ***Clin Infect Dis***. Sep 15;41(6):848-54. Epub 2005 Aug 16. 2005.

Gilbert DN, Kohlhepp SJ, Slama KA, Grunkemeier G, Lewis G, Dworkin RJ, Slaughter SE, Leggett JE. Phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus*, selected *Enterobacteriaceae*, and *Pseudomonas aeruginosa* after single and multiple in vitro exposures to ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin. ***Antimicrob Agents Chemother.*** Mar;45(3):883-92. 2001.

Gillardi GL. *Pseudomonas* and related genera. In: Ballows A. The Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington, DC, **ASM.** p.429-41. 1991.

Giske CG, Buarø L, Sundsfjord A, Wretling B. Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. ***Microb Drug Resist.*** Mar;14(1):23-30. 2008.

Giske CG, Libisch B, Colinon C, Scoulica E, Pagani L, Füzi M, Kronvall G, Rossolini GM. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. ***J Clin Microbiol.*** Dec;44(12):4309-15. 2006.

Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. ***Infect Control Hosp Epidemiol.*** Oct;14(10):595-600. Review. 1993.

Goering RV. The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. ***Rev. Med. Microbiol.*** 11:145-52. 2000.

Goossens H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group. ***Clin Microbiol Infect.*** Sep;9(9):980-3. 2003.

Gornick W, Lang D, Glenn L, Dhar V, Vogel K. Investigation of nosocomial *Staphylococcus aureus* sepsis in a neonatal intensive care unit: Absence of clonal spread. **Am J Infec Cont.** June, 33(5):109. 2005.

Grimont F & Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, 137B:165-75, 1986.

Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 528-34, 1995.

Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Expert Opin Investig Drugs.** Feb;17(2):131-43. Review. 2008.

Hacek DM, Suriano T, Noskin GA, Kruszynski J, Reisberg B, Peterson LR. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. **Am. J. Clin. Pathol.** 111:647–654. 1999.

Haley RW, White JW, Culver DH, Hughes JM. The financial incentive for hospitals to prevent nosocomial infections under the prospective payment system. **JAMA** 257:1611-1614. 1987.

Hallin M, Denis O, Deplano A, De Mendonça R, De Ryck R, Rottiers S, Struelens MJ. Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey. **J Antimicrob Chemother.** 59(3):465-72. Epub 2007 Feb 8. 2007.

Hamal P. Molecular genetic methods in medical mycology: current state and perspectives. **Klin Mikrobiol Infekc Lek.** 13(4):136-44. Review. 2007.

Hanage WP, Kaijalainen TH, Syrjänen RK, Auranen K, Leinonen M, Mäkelä PH, Spratt BG. Invasiveness of serotypes and clones of *Streptococcus pneumoniae* among children in Finland. **Infect Immun.** Jan;73(1):431-5. 2005.

Hancock RE, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier B. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. **Infect Immun.** Oct;42(1):170-7. 1983.

Haruta S, Yamaguchi H, Yamamoto ET, Eriguchi Y, Nukaga M, O'Hara K, Sawai T. Functional analysis of the active site of a metallo-beta-lactamase proliferating in Japan. **Antimicrob Agents Chemother.** Sep;44(9):2304-9. 2000.

Hasegawa M, Kishino H, Saitou N. On the maximum likelihood method in molecular phylogenetics. **J Mol Evol.** May;32(5):443-5. 1991.

Head NE & Yu H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. **Infect Immun.** Jan;72(1):133-44. 2004.

Hollis RJ, Bruce JL, Fritschel SJ, Pfaller MA. 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, 1999.

Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van Embden JD, Willems RJ: Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. **J Clin Microbiol.** Jun;40(6):1963-71. 2002.

Hryniewicz K, Kłodzińska E, Dahm H, Szeliga J, Jackowski M, Buszewski B. Combination of capillary electrophoresis, PCR and physiological assays in differentiation of clinical strains of *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett.** Jul 8. 2008.

Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **J. Clin. Microbiol.** 28: 1903-5. 1990.

Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. **Antimicrob Agents Chemother.** 1995 Apr;39(4):824-9.

Jacoby GA & Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. **N Engl J Med.** Jan 27;352(4):380-91. 2005.

Jarvis WR. Preventing the emergence of multidrug-resistant microorganisms through antimicrobial use controls: the complexity of the problem. **Infect Control Hosp Epidemiol.** Aug;17(8):490-5. Review. 1996.

Jarvis WR. Usefulness of molecular epidemiology for outbreak investigations. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 15:500-3. 1994.

Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros.** Mar 19. 2008.

Johnson JK, Arduino SM, Stine OC, Johnson JA, Harris AD. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol.** Nov;45(11):3707-12. 2007.

Jonsdottir K & Kristinsson KG. Quinolone resistance in Gram negative rods in Iceland and association with antibiotic use. *Laeknabladid*. Apr;94(4):279-285. Icelandic. 2008.

Jukes TH & Cantor CR. in Mammalian Protein Metabolism. Munro HN. (ed) **Academic**, New York, 3:21-132. 1969.

Kemp R, Leatherbarrow AJ, Williams NJ, Hart CA, Clough HE, Turner J, Wright EJ, French NP. Prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in environmental water samples from a 100-square-kilometer predominantly dairy farming area. Appl. **Environ Microbiol**. 71:1876-1882. 2005.

Kimura M. The Neutral Theory. **Cambridge Univ. Press**, Cambridge. 1983.

Kiratisin P, Chattammanat S, Sa-Nguansai S, Dansubutra B, Nangpatharapornthawee P, Patthamalai P, Tirachaimongkol N, Nunthanasup T. A 2-year trend of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Thailand: an alert for infection control. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. May;102(5):460-4. Epub 2008 Mar 21. 2008.

Koh AY, Priebe G, Pier GB. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. **Infect Immun**. Apr;73(4):2262-72. 2005.

Kolaczkowski B, Thornton JW. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. **Nature**. Oct 21;431(7011):980-4. 2004.

Kotetishvili M, Stine OC, Chen Y, Kreger A, Sulakvelidze A, Sozhamannan S, Morris JG Jr. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for

typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. **J Clin Microbiol.** 41(5):2191-6. 2003.

Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, Elsayed S, Pitout JD. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. **J Infect Dis.** 2005 Nov 1;192(9):1606-12. Epub 2005 Sep 26.

Lee SC, Fung CP, Liu PY, Wang GTC, See LC, Lee N, Chen SC, Shieh WB. Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outcome. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, 20: 205-7. 1999.

Li XZ, Ma D, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** Aug;38(8):1742-52. 1994

Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** Sep;39(9):1948-53. 1995.

Libisch B, Watine J, Balogh B, Gacs M, Muzslay M, Szabó G, Fűzi M. Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. **Res Microbiol.** Apr;159(3):162-8. 2008.

Lipuma JJ. Molecular tools for epidemiologic study of infectious diseases. **Pediatr Infect Dis J.** Aug;17(8):667-75. Review. 1998.

Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends Microbiol.** Sep;14(9):413-20. 2006.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clin Infect Dis.** Mar 1;34(5):634-40. 2002.

Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J Antimicrob Chemother.** Mar;47(3):247-50. 2001.

Livermore DM. Acquired carbapenemases. **J Antimicrob Chemother.** Jun;39(6):673-6. 1997.

Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. **Eur J Clin Microbiol.** Aug;6(4):439-45. 1987.

Livesley MA, Tebbs SE, Moss HA, Faroqui MH, Lambert PA, Elliott TS. Use of pulsed field gel electrophoresis to determine the source of microbial contamination of central venous catheters. **Eur. J Clin Microbiol Infect Dis.** 17:108-12. 1998.

Lomovskaya O & Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic-a vision for applied use. **Biochem Pharmacol.** Mar 30;71(7):910-8. 2006.

Mach R, Vlcek J, Prusova M, Batka P, Rysavy V, Kubena A. Impact of a multidisciplinary approach on antibiotic consumption, cost and microbial resistance in a Czech hospital. **Pharm World Sci.** Oct;29(5):565-72. 2007.

Mackie K, Cosgrove S, Ross T, Song X, Fuss E, Perl T. Investigation of Increase in *Pseudomonas aeruginosa* Infections in the Neonatal Intensive Care Unit, November 2001–December 2003. **Am J Infect Cont.** May, 32:(3). 2004.

MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, Lin BB, Lockwood LG, Dirk JE, Miller GH, Burns JL, Garber RL. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. **J Infect Dis.** Mar;181(3):1180-4. 2000.

Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. **Infect Immun.** Feb;62(2):596-605. 1994.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci USA.** Mar 17;95(6):3140-5. 1998.

Marra AR, Pereira, CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, Sousa JMA, Edmond MB, Faro C, Wey SB. Bloodstream Infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology, and Clinical Outcomes. **Antimicrob Agents Chemother.** 2006(50):388-90. 2006.

Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -

lactamases in hospitals from southern Brazil. **Infection**. Dec;35(6):457-60. 2007.

Martins ST. Análise de custos de internação de pacientes em unidade de terapia intensiva com infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes. Tese de Mestrado, **UNIFESP-EPM**. 2002.

Menezes LC. Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems isoladas em hospitais brasileiros: perfil de sensibilidade, detecção de metalo- β -lactamase e análise da similaridade genética. Tese de Mestrado, **UNIFESP-EPM**. 2005.

Matushek MG, Bonten MJ, Hayden MK. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol**. Oct;34(10):2598-600. 1996.

Meats E, Feil EJ, Stringer A, Cody A, Goldstein R, Kroll JS, Popovic T, Spratt BG. Characterization of Encapsulated and Noncapsulated *Haemophilus influenzae* and Determination of Phylogenetic Relationships by Multilocus Sequence Typing. **J Clin Microbiol**. April;41(4):1623-1636. 2003.

Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clin Microbiol Infect**. Jun;13(6):560-78. 2007.

Michalopoulos A & Falagas ME. Colistin and polymyxin B in critical care. **Crit Care Clin**. Apr;24(2):377-91. 2008.

Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. **J Clin Microbiol.** Jan;46(1):118-29. 2008.

Moya B, Juan C, Alberti S, Pérez JL, Oliver A. Benefit of having multiple ampD genes for acquiring beta-lactam resistance without losing fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** Jul 21. Jul 21. 2008.

Nemoy LL, Kotetishvili M, Tigno J, Keefer-Norris A, Harris AD, Perencevich EN, Johnson JA, Torpey D, Sulakvelidze A, Morris JG Jr, Stine OC. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. **J Clin Microbiol.** Apr;43(4):1776-81. 2005.

Neto JMM & Moita GC. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Quím Nova** July/Aug;21:4. São Paulo. 1998.

Nicasio AM, Kuti JL & Nicolau DP. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. **Pharmacotherapy.** Feb;28(2):235-49. 2008.

Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol Biol Rev.** Dec;67(4):593-656. 2003.

Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. **J Bacteriol.** Oct;178(20):5853-9. 1996.

Noller AC, McEllistrem MC, Stine OC, Morris JG Jr, Boxrud DJ, Dixon B, Harrison LH. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among

Escherichia coli O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol.** Feb;41(2):675-9. 2003.

Nordmann P & Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin Microbiol Infect.** 8: 321-31. 2002.

Nowak-Zaleska A, Krawczyk B, Kotłowski R, Mikucka A, Gospodarek E. Amplification of a single-locus variable-number direct repeats with restriction fragment length polymorphism (DR-PCR/RFLP) for genetic typing of *Acinetobacter baumannii* strains. **Pol J Microbiol.** 57(1):11-7. 2008.

Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. **Antimicrob Agents Chemother.** Dec;48(12):4606-10. 2004.

Olive DM & Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol.** 37: 1661-9. 1999.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** Jan;38(1):71-8. 1994.

Patel SJ & Graham PL 3rd. Use of molecular typing in infection control. **Pediatr Infect Dis J.** Jun;26(6):527-9. 2007.

Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. **Infect Immun.** Jul;68(7):4331-4. 2000.

Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho Md Mda G, Aranha Nouér S, Pinto De Oliveira M, Mello Sampaio JL, D'Avila Freitas A, Ferreira AL, Amorim Ed Ede L, Riley LW, Moreira BM. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol.** Jul;40(7):2420-4. 2002.

Peterson LR & Brossette SE. Hunting health care-associated infections from the clinical microbiology laboratory: passive, active, and virtual surveillance. **J. Clin. Microbiol.** 40:1-4. 2002.

Peterson LR, Petzel RA, Clabots CR, Fasching CE, Gerding DN. Medical technologists using molecular epidemiology as part of the infection control team. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 16:303-11. 1993.

Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. **Emerg. Infect. Dis.**, 7: 312-8, 2001.

Pfaller MA, Acar J, Jone SRN, Verhoef J, Turnidge J, Sader HS. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clin. Infect. Dis.**, 32(2):S156-S167. 2001.

Pfaller MA, Wendt C, Hollis RJ, Wenzel RP, Fritschel SJ, Neubauer JJ, Herwaldt LA. Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 25:1-8, 1996.

Pimenta AL, Di Martino P & Blight MA. Positive correlation between in vivo and in vitro assays for the evaluation of *Pseudomonas virulence*. **Res Microbiol.** Nov;157(9):885-90. 2006.

Pinteiro LC, Viana GVR, Gomes FAC, Viana MG. Técnicas Algorítmicas para Construção de Árvores Filogenéticas. **Rev Cient Fac Lour Filho** – 4:(1), 2005.

Pirson M, Leclercq P, Jackson T, Leclercq M, Garrino M, Sion C. Financial consequences of hospital-acquired bacteraemia in three Belgian hospitals in 2003 and 2004. **J Hosp Infect.** Jan;68(1):9-16. 2008.

Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;45(2):447-53. 2001.

Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;48(4):1406-9. 2004

Poirel L, Pitout JD & Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiol.** Oct;2(5):501-12. Review. 2007.

Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practices of Infectious Diseases. Philadelphia, **Churchill Livingstone**, 2310-35. 2000.

Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. **J Mol Microbiol Biotechnol.** Apr;3(2):255-64. 2001.

Poole K, Tetro K, Zhao Q, Neshat S, Heinrichs DE, Bianco N. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*:

mexR encodes a regulator of operon expression. **Antimicrob Agents Chemother.** Sep;40(9):2021-8. 1996.

Pruitt BA Jr, McManus AT, Kim SH, Goodwin CW. Burn wound infections: current status. **World J Surg.** Feb;22(2):135-45. 1998.

Purves K.W; Sadava D.; Orians G.H.; Heller C.H. Vida a Ciência da Biologia.Porto Alegre: **Artmed**, 2002.

Recchia GD & Hall RM. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. **Trends Microbiol.** Oct;5(10):389-94. 1997.

Remington JS & Schimpff SC. Please don't eat the salads. **N Engl J Med.** Feb 12;304(7):433-5. 1981

Revazishvili T, Kotetishvili M, Stine OC, Kreger AS, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. Comparative analysis of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for characterizing *Listeria monocytogenes* strains isolated from environmental and clinical sources. **J Clin Microbiol.** 42(1):276-85. 2004.

Ribeiro J, Mendes RE, Domingos R, França E, Silbert S, Jones RN, Sader HS. Microbiological and epidemiological characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Brazilian tertiary hospital: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J Chemother.** Oct;18(5):461-7. 2006.

Roberts RB, de Lencastre H, Eisner W, Severina EP, Shopsin B, Kreiswirth BN, Tomasz A, MRSA Collaborative Study Group. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. **J Infect Dis.** 178:164–171. 1998.

Romling U & Tummeler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol.** 38: 464-5, 2000.

Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. **Am J Med.** Jul 8;113 Suppl 1A:14S-19S. 2002.

Rossolini GM & Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Microbiol Infect.** Jul;11 Suppl 4:17-32. 2005.

Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszańska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. **Folia Histochem Cytobiol.** 46(2):137-42. 2008.

Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Antimicrob Agents.** Jan;25(1):57-61. 2005.

Sader HS, Cerbara EF, Luz D, Hashimoto A. Evaluation of the Cephalosporins, Cefepime, Cefpirome and Ceftazidime, against Clinical Isolates of Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz. J Infect Dis,** 3: 231-7, 1999.

Sader HS, Hollis RJ & Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. **Clin Lab Med.** 15:407-31, 1995.

Sader HS, Pignatari AC, Leme IL, Burattini MN, Tancredi R, Hollis RJ, Jones RN. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 17: 13-8, 1993.

Saitou N & Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. Jul;4(4):406-25. 1987.

Schwartz DC & Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67–75. 1984.

Sneath PHA & Sokal RR. Numerical taxonomy. *Nature*. 193:855-860. 1962.

Sankararaman S, Kimmel G, Halperin E, Jordan MI. On the inference of ancestries in admixed populations. *Genome Res*. Apr;18(4):668-75. 2008.

Sawa T, Ohara M, Kurahashi K, Twining SS, Frank DW, Doroques DB, Long T, Gropper MA, Wiener-Kronish JP. In vitro cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections. *Infect Immun*. Jul;66(7):3242-9. 1998.

Scheckler, W. E., D. Brimhall, A. S. Buck, B. M. Farr, C. Friedman, R. A. Garibaldi, P. A. Gross, J. A. Harris, W. J. Hierholzer Jr., W. J. Martone, L. McDonald, S. L. Solomon. Requirements for infrastructure and essential activities of infection control and epidemiology in hospitals: a consensus panel report. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 19:114–124. 1998.

Sekiguchi J, Teruya K, Horii K, Kuroda E, Konosaki H, Mizuguchi Y, Araake M, Kawana A, Yoshikura H, Kuratsuji T, Miyazaki H, Kirikae T. Molecular epidemiology of outbreaks and containment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital. *J Infect Chemother*. Dec;13(6):418-22. 2007.

Setúbal JC & Meidanis J. Introduction to Computational Molecular Biology. Boston: *PWS Publishing Company*, 296. 1997b.

Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infect Control Hosp Epidemiol.** Oct;25(10):847-51. 2004.

Singh DV & Mohapatra H. Application of DNA-based methods in typing *Vibrio cholerae* strains. **Future Microbiol.** 3(1):87-96. 2008.

Silva FM, Sader HS, Jones RN, Gales AC. Antimicrobial Susceptibility Profile of *Pseudomonas aeruginosa* Causing Bloodstream Infections in Brazilian Medical Centers: Results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2001-2006). **IDSA**, poster 521. 2007.

Sneath PHA & Sokal RR. Numeric taxonomy: the principles and practice of numerical classification . San Francisco: **W.H. Freeman**, 573. 1973.

Sokal RR & Sneath PHA. Principles of Numerical Taxonomy. **W. H. Freeman**, San Francisco. 1963.

Soll DR, Lockhart SR & Pujol C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. 139–161. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of clinical microbiology, 8th ed. **ASM Press**, Washington, D.C. 2003.

Speert DP, Campbell ME, Davidson AG, Wong LT. *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract in patients with cystic fibrosis. **J Infect Dis.** Jan;167(1):226-9. 1993.

Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. **Curr Opin Microbiol.** Jun;2(3):312-6. 1999.

Spratt BG, Hanage WP & Feil EJ. The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. ***Curr Opin Microbiol.*** Oct;4(5):602-6. 2001.

Stull TL, Lipuma JJ, & Edlind TD. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. ***J Infect Dis.*** 157: 280-6, 1988.

Struelens MJ, De Gheldre Y, Deplano A. Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. ***Infect Control Hosp Epidemiol.*** 19(8):565-9.1998.

Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. ***Emerg Infect Dis.*** 7: 382-9, 2001.

Tancredi CH & Andremont AO. Forecast of antibiotic susceptibility of translocating strains of *Enterobacteria* and *Pseudomonas* in leukemic neutropenic patients. ***Prog Clin Biol Res.***;181:275-7. 1985.

Tarasevich IV, Shaginyan IA & Mediannikov OY. Problems and perspectives of molecular epidemiology of infectious diseases. ***Ann N Y Acad Sci.*** Jun;990:751-6. 2003.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. ***J Clin Microbiol.*** 33: 2233-9, 1995.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, *et al.*. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother.* 50:673-679. 2002.

Torre I, Sferratore FP & Crispino M. Cluster of *Pseudomonas aeruginosa* in a neurosurgical unit. *Ann Ig.* Sep-Oct;16(5):693-7. 2004.

Trias J & Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan;34(1):52-7. 1990.

Trick WE, Kioski CM, Howard KM, Cage GD, Tokars JI, Yen BM, Jarvis WR. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* ventriculitis among patients in a neurosurgical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Mar;21(3):204-8. 2000.

Tsan L, Davis C, Langberg R, Hojlo C, Pierce J, Miller M, Gaynes R, Gibert C, Montgomery O, Bradley S, Richards C, Danko L, Roselle G. Prevalence of nursing home-associated infections in the Department of Veterans Affairs nursing home care units. *Am J Infect Control.* Apr;36(3):173-9. 2008.

van Belkum A, Riewerts Eriksen N, Sijmons M, van Leeuwen W, VandenBergh M, Kluytmans J, Espersen F, Verbrugh H. Are variable repeats in the spa gene suitable targets for epidemiological studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Sep;15(9):768-70. 1996.

Versalovic J & Lupski J. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol.* 10(Suppl.): S15–S21. 2002.

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

Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. ***Curr Opin Infect Dis***. Aug;21(4):367-71. 2008.

Wang Q, Kong F, Jelfs P, Gilbert GL. Extended phage locus typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, using multiplex PCR-based reverse line blot hybridization. ***J Med Microbiol***. 57(Pt 7):827-38. 2008.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. ***Antimicrob Agents Chemother***. Jan;35(1):147-51. 1991.

Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. ***Antimicrob Agents Chemother***. Aug;47(8):2385-92. 2003.

Woodford N. Successful, multiresistant bacterial clones. ***J Antimicrob Chemother***. Feb;61(2):233-4. 2008.

Yang Z. Among-site variation and its impact on phylogenetic analyses. ***Tree*** 11:367-371. 1996.

Zanelli G, Pollini S, Sansoni A, Cresti S, Pilli E, Rossolini GM, Cellesi C. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from an intensive care unit. ***New Microbiol***. 27:293-299. 2004.

Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. ***J Antimicrob Chemother***. Dec;60(6):1206-15. Epub 2007 Sep 17. 2007.

Zuckermandl E & Pauling L. Horizons in biochemistry. **Academic Press**, New York. 189-225. 1962.

9 - ANEXOS

9.1 Seqüências das STs encontradas neste estudo.

```

      10      20      30      40      50
ST 277 clone SPM  GGGCCGCTGGCCAACGGCGCCACCACCATTCGTTTCGAGGGCGTGCCGAA
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP       .....
ST 594 MBL neg   .....
ST 595 MBL neg   .....

      60      70      80      90     100
ST 277 clone SPM  CTACCCCGACGTGACCCGCGTGGCGAAGATCATCGACAAGCACAAAGGTCA
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP       .....
ST 594 MBL neg   .....A.
ST 595 MBL neg   .....A.

      110     120     130     140     150
ST 277 clone SPM  ACATCCTCTACACCCGCGCCGACCGCGATCCGCGCGATGATGGCCGAAGGC
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP       .....
ST 594 MBL neg   .....
ST 595 MBL neg   .....

      160     170     180     190     200
ST 277 clone SPM  AAGGCGGCGGTGGCCGGTGCCGACGGTTCCAGCCTGCGTCTGCTCGGTTC
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP       .....
ST 594 MBL neg   .....
ST 595 MBL neg   .....

      210     220     230     240     250
ST 277 clone SPM  GGTGGGCGAGCCGATCAACCCGGAAGCCTGGCAGTGGTACTACGAGACCG
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP       .....
ST 594 MBL neg   .....
ST 595 MBL neg   .....

      260     270     280     290     300
ST 277 clone SPM  TCGGCCAGTCGCGCTGCCCGATCGTCGACACCTGGTGGCAGACCGAGACC
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP       .....
ST 594 MBL neg   .....
ST 595 MBL neg   .....

      310     320     330     340     350
ST 277 clone SPM  GGCGCCGTGCCTGATGATGCCCGCTGCCGGCGCCACCGATGAAGCCGGG
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP       .....
ST 594 MBL neg   .....
ST 595 MBL neg   .....

      360     370     380     390     400
ST 277 clone SPM  CTCGGCGGCCAAGCCGTTCTTCGGCGTGGTTCCGGCACTGATGTCACCGT
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP       .....G.
ST 594 MBL neg   ..T.A.....A.....G.
ST 595 MBL neg   ..T.A.....A.....G.

      410     420     430     440     450
ST 277 clone SPM  GCCGTTCAAGGAAGAGGCCTATCGTCTGGTGGACGAAATTGAGCCAGCGGG

```

```

ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....G.....
ST 595 MBL neg .....G.....

          460      470      480      490      500
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....C.....
ST 595 MBL neg    .....C.....

          510      520      530      540      550
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....C...C.....
ST 595 MBL neg    .....C...C.....

          560      570      580      590      600
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....
ST 595 MBL neg    .....

          610      620      630      640      650
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....T.....
ST 595 MBL neg    .....T.....

          660      670      680      690      700
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....C.....
ST 595 MBL neg    .....C.....

          710      720      730      740      750
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....C.....A.....
ST 595 MBL neg    .....C.....A.....

          760      770      780      790      800
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....A.....
ST 595 MBL neg    .....A.....

          810      820      830      840      850
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....
ST 595 MBL neg    .....

          860      870      880      890      900
ST 277 clone SPM  ....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....T.....
ST 595 MBL neg    .....T.....

```

```

          910      920      930      940      950
ST 277 clone SPM  TCCGGCGGCGTGGACTCCTCGGTGGTCGCCGCTGCTGCACAAGGCAT
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....
ST 595 MBL neg    .....

          960      970      980      990     1000
ST 277 clone SPM  CGGCGACCAACTGACTGCGTGTTCGTCGACACGGCCTGCTGCGCCTGC
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....
ST 595 MBL neg    .....

          1010     1020     1030     1040     1050
ST 277 clone SPM  ACGAAGGCGACCAGGTGATGGCCATGTCGCCGAGAACATGGGCGTGAAG
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....
ST 595 MBL neg    .....

          1060     1070     1080     1090     1100
ST 277 clone SPM  GTGATCCGTGCCAACGCCGAGGACAAGTTCCTCGGCCCTGGCCGCGT
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....C.....
ST 595 MBL neg    .....C.....

          1110     1120     1130     1140     1150
ST 277 clone SPM  CGCCGATCCGGAAGAGAAGCGCAAGATCATCGGCCGACCTTCATCGAAG
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....C.....
ST 595 MBL neg    .....C.....

          1160     1170     1180     1190     1200
ST 277 clone SPM  TCTTCGACGAAGAAGCCACCAAGCTGCAGGACGTGAAGTTCCTCGCCAG
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....
ST 595 MBL neg    .....

          1210     1220     1230     1240     1250
ST 277 clone SPM  GGCACCATCTACCCGACGTGATCGAGTCGGCCGGCCCAAGACCCGGCAA
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....
ST 595 MBL neg    .....

          1260     1270     1280     1290     1300
ST 277 clone SPM  GGCCACGTGACTGCAGGAAGTCATCAAGCGCCTGGCGCTGGCCCGTTTC
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....C.....
ST 595 MBL neg    .....

          1310     1320     1330     1340     1350
ST 277 clone SPM  GACGTGGCTTTCACCTGCGCCACAACGGCAAGACCATCTTCGCCCTGCA
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....
ST 594 MBL neg    .....
ST 595 MBL neg    .....

          1360     1370     1380     1390     1400
ST 277 clone SPM  CGAGGCGCGAGACGAGCTGGCCCGCGCGCCGGGTTCGGCGGGTGTGCG
ST 235 amostra BH  .....
ST 593 IMP        .....

```

```

ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

          1410      1420      1430      1440      1450
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM GCCAGGCATTCCTCGAGCAGGCGCTGCCGATCGAGGTCGAGCGCAACGGT
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....C
ST 595 MBL neg .....C

          1460      1470      1480      1490      1500
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM CTGCACCTGTGGGGCTGGGTTCGGCTTGCCGACCTTCTCCCGCAGCCAGCC
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

          1510      1520      1530      1540      1550
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM GGACCTGCAGTACTTCTATGTGAACGGGCGCATGGTGC CGGACAAGCTGG
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

          1560      1570      1580      1590      1600
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM TCGCCACGCGGTGCGCCAGGCTTATCGCGACGTGCTGTACAAACGGCCGG
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

          1610      1620      1630      1640      1650
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM CATCCGACCTTCGTGCTGTTCTTCGAAGTCGATCCGGCGGTGGTGGACGT
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

          1660      1670      1680      1690      1700
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM CAACGTGCACCCGACCAAGCACGAAGTTCGCTTCCTGACAGCCGGATGG
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

          1710      1720      1730      1740      1750
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM TCCATGTTCCTCAACCTCGGCCCGAACCAACCCGTCGCCCAACGGCGCTT
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

          1760      1770      1780      1790      1800
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM CCGCATCATCCTGCAACTGGACGGCGAGGAGATCATCGACTGCGTCCCGG
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....t.....
ST 595 MBL neg .....

          1810      1820      1830      1840      1850
          |.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM AGATCGGCTACCACCACCGCGGCGCCGAGAGATGGCCGAGCGCCAGTCC
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

          1860      1870      1880      1890      1900
          |.....|.....|.....|.....|.....|

```



```

ST 277 clone SPM      TGGCAGTTTCATCCCCTACACCGCCGCATCGACTACCTCGGCCGGGT
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....
ST 595 MBL neg       .....

          1910      1920      1930      1940      1950
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      GATGAACAACCTGCCCTACGTACTCTCGGTGGAGAAGCTCGCCGGGATCA
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....A.....
ST 595 MBL neg       .....A.....

          1960      1970      1980      1990      2000
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      AGGTGCGCAGCGGGTCGACGTGATCCGGATCATGATGGCGGAGTTCCTC
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....
ST 595 MBL neg       .....

          2010      2020      2030      2040      2050
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      CGTATCCTGAACCACTGCTGTACCTGGGCACCTATATCCAGGACGTCGG
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....A.....
ST 595 MBL neg       .....A.....

          2060      2070      2080      2090      2100
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      CGCCATGACCCCGGTGTTCCATCGTCCAGGCACGCCCGAAACCGTGAAG
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....
ST 595 MBL neg       .....

          2110      2120      2130      2140      2150
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      AGCCGCGCCAGCGCCACGGTCATGGAGCGCTACCTGCTGAAAGAGAAGGG
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....
ST 595 MBL neg       .....

          2160      2170      2180      2190      2200
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      GACCGTCCTGGTGAAGGACGTGCCATCGGCCAGCGCATCGGTGCCGGTC
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....G.....
ST 595 MBL neg       .....G.....

          2210      2220      2230      2240      2250
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      CAGTCAAGGTGATCAACGACGTGTCGGAATGGACAAGGTCCAACCGGGT
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....G.....
ST 595 MBL neg       .....G.....

          2260      2270      2280      2290      2300
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      GACGTCTGGTCTCCGACATGACCGACCCGGACTGGGAGCCGGTGATGAA
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....
ST 595 MBL neg       .....

          2310      2320      2330      2340      2350
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 277 clone SPM      GCGCGCAGGCCATCGTCCACCAACCGCGGGGGCTACCTGCCACGGG
ST 235 amostra BH    .....
ST 593 IMP           .....
ST 594 MBL neg       .....
ST 595 MBL neg       .....

```

```
                2360      2370      2380      2390      2400
ST 277 clone SPM  .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2410      2420      2430      2440      2450
ST 277 clone SPM  GCCACCCAGATCCTGCAGGATGGGCAGGGGTGACCGTTTGTCTGGGCA
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2460      2470      2480      2490      2500
ST 277 clone SPM  GCTCGCCGAGGTGCTGGTACGGGTCGAGGATGGCCTGGTCACGGTGGCC
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2510      2520      2530      2540      2550
ST 277 clone SPM  CCGATCGCCGGTACCCGTCCGCGGGGATCAACGAAGAGGCCGACCTGGC
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2560      2570      2580      2590      2600
ST 277 clone SPM  GCTGGAGCAGGATCTGCTGTCGGACGCCAAGGAGATCGCCGAGCACCTGA
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    A.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    A.....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2610      2620      2630      2640      2650
ST 277 clone SPM  TCGTGTCCGACCTGGGCGCAACGACGTGGGCGGGTGTCCGATATCGGC
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2660      2670      2680      2690      2700
ST 277 clone SPM  GCGGTGAAGGTCACCGAAAAATGGTGATCGAACGTTACTCCAACGTCAT
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2710      2720      2730      2740      2750
ST 277 clone SPM  GCACATCGTGTCCAACGTACCAGGGCAATTGCGCGAGGGGCTCAGCGCGA
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2760      2770      2780      2790      2800
ST 277 clone SPM  TGGACGCGCTGCGGGCGATCCTGCCGGCGGGTACGCTGTCCGGCGCGCGG
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 593 IMP        .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 594 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
ST 595 MBL neg    .....|.....|.....|.....|.....|.....|

                2810      2820      2830      2840      2850
ST 277 clone SPM  AAGATCCGCGCCATGGAGATCATCGACGAGCTGGAGCCGGTCAAGCGTGG
ST 235 amostra BH .....|.....|.....|.....|.....|.....|
```

```
ST 593 IMP      .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

                2860      2870      2880
ST 277 clone SPM  ....|....|....|....|....|....|..
ST 235 amostra BH .....
ST 593 IMP      .....
ST 594 MBL neg .....
ST 595 MBL neg .....

AGTCTACGGCGGCGGGTCCGGCTACCTGGCAT
```

9.2 - Resumo deste trabalho aceito no 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC™) / 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America

SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (SPM-1-PSA) Isolates: Analysis of the Ancestor Relationship using *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

Castrucci FM, Carmo-Rodrigues M, Silbert S, Gales AC
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Background: In Brazil, the spread of an endemic clone of PSA producer of SPM-1, a plasmid encoded metallo-beta-lactamase (MBL), has been reported. Recently, a higher genomic variety has been observed among the SPM-1-PSA isolates. The principal aim of this study was to analyze if the recently isolated SPM-1-PSA descend of a common ancestor. **Methods:** A total of 50 SPM-1-PSA exhibiting distinct ribotyping genotypes were collected from nine different Brazilian centers. Three IMP-1-producing (IMP-1-PSA) and two non-MBL producing PSA isolates were used as control. MLST was performed according to Curran *et al.* The obtained sequences were compared to existing sequences in the MLST database (www.pubmlst.org/paeruginosa) for assignment of allelic numbers and subsequent determination of ST. The Jukes-Cantor and Neighbor-Joining methods were used for phylogenetic analysis. **Results:** A total of five different STs could be identified among 55 PSA isolates. All the SPM-1-PSA presented an identical allelic profile (ST277), except for one strain. The three IMP-1-PSA strains were classified as belonging to the ST593, while the non-MBL producing PSA showed two new distinct STs, ST594 and ST595. The Brazilian endemic clone of SPM-1-PSA (ST277) showed an identical allelic profile with that demonstrated by strain ID 275 isolated in Austria on September 2006. A single-locus variant of ST277 was also observed with a strain, ID279, isolated in Austria on January 2007. A similarity in five of seven alleles (double-locus variants) was found between the SPM-1- PSA and the strain ID 148, which was isolated in Canada, in 1990. **Conclusions:** Our data shows that

SPM-1-PSA isolates descend of a common ancestor and possess a closer ancestral relationship with the Austrian strains.

Keywords: *P. aeruginosa*, molecular typing, MLST, SPM-1, metallo-beta-lactamases

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](#)