

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA



MILENA DANDA VASCONCELOS SANTOS

TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* POR MEIO DA ANÁLISE DO NÚMERO VARIÁVEL DE REPETIÇÕES EM TANDEM (VNTR)

Recife-PE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* POR MEIO DA ANÁLISE DE MÚLTIPLOS LOCOS VNTR (MLVA)

MILENA DANDA VASCONCELOS SANTOS

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva

Co-orientadoras: Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Dra. Maria Paloma Silva de Barros

Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino

RECIFE-PE

2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB 1788

Santos, Milena Danda Vasconcelos

Tipagem molecular de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* por meio de análise de múltiplos locos VNTR (MLVA) / Milena Danda Vasconcelos Santos. – Recife: O Autor, 2013.

67 folhas: il.

Orientadores: Maria da Paz Carvalho da Silva, Maria Betânia Melo de Oliveira, Maria Paloma Silva de Barros, Tereza Cristina Leal-Balbino

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui bibliografia

1. Bactérias gram-negativas 2. Infecção hospitalar I. Silva, Maria da Paz Carvalho da (orient.) II. Oliveira, Maria Betânia Melo de (coorient.) III. Barros, Maria Paloma Silva de IV. Leal-Balbino, Tereza Cristina (coorient.) V. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-208

MILENA DANDA VASCONCELOS SANTOS

**TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* e
Pseudomonas aeruginosa POR MEIO DA ANÁLISE DE MÚLTIPLOS LOCOS
VNTR (MLVA)**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco

Aprovada em 20 de dezembro de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

1º Membro Titular Interno: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

1º Membro Titular Externo: Dra. Ana Catarina Souza Lopes
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical

2º Membro Titular Externo: Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos

1º Suplente Interno: Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

2º Suplente Externo: Dra. Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

Dedico aos meus pais, meu irmão, minha avó e meu namorado que sempre me apoiaram e eram a minha maior fortaleza quando eu pensava em fraquejar.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me iluminar, me dar forças, me conduzir para fazer as melhores escolhas, por me ouvir tanto e por atender aos meus pedidos quando eu mais precisei.

Aos meus pais, maiores companheiros e melhores amigos, pelo apoio incondicional, por todos os ensinamentos, por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida, por serem meus maiores professores, meus exemplos de vida pessoal e profissional, por viajarem 14 horas para me dar forças quando eu estava triste ou quando tinha uma apresentação muito importante. Com eles sempre estarei e é para eles essa vitória.

Ao meu irmão, que mesmo longe me incentivava a seguir em frente e nunca desistir.

À minha vó, Tetezinha, obrigada por ter sido minha companheira diária nos últimos 10 anos, por adivinhar os meus pensamentos, por me acalmar nas horas de angústias, por todas as orações, por dividir comigo todas as minhas tristezas e multiplicar as minhas alegrias e por entender a minha correria.

Ao meu namorado, por toda paciência, por ter entendido que a distância era preciso para eu vencer essa etapa, por me incentivar e por todo amor dedicado.

Aos meus tios, primos e padrinhos por todo apoio, amor e dedicação.

À minha orientadora, minha conterrânea, minha parente de coração, por ter acreditado em mim, por ter me estimulado a seguir em frente e por ter me aberto tantas portas.

À minha amiga e co-orientadora, Betânia, por ter me aceitado como co-orientanda a alguns anos atrás sem se quer me conhecer, por ter lutado junto a mim para ir a tantos congressos, palestras, cursos, pelas palavras de conforto e carinho quando eu precisei, por entender que tem horas que é necessário partir, e essa minha hora chegou! Mas jamais esquecerei todos os ensinamentos e a ela dedico todos os prêmios e crescimento na área da pesquisa.

À minha Palominha, por me ensinar desde o princípio de uma PCR até o sequenciamento de um DNA. Por me aguentar até mesmo no melhor momento da sua vida: a gravidez.

À Cris, por ter aceitado ser minha co-orientadora sem nem pensar duas vezes e ter aberto as portas do Aggeu Magalhães para mim.

Aos meus amigos piauienses e pernambucanos por entenderem as ligações não atendidas, as mensagens não respondidas e as festas não idas, para me dedicar a pesquisa e a escrita.

A minha Da Paizete querida (Amanda) pelas boas risadas, idas e vindas divertidas da UFPE, pelos conselhos e ombro amigo.

Aos meus amigos do Aggeu (associados do café), Carinex (pelos ensinamentos, paciência, correções, carinho e por todos os dias que ficava comigo até tarde no Aggeu), Rosimarrie (pelas palavras de conforto, por me ouvir, me estimular tanto, por todas as vezes que ia comigo levar material para sequenciar), Livia (por me entender, ajudar me dar várias broncas e por todos os sequenciamentos), Philips e Vladimir por todo apoio e por todas as dúvidas tiradas, Tati e Antônio por todas as dicas, preocupações e pelo intenso apoio.

Aos demais associados do café, Marise, Dra. Nilma, Nanda e Gerlane por todos os momentos de descontração.

À Sil, Fabi e Érica por todo carinho e por sempre estarem dispostas a me ajudar.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por disponibilizar todos os reagentes e infra estrutura para a realização deste trabalho.

RESUMO

Acinetobacter baumannii e *Pseudomonas aeruginosa* são importantes patógenos oportunistas responsáveis por inúmeras infecções e surtos nosocomias, além de possuírem elevada capacidade para persistir e resistir aos antimicrobianos no ambiente hospitalar. Análise de Múltiplos Locos VNTR (MLVA) foi realizada em 24 isolados de *A. baumannii* e 39 de *P. aeruginosa*. As análises foram realizadas utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose a 3,0%, bem como sequenciamento dos fragmentos amplificados. Oitenta e três por cento dos isolados foram classificados como extensivamente resistentes aos antimicrobianos (XDR) e 17 perfis genotípicos (GPA1-GPA17) foram encontrados nas amostras analisadas. GPA2 foi o mais comumente encontrado (0,96 %), seguido de GPA15, GPA3, GPA8, com 0,72%, 0,48% e 0,48 %, respectivamente. Os demais genótipos foram únicos entre as amostras. Sessenta e sete por cento dos isolados de *P. aeruginosa* mostrou alta sensibilidade (66,6%) aos antimicrobianos e foram distribuídos em 37 perfis genotípicos (GPP1 - GPP37), revelando uma enorme heterogeneidade genética. Dois isolados foram agrupados em dois genótipos (GPP2 e GPP12), e os demais genótipos abrange uma única amostra, sugerindo o evento de multicolonização em *P. aeruginosa*. Muitas amostras de ambas espécies, embora isolados de diferentes sítios de infecção e setores hospitalar e com um intervalo de semanas e/ou meses, revelaram uma dispersão clonal, persistência no ambiente hospitalar e aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, especialmente em pacientes que estão internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). MLVA mostrou ser uma técnica útil e altamente discriminatória para a caracterização e diferenciação de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* deste estudo, facilitando a compreensão da dinâmica de dispersão em um hospital público no Brasil.

Palavras-chave: MLVA; infecções hospitalares; resistência antimicrobiana; multicolonização.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* are considered as opportunistic pathogens responsible for numerous infections and nosocomial outbreaks, besides presenting high capacity to persist and resist antimicrobials in the hospital environment. Multiple Locus of VNTR Analysis (MLVA) was performed in 24 isolates of *A. baumannii* and 39 *P. aeruginosa* obtained from a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. The analyzes were performed by using Polymerase Chain Reaction (PCR) and electrophoresis on 3.0% agarose gel, as well sequencing of the amplified fragments. Eighty-three percent of *A. baumannii* isolates were classified as extensively drug resistant (XDR) and 17 genotypic profiles (GPA1 - GPA17) were found between the samples analyzed. GPA2 was the most commonly found (0.96%), following by GPA3, GPA8 and GPA15, with 0.48%, 0.48% and 0.72% respectively. The remaining genotypes were unique among the samples. Sixty-seven percent of the *P. aeruginosa* isolates showed high sensibility (66.6%) to antimicrobial and were distributed into 37 genotypic profiles (GPP1 - GPP37), revealing a huge genetic heterogeneity. Only two genotypes (GPP2 and GPP12) grouping two isolates each, whereas the remaining genotypes belonged to a single sample. Even strains obtained from a single patient revealed distinct genotypic profile, pointing to a multicolonization event of *P. aeruginosa*. On the other hand, most samples of both species although isolated from different sites of infection and hospital sectors, with an interval of weeks and/or months, showed clonal spread, persistence in the hospital environment and increased resistance to antimicrobials, especially in patients admitted in the Intensive Care Unit (ICU). MLVA proved to be a useful and highly discriminatory technique for the characterization and differentiation of the *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates, facilitating the understanding of the dispersion dynamics in a public hospital in Brazil.

Keywords: MLVA; nosocomial infections; antimicrobial resistance; multicolonization.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Páginas

Figura 1: (A) Cepas de <i>A. baumannii</i> após o crescimento durante à noite a 37°C em meio agar Luria-Bertani. (B) Células de <i>A. baumannii</i> crescidas em caldo Luria-Bertani.....	16
Figura 2: Visão geral da dinâmica entre os pacientes, <i>A. baumannii</i> e o ambiente hospitalar.....	17
Figura 3: Impacto clínico provocado por <i>A. baumannii</i> , os fatores que contribuem para este microrganismo persistir no ambiente, colonizar e infectar o hospedeiro.....	20
Figura 4: Países que relataram surtos de resistência aos carbapenêmicos em <i>A. baumannii</i> . A cor vermelha significa surtos notificados antes de 2006, e o amarelo significa surtos notificados desde 2006.....	21
Figura 5: Mapa circular do genoma de <i>A. baumannii</i>	22
Figura 6: Microscopia eletrônica de bacilos de <i>P. aeruginosa</i>	24
Figura 7: Esquema dos Sistemas de Secreção tipo I e II de <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 8: Esquema dos fatores de virulência de <i>P. aeruginosa</i> , destacando o sistema de secreção tipo III.....	28
Figura 9: Mapa circular dos genomas das cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 e PA14.....	32
Figura 10: Esquema representativo destacando as unidades de repetições (<i>repeats</i>) presentes em um loco VNTR.....	36

ARTIGO

Figure 1: Dendogram showing the number of repeats in six VNTR loci (Abaum_845, Abaum_1988, Abaum_3002, Abaum_3468, Abaum_3530) and the genotypes of <i>Acinetobacter baumannii</i> clinical isolates.....	57
Figure 2: Dendogram showing the correlation between the alleles of clinical isolates of <i>P. aeruginosa</i> with their genotypic profiles	60

LISTA DE TABELAS

ARTIGO	Páginas
Table 1: Identification of <i>Acinetobacter</i> isolates by BACTEC equipment and blaOXA-51 gene, antimicrobial susceptibility, site of infection, hospital sector where they were obtained and their respective genotypes.....	56
Table 2: General characteristics of <i>P. aeruginosa</i> isolates and their genotypic profiles.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo de comprimento do fragmento amplificado)
AmpC	β -lactamase cromossômica induzível
BAP	Proteínas associadas ao biofilme
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CoNS	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Análise de sequências relativamente curtas)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IACS	Infecção Associada aos Cuidados de Saúde
IS	<i>Insertion sequence</i> (Sequência de inserção)
FC	Fibrose Cística
GM1	Glicolípido de membrana 1
LPS	Lipopolissacarídeo
Mb	Mega bases
MLST	<i>Multilocus</i> sequence typing (Tipagem de Sequências Multilocos)
MLVA	<i>Multiple Loci VNTR Analysis</i> (Análise dos Múltiplos Locos do Número Variável de VNTR)
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OmpA	Proteína da membrana externa A
OXA	Oxacilinase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR-Ribotipagem	<i>Polymerase chain reaction Ribotyping</i> (PCR-Ribotipagem)
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado)
pb	Pares de base
pH	Potencial de Hidrogênio
pmol	Picomols
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Amplificações aleatórias do DNA polimórfico)

RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo de Fragmentos de Restrição)
rep-PCR	<i>Repetitive Sequence-Based PCR</i> (Elementos de repetição palindrômica)
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i> (Programa de Vigilância Antimicrobiana)
TBE	Tris-borato-EDTA
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VNTR	<i>Variable Number in Tandem Repeats</i> (Número Variável de Repetições em Tandem)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
2.1.1 Características gerais	15
2.1.2 Patogenicidade	16
2.1.3 Impacto clínico de infecções causadas por <i>A. baumannii</i>	19
2.1.4 Epidemiologia	20
2.1.5 Genoma	22
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.2.1 Características gerais	24
2.2.2 Patogenicidade	25
2.2.3 Impacto clínico de infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i>	28
2.2.4 Epidemiologia	29
2.2.5 Genoma	31
2.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	32
2.4 Tipagem molecular em <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i>	35
2.5 Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR) por meio do MLVA	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
5. ARTIGO CIENTÍFICO	48
INTRODUCTION	50
MATERIALS AND METHODS	50
Bacterial strains studied, culture conditions and DNA extraction	50
Antibiotic susceptibility testing	51
Confirmation and identification of <i>A. baumannii</i>	52
Purification and sequencing of DNA of VNTR loci	52
Analysis of VNTR loci	53
Determination of Numerical Index of Discrimination (DI)	53
RESULTS	53

Profile of antimicrobial susceptibility, infection sites and places of isolation of <i>baumannii</i>	53
Genetic profile of <i>A. baumannii</i>	54
Profile of antimicrobial susceptibility and places of isolation of <i>P. aeruginosa</i>	57
Genetic profile of <i>P. aeruginosa</i>	57
DISCUSSION	60
REFERENCES	62
6. CONCLUSÕES	67

1. INTRODUÇÃO

A Infecção Associada aos Cuidados de Saúde (IACS) constitui um grave problema de saúde pública a nível mundial. Reconhecida como o evento adverso mais frequente durante a prestação de cuidados, a IACS ocasiona o impacto negativo gerado pela morbidade, mortalidade, custos sociais e econômicos atingindo populações, sistemas de saúde e países. É considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma epidemia silenciosa, emergindo como um dos maiores desafios da medicina atual. As IACS incluem-se hoje entre as complicações mais frequentes da hospitalização.

Dentre os patógenos responsáveis por provocar infecções hospitalares, destacam-se *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*: espécies de natureza ubíqua e que possuem suscetibilidade diminuída a condições ambientais adversas como a dessecação, as soluções desinfetantes, antissépticas e variações de temperatura, o que contribui para o seu potencial de transmissibilidade em ambientes hospitalares.

A dinâmica das infecções hospitalares causadas por esses microrganismos tornou-se um desafio para as equipes médicas, devido a facilidade que estas bactérias apresentam em adquirir mecanismos de resistência a diversos agentes antimicrobianos, resultando em dificuldades na escolha da terapia medicamentosa eficaz e que contribui para a sua disseminação e persistência *A baumannii* e *P. aeruginosa* no cenário hospitalar.

Diversos métodos moleculares têm sido utilizados para avaliar a heterogeneidade genética, a disseminação clonal e a multicolonização dessas espécies. Entretanto, estes métodos diferem quanto ao custo, tempo de execução, poder discriminatório, reprodutibilidade, facilidade de interpretação e de armazenamento dos resultados em bancos de dados.

Atualmente, uma das maneiras para realizar a tipagem molecular desses patógenos é por meio da Análise de Múltiplos Locos do Número Variável de VNTR (MLVA). Esta análise baseia-se na variação do número de repetição de cada isolado, sendo uma técnica discriminatória, econômica, reprodutível e de fácil portabilidade entre os laboratórios, além disso, tem proporcionado um elevado número de informações para estudos epidemiológicos e de rastreamento de infecções causadas por *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Acinetobacter baumannii*

2.1.1 Características gerais

O gênero *Acinetobacter spp.*, pertencente à família Moraxellaceae, é composto por bacilos Gram-negativos, não fermentadores de glicose, catalase positiva, oxidase negativa, aeróbicos estritos, pleomórficos e imóveis (GORDON; WAREHAM, 2009; DURANTE-MANGONI; ZARRILLI, 2011; HOWARD *et al.*, 2012; FIESTER; ACTIS, 2013).

Este gênero contém 32 espécies taxonomicamente distintas, a maioria das quais são organismos ambientais. Apenas três espécies são patogênicas ao homem (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*), todas fenotipicamente muito similares com uma espécie ambiental, *Acinetobacter calcoaceticus*, e, portanto, agrupadas no chamado complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008; DURANTE-MANGONI; ZARRILLI, 2011). Diante das similaridades fenotípicas destas espécies, diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos para identificação genômica dos isolados, como a análise do gene 16S e do grupo de enzimas oxacilinase (OXA) – 51 (DURANTE-MANGONI; ZARRILLI, 2011; HOWARD *et al.*, 2012).

O patógeno mais prevalente em amostras clínicas do gênero *Acinetobacter* é *A. baumannii* (Figura 1) (CERQUEIRA; PELEG, 2011), um patógeno oportunista e ubíquo que requer nutrientes mínimos para sua sobrevivência, além de ser altamente resistente aos agentes antimicrobianos (CISNEROS *et al.*, 1996). Seus habitats naturais são a água e o solo, porém também podem ser isolados de comidas, artrópodes e do ambiente. Em humanos, colonizam, principalmente, a pele, feridas e o trato respiratório e gastrointestinal (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008).

Essa bactéria pode persistir em ambiente comunitário e hospitalar, entretanto, a maioria das infecções causadas por *A. baumannii* são adquiridas em meio hospitalar (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012). Esse patógeno afeta criticamente pacientes com alterações da barreira cutânea ou do trato respiratório (FIESTER; ACTIS, 2013), produzindo infecções diversas, como pneumonia, bacteremia, endocardites, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções do trato urinário e meningites (McCONNELL; PACHÓN, 2012).

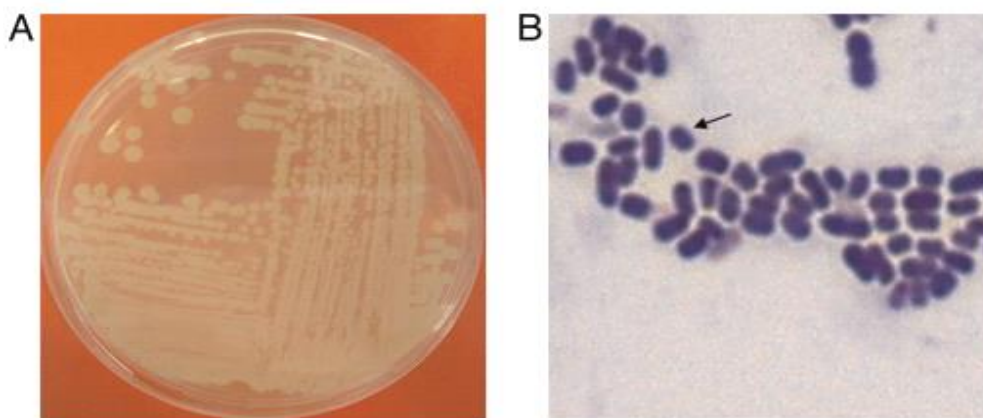


Figura 1: (A) Cepas de *A. baumannii* após o crescimento a 37°C em meio agar Luria-Bertani. (B) Células de *A. baumannii* crescidas em caldo Luria-Bertani. A seta indica uma célula individual de *A. baumannii*.

Fonte: Howard; O'Donoghue; Leator, 2012.

2.1.2 Patogenicidade

Apesar de extensas pesquisas sobre o potencial de virulência deste microrganismo emergente, não está totalmente elucidado os mecanismos envolvidos no estabelecimento e progressão das infecções (GORDON; WAREHAM, 2009; HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012).

Em geral, acredita-se que o sucesso desse patógeno esteja atribuído a diversos fatores, como: (a) habilidade para aderir, colonizar e invadir as células epiteliais humanas; (b) habilidade para formar biofilmes e resistir à dessecação de superfícies abióticas (dispositivos médicos e superfícies ambientais, por exemplo) (Figura 2); (c) variabilidade de mecanismos de resistência, que são facilmente regulados, quando necessário; e, por fim, (d) facilidade em adquirir material genético de outros microrganismos através da transferência horizontal de genes, com a finalidade de promover a sua sobrevivência mediante pressão seletiva dos antimicrobianos (CERQUEIRA; PELEG, 2011).

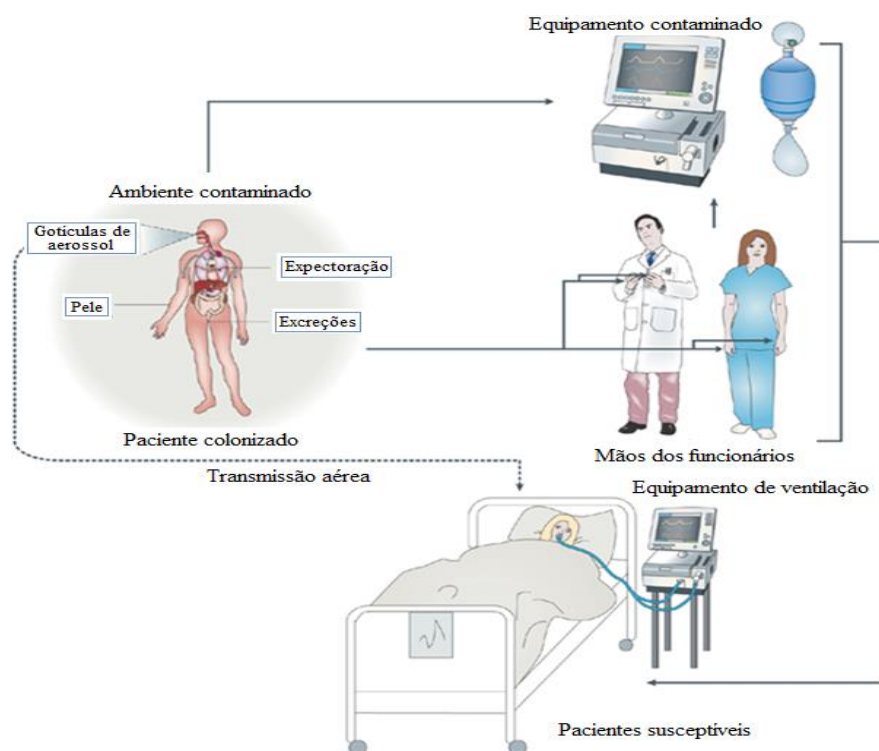


Figura 2: Visão geral da dinâmica entre os pacientes, *A. baumannii* e o ambiente hospitalar.

Fonte: Adaptado de Dijkshoorn; Nemec; Seifert, 2007.

Um fator significativamente importante no potencial patogênico dessa bactéria é a presença da OmpA, uma proteína da membrana externa. Essa proteína liga-se às células epiteliais e mitocondriais das células do hospedeiro. Uma vez ligada à mitocôndria, induz a disfunção mitocondrial e subsequente liberação de uma molécula proapoptótica, citocromo c. Tais reações contribuem para o dano e apoptose da célula humana, principalmente as células das vias respiratórias (HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012; McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012). Adicionalmente, desempenha um papel na adesão e invasão das células epiteliais, contribuindo para a disseminação de *A. baumannii* durante a infecção, além de colaborar com a permanência e crescimento desse patógeno em sangue humano (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012). Outra função marcante é a sua participação na formação de biofilmes (HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012), que são complexos multicelulares, compostos por células próximas uma das outras que ficam aderidas a uma matriz extracelular, constituída de carboidratos, ácidos nucléicos, proteínas e/ou outras macromoléculas (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

A formação de biofilmes não é simplesmente uma adesão acidental de células bacterianas em uma superfície. É uma série de eventos moleculares que as células mantêm sob forte regulação (GADDY; ACTIS, 2009). Em *A. baumannii* essa formação está fenotipicamente associada com a produção de um exopolissacarídeo mucóide capsular

(composto de ramnose, manose, glicose e ácido glicurônico), a presença de fímbrias, proteínas da membrana externa e a secreção de macromoléculas, como os polissacarídeos e os ácidos nucléicos (JOLY-GUILLOU, 2005; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; GADDY; ACTIS, 2009; HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012).

A presença de fímbrias e a produção de proteínas associadas ao biofilme (BAP) contribuem para iniciar o processo de produção do biofilme, e posterior adesão da bactéria em determinadas superfícies. Quando as fímbrias aderem-se as superfícies, iniciam a formação de micro colônias, seguidas pelo completo desenvolvimento da estrutura desse complexo multicelular. BAP estão presentes na superfície das células bacterianas e também desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e maturação do biofilme, estabilizando-o em superfícies bióticas e abióticas (HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012). Essa habilidade de *A. baumannii* em formar biofilmes e aderir-se em objetos inanimados e determinadas superfícies explica a alta prevalência dessa bactéria no ambiente hospitalar (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Uma característica dessa espécie é a capacidade de obter e utilizar fontes contendo ferro o que possibilita sua sobrevivência tanto no hospedeiro quanto no ambiente. Essa bactéria secreta uma variedade de moléculas envolvidas na aquisição de ferro, incluindo o sideróforo acinetobactina, e também produz um sistema de utilização de heme (GORDON; WAREHAM, 2009). O ferro além de auxiliar no controle da formação de biofilmes, também desempenha um importante papel na expressão diferencial de genes bacterianos, alguns dos quais são cruciais para a virulência de microrganismos patogênicos (GADDY; ACTIS, 2009).

Esse patógeno também produz um lipopolissacarídeo O, que atua em sinergismo com o exopolissacarídeo capsular, bloqueando o sistema complemento do hospedeiro, consequentemente evitando o contato desse sistema com a parede celular bacteriana, e dessa forma, mantendo por mais tempo o microrganismo nos fluidos humanos (JOLY-GUILLOU, 2005).

Outras proteínas chaves que contribuem para a virulência de *A. baumannii* são a fosfolipase D e C. Enquanto a fosfolipase D é importante para a resistência bacteriana, evasão ao sistema imune do hospedeiro e patogênese, a fosfolipase C aumenta a toxicidade às células epiteliais. Juntamente com OmpA e as fímbrias, as fosfolipases também auxiliam na adesão do agente patogênico aos epitélios (HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012).

Considerando que *A. baumannii* é frequentemente multirresistente aos antimicrobianos, a identificação dos fatores que influenciam a virulência poderá auxiliar na caracterização dos isolados de baixo e alto potencial virulento. Com isso, pacientes de alto

risco poderão ser tratados precocemente e medidas preventivas deverão ser tomadas, evitando, dessa maneira, infecções cruzadas, e consequente aumento da morbidade e mortalidade por esse microrganismo (JOLY-GUILLOU, 2005).

2.1.3 Impacto clínico de infecções causadas por *A. baumannii*

Acinetobacter baumannii é um patógeno humano de extrema importância, capaz de causar infecções comunitárias e hospitalares (FOURNIER; RICHET, 2006), que merece destaque devido ao número de infecções que pode acarretar, a sua rápida emergência e disseminação global, alta resistência aos antimicrobianos (MARAGAKIS; PERL, 2008; GORDON; WAREHAM, 2009; McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012), além da sua elevada resistência a dessecação e aos desinfetantes (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Embora possa estar presente na comunidade, a maior prevalência de infecções causadas por esse microrganismo ocorre no ambiente hospitalar, acometendo especialmente os pacientes que estão internados em UTI (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008). Características específicas dos pacientes tais como: idade avançada, supressão imune, traumas ou queimaduras, e condições a que estão submetidos como cateterismo, traqueostomia, ventilação mecânica, alimentação enteral, e tratamento prolongado com antimicrobianos são fatores de risco para colonização e infecção por essa espécie (Figura 2) (KARAGEORGOPOULOS; FALAGAS, 2008; MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008). Infecções por esse patógeno estão diretamente relacionadas com o aumento da morbidade e com o prolongamento da internação no hospital (MARAGAKIS; PERL, 2008).

A pneumonia adquirida no hospital representa umas das manifestações clínicas mais comuns de infecções causadas por essa bactéria. Essa infecção ocorre tipicamente em pacientes que estão recebendo ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva (Figura 3) (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

Outra infecção causada comumente por *A. baumannii* é a bacteremia, proveniente principalmente de infecções do trato respiratório inferior e de dispositivos intravascular, além de infecções de feridas e do trato urinário, em menor proporção (Figura 3) (JOLY-GUILLOU, 2005; McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012). É elevada a taxa de mortalidade por infecções dessa natureza, variando de 28 a 43% (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

Esse microrganismo também pode causar infecções da pele, feridas e tecidos moles, principalmente na população militar, substancialmente nos militares que estão em operações de guerra (Figura 3) (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012). Além disso, esse patógeno é bem conhecido pela intensa colonização e

infecção em unidades de queimaduras, representando um grave problema para os pacientes que estão internados nessas instituições, devido à sua difícil erradicação, proveniente da sua elevada resistência aos antimicrobianos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Algumas patologias também podem ser causadas por essa bactéria, embora em menor proporção, como endocardites, meningites, peritonites, artrites, osteomielites e ceratites (FOURNIER; RICHET, 2006; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; WIECZOREK *et al.*, 2008; McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

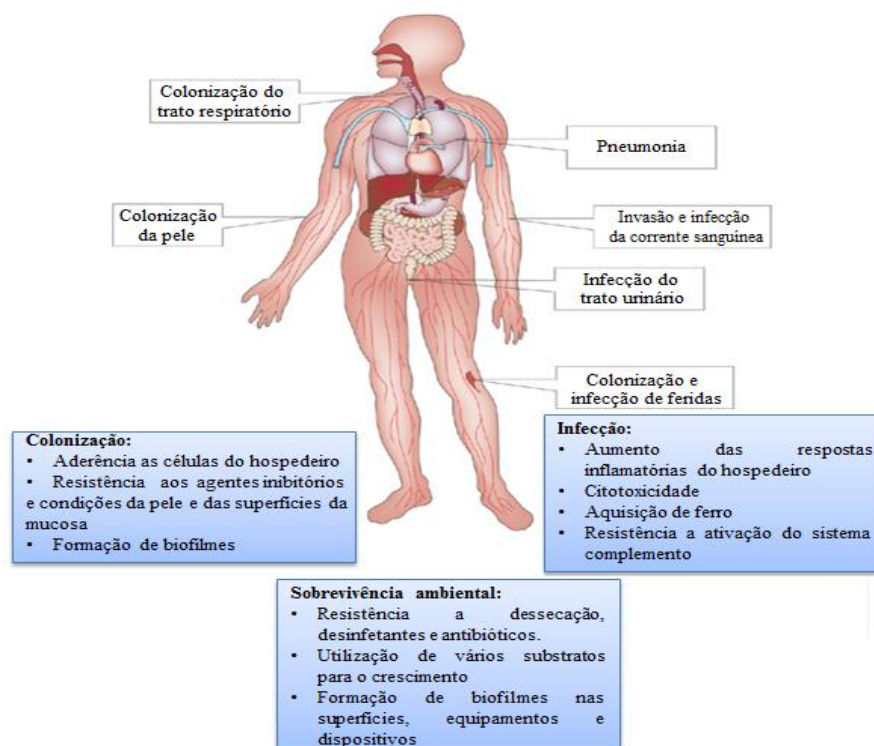


Figura 3: Impacto clínico provocado por *A. baumannii*, os fatores que contribuem para este microrganismo persistir no ambiente, colonizar e infectar o hospedeiro.

Fonte: Adaptado de Dijkshoorn; Nemec; Seifert, 2007.

2.1.4 Epidemiologia

Acinetobacter baumannii é ubíquo na natureza e pode ser encontrado no solo, água, animais e humanos (FOURNIER; RICHET, 2006). Raramente é encontrado como membro da microbiota normal da pele. Estima-se que, no máximo, 3% da população microbiana da pele seja colonizada por essa bactéria (HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012). Esse patógeno oportunista também pode ser encontrado em alimentos e artrópodes (FOURNIER; RICHET, 2006).

Um estudo realizado no Reino Unido descobriu que 30 de 177 legumes estavam contaminados com *Acinetobacter*, sendo *A. baumannii* a espécie mais prevalente. Em um

trabalho similar realizado em Hong-Kong, vegetais também apresentaram índices elevados (53%) de contaminação por esse microrganismo (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Curiosamente, um estudo realizado com moradores de rua na França revelou um alto índice de *Acinetobacter* (21%) em amostras de piocho, sugerindo um novo reservatório potencial para esse agente patogênico (HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012).

Além disso, é preocupante a colonização desse microrganismo em instituições de cuidados de saúde. A infecção com *A. baumannii* usualmente acomete pacientes em estado grave internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), e devido a sua alta taxa de resistência aos antimicrobianos torna-se difícil a sua erradicação, refletindo em índices elevados de mortalidade, de 26% a 68%, entre esses pacientes (MARAGAKIS; PERL, 2008). No ambiente hospitalar, também é frequente a presença de surtos com contaminação de cortinas, equipamentos respiratórios, umidificadores, maçanetas das portas, espanadores e teclados de computadores (MARAGAKIS; PERL, 2008).

Países da Europa, como Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Espanha e Holanda têm apresentado frequentes surtos hospitalares com *A. baumannii*. Outro problema recente que os países europeus estão enfrentando, é a intensa resistência aos carbapenêmicos, principalmente na Turquia, Grécia, Itália, Espanha e Inglaterra (Figura 3) (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

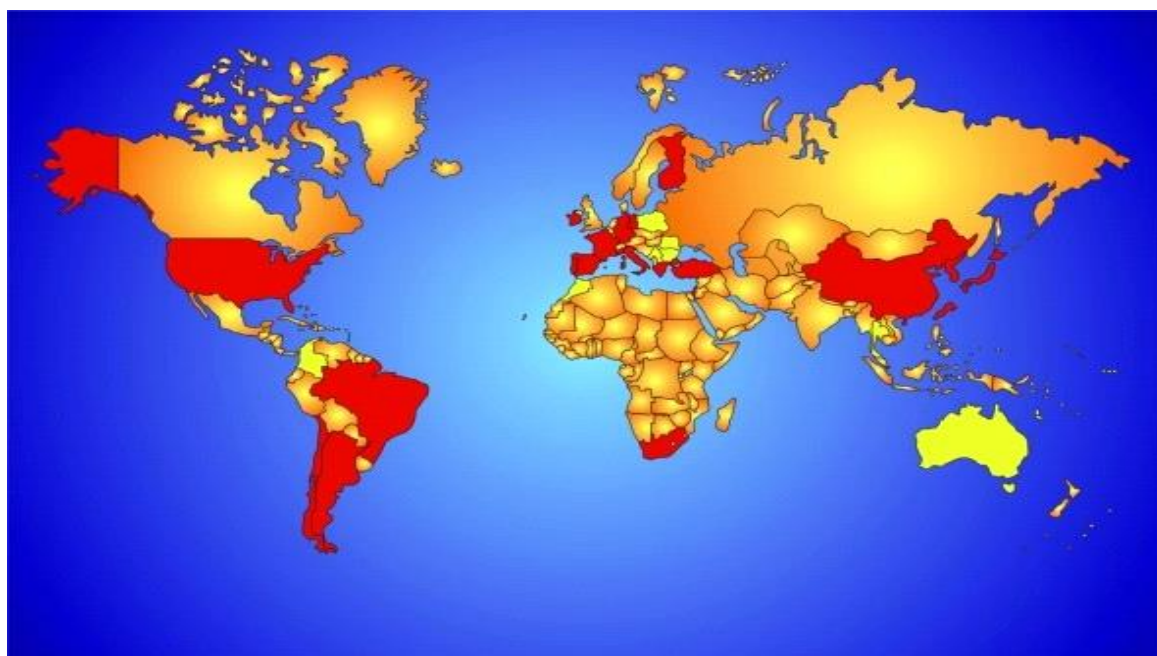


Figura 4: Países que relataram surtos de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. A cor vermelha significa surtos notificados antes de 2006, e o amarelo significa surtos notificados desde 2006.

Fonte: Peleg; Seifert; Paterson, 2008

Em 2003, um estudo realizado em um navio situado no Golfo Pérsico com soldados feridos provenientes dos Estados Unidos, revelou que 4,1% de toda a infecção de pele e tecidos estavam relacionados com *A. baumannii* (HOWARD; O'DONOGHUE; SLEATOR, 2012).

Na Guatemala, *Acinetobacter* tem sido a segunda maior causa (17%) de pneumonias associadas à ventilação mecânica, seguida apenas por *P. aeruginosa* que lidera essa infecção com 19% (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008). A taxa de mortalidade é bastante elevada em infecções deste tipo, variando de 40 a 70% (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

Marra e colaboradores analisaram 2.563 casos de infecções da corrente sanguínea em 16 hospitais brasileiros em 2011. Os resultados revelaram que *A. baumannii* é a quarta causa (12,5%) de infecções dessa natureza no Brasil, sendo *Staphylococcus aureus* (15,4%) o patógeno mais comum, seguido de *Staphylococcus* Coagulase Negativa (CoNS) e *Klebsiella spp.* (13,2%).

Em 2012, outro estudo foi realizado no Brasil por Martins e colaboradores, em cinco hospitais abrangendo apenas pacientes internados em UTI. Nesse estudo foi demonstrado que a maioria dos isolados de *A. baumannii* (66,4%) estava presente no trato respiratório inferior, e em menor proporção no sangue (9,67%), urina (8,4%) e em culturas de feridas (6,99%).

2.1.5 Genoma

O genoma de *A. baumannii* apresenta um tamanho de 3.48 a 4.22 Mb, com conteúdo GC variando de 38.9% a 39.3%, além de possuir aproximadamente 4.010 genes que codificam 3.956 proteínas (Figura 5) (SMITH *et al.*, 2007).

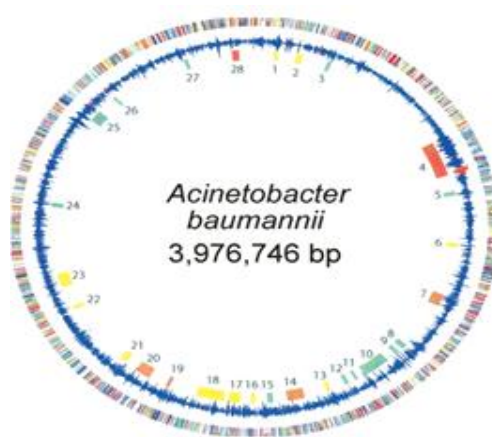


Figura 5: Mapa circular do genoma de *A. baumannii*.
Fonte: Smith *et al.*, 2007.

Todos os isolados dessa espécie contêm pequenas regiões genéticas altamente conservadas que codificam proteínas com funções envolvidas na replicação, transcrição e

tradução do DNA, bem como em várias vias metabólicas (ZHU *et al.*, 2013). Essas regiões abrangem diversos fatores de virulência partilhados pela maioria dos isolados, representando, assim, determinantes de patogenicidade intrínsecas (IMPERI *et al.*, 2011). Além disso, esse microrganismo também possui no seu genoma uma classe D de oxacilinase intrínseca, pertencente ao grupo de enzimas oxa-51 que constitui mais de 40 sequências variantes. A natureza ubíqua dos genes oxa-51 nessa bactéria tornou este gene um marcador genético importante na identificação desse microrganismo (HOWARD *et al.*, 2012).

Adicionalmente, *A. baumannii* apresenta regiões acessórias relativamente grandes nas suas sequências genômicas, com numerosos determinantes de resistência aos antimicrobianos e também de virulência, provavelmente adquiridos por processos de transferência horizontal de genes (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

Notavelmente, essa bactéria apresenta capacidade para adquirir e reorganizar determinantes genéticos que desempenham um papel crítico na sua patogenicidade, como os sistemas de aquisição de ferro, heme e acinetobactina (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

Por sua vez, infecções provocadas por esse patógeno tornam-se cada vez mais problemáticas, devido ao número elevado de genes de resistência encontrados em isolados clínicos. Alguns isolados são resistentes a todos os antimicrobianos conhecidos (MARAGAKIS; PERL, 2008). Essa resistência surge por uma combinação de mudanças genéticas e de pressão seletiva. Três classes de alterações genéticas contribuem para a aquisição de um fenótipo de resistência: transferência horizontal de genes, amplificação de genes (por duplicação e/ou aumento da expressão), e mutação dos genes ou dos seus promotores (resultando em perda ou aumento de função) (ADAMS *et al.*, 2011). A capacidade de *A. baumannii* para adquirir mecanismos de resistência a antimicrobianos tem permitido que este microrganismo persista em ambientes hospitalares e facilitou o surgimento global de isolados multi drogas resistente (McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

No geral, a análise do genoma de *A. baumannii* confirma a natureza multifatorial e combinatória de fatores de virulência desse microrganismo (IMPERI *et al.*, 2011). Essa bactéria ganhou uma posição de liderança entre os patógenos oportunistas, e a sua propensão para adquirir material genético exógeno, sugere que eventos de transferência horizontal de genes podem ocorrer com espécies filogeneticamente relacionadas que estejam compartilhando o mesmo nicho ecológico, tais como ambiente hospitalar ou superfícies de pele e mucosas de hospedeiros colonizados (IACONO *et al.*, 2008).

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1 Características gerais

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo, aeróbico, não formador de esporos, pertencente à família Pseudomonadaceae (WHO, 2006). Mede de 1 a 5 μm de comprimento e 0,5 a 1 μm de largura. Possui flagelos polares e fímbrias, pequenos filamentos, aderidos à sua superfície, o que lhe confere intensa motilidade (Figura 6 (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006)). É um patógeno oportunista e ubíquo presente em muitos cenários ambientais e que pode causar infecções em plantas, animais e humanos. A habilidade de sobreviver em mínimas condições nutricionais e de suportar uma variedade de condições físicas tem permitido a este microrganismo persistir tanto em ambiente comunitário quanto hospitalar (MATHEE *et al.*, 2007; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).



Figura 6: Microscopia eletrônica de bacilos de *P. aeruginosa*.

Fonte: <http://www.pseudomonas.com/>.

Para a identificação bioquímica da espécie, devem ser consideradas algumas características metabólicas: *P. aeruginosa* é não fermentadora de carboidratos, é produtora de 3 citocromo-oxidase, utiliza o nitrato em substituição ao oxigênio como aceptor final de elétrons, produz Arginina dehidrolase e Ornitina-descarboxilase (MENEZES *et al.*, 2004) e sintetiza um exopolissacarídeo mucóide, o alginato (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Além disso, essa espécie produz pigmentos fluorescentes e solúveis em água, como a piocianina e a pioverdina. A piocianina é produzida por mais da metade dos isolados clínicos, apresenta-se azul ou verde em pH neutro ou alcalino, sendo a origem do nome aeruginosa (GIAMARELLOU, 2002).

A transmissão da *P. aeruginosa* pode acontecer pelo contato direto entre pessoas contaminadas e via reservatórios ambientais (GASPAR *et al.*, 2013). Esta bactéria é responsável por infecções graves, na maioria das vezes, nosocomiais, e geralmente acomete indivíduos imunocomprometidos, principalmente àqueles com neutropenia e queimaduras

graves, além de ser o patógeno mais comum encontrado nas vias aéreas de pacientes com Fibrose Cística (FC) (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; WOODWARD *et al.*, 2010; GASPAR *et al.*, 2013; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

2.2.2 Patogenicidade

Normalmente, todos os casos de infecção por *P. aeruginosa* estão associados com o comprometimento da defesa imune do hospedeiro, que o predispõe a uma variedade de infecções bacterianas e fúngicas. Há uma gama de doenças humanas causadas por *P. aeruginosa*, dentre elas destacam-se a bacteremia em vítimas de queimaduras graves, infecção pulmonar crônica em pacientes com FC e ceratite ulcerativa aguda em usuários de lentes de contato gelatinosas de uso prolongado (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000).

A patogenicidade desse microrganismo está associada à sua capacidade invasiva e toxigênica e apresenta um caráter multifatorial, em que é determinada por inúmeros fatores de virulência durante o processo infeccioso (LIVERMORE, 2002). Dentre eles destacam-se os fatores de virulência da superfície das células bacterianas (flagelo, fímbrias, lipopolissacarídeo e alginato), fatores de virulência secretado (piocianina, pioverdina, proteases, elastases, fosfolipídeo C e exotoxina A) e o sistema de secreção tipo III (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

Esse patógeno possui um único flagelo polar e numerosas fímbrias pequenas tipo 4 também localizadas no pólo da célula (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Ambas as estruturas protéicas são responsáveis pela motilidade da espécie (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; GELLATLY; HANCOCK, 2013). O flagelo é o principal meio de motilidade da bactéria, movimenta-se em forma de hélices ou parafusos, enquanto que a motilidade mediada pelas fímbrias, deve-se a propriedades contráteis destas estruturas, o que permite que a bactéria se espalhe ao longo de superfícies hidratadas. Esta última característica facilita a rápida colonização das vias aéreas (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

Adicionalmente, o flagelo e as fímbrias também desempenham um papel crucial na fase de adesão e colonização de *P. aeruginosa*. Durante a infecção, a bactéria pode se aderir às células epiteliais do hospedeiro através da ligação do flagelo e das fímbrias, que são importantes adesinas, a um glicolipídeo de membrana, o asialo GM1, iniciando, desta forma, uma forte resposta inflamatória (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; GELLATLY; HANCOCK, 2013). Estudos tem demonstrado claramente que as bactérias deficientes em qualquer uma destas estruturas têm virulência reduzida, tanto na sua capacidade de persistir

quanto na capacidade para difundir-se pelo organismo do hospedeiro (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000).

Além disso, *P. aeruginosa* possui uma membrana externa composta principalmente de lipopolissacarídeo (LPS), que associa um domínio hidrófobo, lipídio A, a uma cauda hidrofílica composta de polissacarídeos específicos “O”. As variações nas cadeias deste polissacarídeo são a base para a identificação antigênica dos sorotipos da espécie. O LPS também desempenha um papel de adesão na bactéria através da ligação ao asialo GM1 (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

Um exopolissacarídeo mucóide, o alginato, também produzido por essa espécie, realiza um papel similar ao LPS, funcionando como uma adesina, ancorando a bactéria para colonizar o epitélio respiratório (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). A infecção inicial provocada por essa bactéria é causada pela produção de toxina (PALLERONI, 1998) e usualmente envolve uma cepa não-mucóide, que é capaz de penetrar nas mucosas do hospedeiro através da atividade flagelar e apresentam-se sensíveis à antibioticoterapia (GASPAR *et al.*, 2013). Em contrapartida, quando a infecção não é identificada e tratada precocemente, sobretudo em pacientes com FC, evolui para a forma crônica e em resposta as reações inflamatórias do hospedeiro a bactéria aumenta a síntese de alginato. Esta síntese exacerbada de alginato (biofilme) protege a bactéria da fagocitose, respostas imunes do hospedeiro e do tratamento com antimicrobianos, tornando a cepa resistente (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; GASPAR *et al.*, 2013).

Numerosos efeitos patogênicos da *P. aeruginosa* são produzidos pela Piocianina, um pigmento azul-esverdeado secretado por esta bactéria que confere uma coloração peculiar às suas colônias. Este metabólito causa estresse oxidativo ao hospedeiro, interrompe o transporte de elétrons mitocondrial, induz a apoptose em neutrófilos, bem como inibe a fagocitose dos corpos apoptóticos pelos macrófagos (Figura 7) (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Outro fator de virulência secretado por este patógeno oportunista é a pioverdina, um sideróforo quelante de ferro, que regula a secreção de outros fatores de virulência, como a exotoxina A e uma endoprotease (Figura 7) (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

A disseminação da *P. aeruginosa* pelo hospedeiro também é parcialmente dependente da produção de elastase bacteriana, secretada pelo sistema de secreção tipo II e outras proteases, secretadas pelo sistema de secreção tipo I (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Esse microrganismo produz duas elastases, LasA e LasB (GELLATLY; HANCOCK, 2013), que degradam as proteínas colágeno e não-colágeno, e rompem a integridade da membrana basal do hospedeiro (LYCZAK; CANNON;

PIER, 2000). A elastase, também desempenha um papel crucial na patogênese das infecções respiratórias provocadas por *P. aeruginosa* através da ruptura do epitélio respiratório, aumentando assim a permeabilidade epitelial e facilitando o recrutamento de neutrófilos, além de diminuir a resposta imune do hospedeiro por clivar proteínas surfactantes A e D do trato respiratório, aumentar os níveis de IL-8 e inativar o receptor 2 de proteases (Figura 7) (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

Várias proteases, como a protease alcalina e a protease IV, uma protease serina, também são secretadas por esta bactéria. Estas proteases tem papel estabelecido em infecções oculares e em sepse, onde podem degradar imunoglobulinas e fibrinas, além de romper células epiteliais (Figura 7) (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Através do sistema de secreção tipo II, a *P. aeruginosa* também secreta outros fatores de virulência, como a Fosfolipase C e a Exotoxina A. Ambos são secretados no espaço extracelular. A Fosfolipase C participa da patogênese das lesões pulmonar aguda e de inflamações. Assim como a elastase, parte do efeito patogênico da Fosfolipase C é devido à inativação surfactante (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; GELLATLY; HANCOCK, 2013). Além disso, podem suprimir a resposta oxidativa dos neutrófilos dos hospedeiros. O outro fator de virulência secretado pelo sistema de secreção II é a exotoxina A, responsável por deprimir o sistema imune do hospedeiro (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006) (Figura 7).

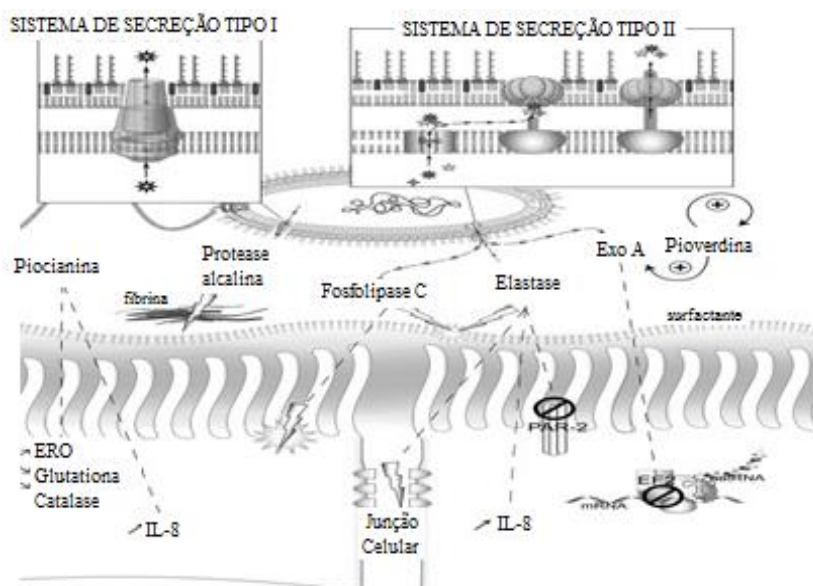


Figura 7: Esquema dos Sistemas de Secreção tipo I e II de *P. aeruginosa*.
Fonte: Adaptado de Kipnis; Sawa; Wiener-Kronish, 2006.

A capacidade toxigênica de *P. aeruginosa* depende do sistema de secreção tipo III, que insere toxinas diretamente na célula hospedeira, através de um apêndice em forma de agulha que forma um poro na membrana das células afetadas, permitindo a translocação de proteínas efetoras da bactéria para o hospedeiro (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Esse sistema é o maior determinante de virulência desse patógeno e sua expressão está frequentemente associada com graves infecções invasivas e com o aumento da mortalidade em pacientes infectados (GELLATLY; HANCOCK, 2013). São quatro as toxinas conhecidas, ExoY, ExoS, ExoT e ExoU, que são expressas variavelmente em diferentes isolados (Figura 8) (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

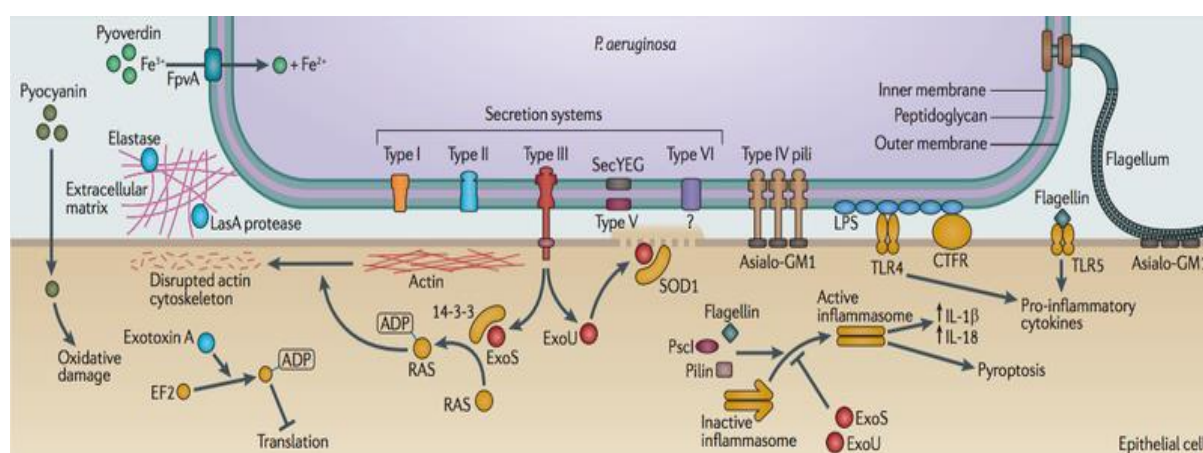


Figura 8: Esquema dos fatores de virulência de *P. aeruginosa*, destacando o sistema de secreção tipo III.

Fonte: http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Paeruginosa_path.png

2.2.3 Impacto clínico de infecções causadas por *P. aeruginosa*

As infecções causadas por *P. aeruginosa* estão associadas a um alto padrão de mortalidade e são difíceis de serem erradicadas do sangue ou de tecidos infectados, porque esses microrganismos são altamente virulentos e têm uma suscetibilidade limitada aos antimicrobianos (LOUREIRO *et al.*, 2002).

Conhecido por ser um patógeno oportunista, essa espécie coloniza principalmente pacientes que sofreram traumas ou com alguma quebra das barreiras cutâneo-mucosas, como ventilação mecânica, traqueostomia, cateteres, cirurgia ou queimaduras graves. Adicionalmente, podem causar infecções do trato urinário, do sistema respiratório, dermatite, infecções dos tecidos moles, bacteremia e uma variedade de infecções sistêmicas, particularmente em doentes que estão gravemente imunocomprometidos (PALLERONI, 1998; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

É um importante patógeno respiratório em pacientes com FC, doença genética que apresenta como manifestações clínicas principais a doença pulmonar obstrutiva crônica e a insuficiência pancreática exócrina. Apesar da terapia intensiva com antimicrobianos e os mecanismos de defesa do sistema imunitário do hospedeiro, *P. aeruginosa* tem a capacidade de sobreviver e persistir durante anos nos pulmões de pacientes com FC, devido aos seus mecanismos adaptativos, como a capacidade de formar biofilmes, desenvolver um fenótipo mucóide e perder as porinas das membranas (que são extremamente importantes para a difusão dos antimicrobianos), ou, até mesmo, desenvolver um mecanismo ativo de efluxo de drogas (GASPAR *et al.*, 2013). Além disso, essa bactéria causa comumente pneumonia, principalmente em pacientes com neutropenia, imunossuprimidos e que estão passando por ventilação mecânica (KNOWLES, GILLIGAN & BOUCHER, 1995; BARTH & PITT, 1998; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

Uma das características de *P. aeruginosa* em infecções respiratórias crônicas é a elevada prevalência de isolados hipermutáveis (OLIVER & MENA, 2010). Estas variantes são encontradas em 30 a 60% de pacientes com FC podendo apresentar um aumento de até 1000 vezes na taxa de mutação (OLIVER, 2010).

Essa espécie é especialmente problemática quando acomete pacientes gravemente hospitalizados em UTI (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Uma característica marcante das infecções adquiridas em UTI é a multirresistência (SADER *et al.*, 1993; GOLDMANN & HUSKINS, 1997). Os percentuais de resistência são mais elevados nas amostras isoladas nestas unidades de tratamento, refletindo maior intensidade de uso de antimicrobianos nesse ambiente, e, possivelmente, transmissão de isolados multirresistentes entre os pacientes. As infecções causadas por esse microrganismo são frequentemente difíceis de tratar devido à sua virulência e resistência antimicrobiana (EL SOLH & ALHAJHUSAIN, 2009). Por fim, *P. aeruginosa* interage com células hospedeiras desencadeando a formação de feridas ou na deterioração adicional das defesas do hospedeiro (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

2.2.4 Epidemiologia

Pseudomonas aeruginosa é cosmopolita em sua distribuição, sendo isolada do solo, de plantas, de animais e de humanos. As mínimas necessidades nutricionais, evidenciadas por sua capacidade de crescer em água destilada e sua tolerância a uma ampla variedade de

condições físicas, incluindo temperatura, contribuem para o sucesso ecológico dessa espécie e, em última análise para seu papel como agente oportunista (KISKA E GILLING, 1999).

Este patógeno oportunista e ubiqüitário têm sido frequentemente encontrado em diversos sítios hospitalares, como em pisos, grades de cama, pias, em mãos dos enfermeiros (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000), além de persistir e multiplicar-se em equipamentos (GASPAR *et al.*, 2013), principalmente os de terapia respiratória (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009), o que sugere que altos padrões de higiene devem ser aplicados na tentativa de minimizar o risco de infecção cruzada (GASPAR *et al.*, 2013). Reservatórios comunitários deste microrganismo incluem antissépticos, sabões, pias, espanadores, piscinas de fisioterapia e hidroterapia, banheiras de hidromassagem, soluções para lentes de contato, umidificadores de casa, solo e a rizosfera, e os legumes (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

Pseudomonas aeruginosa é raramente um membro da flora microbiana normal em humanos. As taxas de colonização representativas para sítios específicos em humanos são de 0 a 2% para a pele, 0 a 3,3% para a mucosa nasal, 0 a 6,6% para a garganta, e 2,6 a 24% para amostras fecais. Entretanto, o rompimento da flora bacteriana normal é frequentemente observado em pacientes hospitalizados na qual a taxa de colonização pode exceder 50%, especialmente em pacientes que tenham sofrido traumas, quebra da barreira cutâneo-mucosa ou que estão com a imunidade debilitada (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Essa taxa de colonização aumenta com o tempo de permanência no hospital e com o uso de antimicrobianos.

Em pacientes com FC, *P. aeruginosa* é o agente patogênico de maior prevalência e que infecta 54,4% de toda a população que sofre com essa patologia, sendo que a maioria (80%) dos pacientes acometidos é jovem com idade aproximada aos 18 anos (GASPAR *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos, é a segunda causa de pneumonias nosocomiais (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009), entretanto é a bactéria, entre todos os patógenos hospitalares, que lidera casos de pneumonia pediátrica em UTI (JONES *et al.*, 2009); é a terceira causa mais comum de infecções do trato urinário e é o patógeno mais frequentemente isolado em infecções de sítio cirúrgico. No Brasil, é o segundo agente patogênico mais isolado em infecções de sítio cirúrgico e o sexto em infecções da corrente sanguínea (SADER *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil pelo *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), programa mundial e longitudinal de vigilância de resistência a antimicrobianos, mostraram que *P. aeruginosa* foi o patógeno mais frequente (30,1%) isolado

do trato respiratório inferior de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros (SADER *et al.*, 2001). Em 2003, Kiffer e colaboradores realizaram um estudo referente à susceptibilidade de bactérias Gram-negativas envolvidas em infecções hospitalares como parte do programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*). Este programa realiza um trabalho de vigilância global, anual e multicêntrico que compara a atividade de vários agentes antimicrobianos de amplo espectro entre centros médicos que utilizam carbapenêmicos. Neste estudo, *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais prevalente (30,3%) entre os isolados estudados. Recentemente, essa espécie também apresentou maior prevalência (26%) entre os isolados clínicos provenientes de um hospital universitário na cidade de Recife, Pernambuco (PIRES *et al.*, 2009).

2.2.5 Genoma

O sucesso de *P. aeruginosa* como um agente oportunista deve-se substancialmente à sua versatilidade e adaptabilidade codificada no seu genoma. Comparada com muitas outras bactérias que causam doenças em humanos, esse microrganismo tem um genoma relativamente grande, variando de 6.22 a 6.91 Mb (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Quando comparadas as cepas de referência, como a PAO1 e PA14, observa-se um grande número de regiões conservadas, em torno de 89 a 98%, entre o genoma desta espécie (Figura9) (LEE *et al.*, 2006). A conservação notável de genes que codificam proteínas associadas com a virulência indica que a maioria dos isolados independentemente da fonte, possuem os mecanismos patogênicos básicos necessários para causar uma grande variedade de infecções em humanos (WOLFGAN *et al.*, 2003).

Essas estruturas conservadas presentes no genoma da *P. aeruginosa* são interpassadas por regiões de plasticidade, que são específicas de cada cepa, adquiridas através da transferência horizontal de blocos de genes e/ou pela deleção de segmentos cromossômicos específicos (MATHEE *et al.*, 2007; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

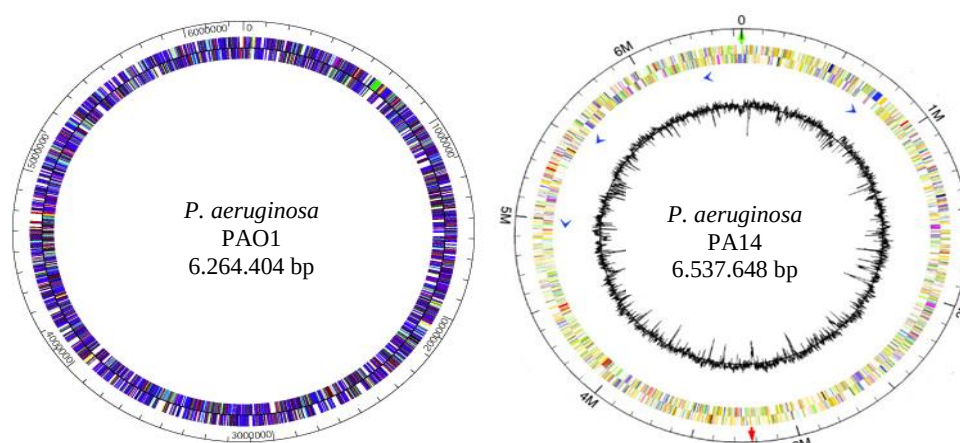


Figura 9: Mapa circular dos genomas das cepas de *P. aeruginosa* PAO1 e PA14.

Fonte: Adaptado de Lee *et al.*, 2006; <http://www.pseudomonas.com/>

Pseudomonas aeruginosa tem a maior proporção (8,4%) de genes regulatórios observados entre os genomas bacterianos sequenciados. Diferindo da *Escherichia coli* que apresenta 5,8%, do *Bacillus subtilis* com 5,3% e do *Mycobacterium tuberculosis*, que possui um genoma com tamanho similar ao da *P. aeruginosa*, porém apresenta uma quantidade bem inferior de genes regulatórios, em torno de 3% (STOVER *et al.*, 2000). Esta elevada quantidade de genes regulatórios presentes no genoma da *P. aeruginosa* poderia explicar a adaptabilidade desta bactéria a tantos ambientes e a sua impressionante variedade de mecanismos patogênicos (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

Outra faceta do genoma da *P. aeruginosa* é o grande número de genes parálogos, que surgiram por duplicação gênica, com a finalidade de criar famílias de produtos de genes que se sobrepõem funcionalmente, mas que têm propriedades distintas ou que são regulados de formas diferentes (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Observa-se, também, um grande número de genes envolvidos no catabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos, além da produção de enzimas que conferem resistência aos antimicrobianos (VAHDANI *et al.*, 2012). Essas características, em conjunto com o tamanho e a complexidade do genoma, refletem a adaptação evolutiva dessa espécie e sua resistência a um amplo espectro de antimicrobianos (STOVER *et al.*, 2000).

2.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Infecções comunitárias e hospitalares provocadas por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* apresentam notoriamente um sério desafio terapêutico, sendo essencial a seleção do antimicrobiano apropriado para iniciar o tratamento dessas infecções, a fim de que o resultado clínico seja otimizado. Entretanto, a seleção do antimicrobiano mais adequado é bastante

complicada, devido à capacidade que esses microrganismos têm em desenvolver resistência a múltiplas classes de agentes antimicrobianos, mesmo durante o decurso do tratamento (MARAGAKIS; PERL, 2008; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

Estudos revelam que as infecções provocadas por isolados multidrogas resistentes (MDR), que possuem resistência a três ou mais classes de drogas, estão associadas com o aumento significativo da morbidade, mortalidade, necessidade de intervenção cirúrgica, além do aumento do tempo de internação e do custo total do tratamento da infecção (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; ZAVASCKI, *et al.*, 2010).

Essas bactérias apresentam mecanismos de resistência bastante similar, e podem adquirir genes de resistência entre si e/ou de outras espécies de microrganismos (MARAGAKIS; PERL, 2008). *A. baumannii* e *P. aeruginosa* apresentam três mecanismos principais de resistência: intrínseca, adquirida ou adaptativa. Algumas vezes, esses três mecanismos podem estar presentes em um mesmo isolado (GELLATLY; HANCOCK, 2013), tornando a sua erradicação um desafio para os médicos (ZAVASCKI *et al.*, 2010).

A resistência intrínseca é devido, principalmente, à baixa permeabilidade das suas membranas externas, a expressão constitutiva da bomba de efluxo (Mex), e a produção de uma β -lactamase cromossômica induzível, a AmpC e de oxacilinases (MARAGAKIS; PERL, 2008; ZAVASCKI, *et al.*, 2010; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

É estimado que a permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa* seja de 10 a 100 vezes menor do que a de outros microrganismos, como por exemplo, *E. coli*, além de possuir menor quantidade de canais de porinas, canais, estes, formados por proteínas, tais como a OprF, OprD e OprB, e que estão localizados dentro da membrana externa da bactéria, sendo a porta de entrada de diversos antimicrobianos, como os β -lactâmicos (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Em *A. baumannii*, as proteínas que compõe a sua membrana externa são a HMP-AB, CarO e OmpW, sendo a sua maior proteína, HMP-AB, homóloga a OprF de *P. aeruginosa*. A baixa permeabilidade das membranas desses dois microrganismos, que limita a taxa de penetração de moléculas de antimicrobianos em suas células, associada à ineficiência nos canais de porina, tornam estas bactérias resistentes a uma gama de antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e os β -lactâmicos (BREINDENSTEIN *et al.*, 2011; MARAGAKIS; PERL, 2008).

Outro mecanismo relacionado à resistência intrínseca é a expressão constitutiva da bomba de efluxo (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Uma análise do genoma de *P. aeruginosa* revela a existência de 12 sistemas de bombas de efluxo, porém apenas a

funcionalidade de seis sistemas foi confirmada experimentalmente (SCHWEISER *et al.*, 2003). Essas bombas podem ejetar vários antimicrobianos, como cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprima, além de detergentes. Entretanto, representantes das classes das penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas conseguem superar as defesas inerentes a *P. aeruginosa* e são ativos contra a maioria dos isolados. Todos, no entanto, são propensos a serem comprometidos pela resistência mutacional, como por exemplo, mutações das enzimas topoisomerasas II e IV que resulta em resistência as fluoroquinolonas (LIVERMORE *et al.*, 2002).

A bomba de efluxo usualmente presente em isolados de *A. baumannii*, é a AdeABC. Esta bomba confere resistência a uma ampla gama de antimicrobianos, como os aminoglicosídeos e, quando super expressada, diminui a susceptibilidade as fluoroquinolonas, tetraciclina, tigeciclina, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprima e meropenem (MARAGAKIS; PERL, 2008; ZAVASCKI *et al.*, 2010).

Além disso, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* produzem baixos níveis de AmpC, sendo susceptíveis a terapia com penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Em contrapartida, quando a produção de AmpC é significativamente aumentada, a *P. aeruginosa* desenvolve resistência a todos os fármacos β -lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos. A maneira como esses mecanismos funcionam não estão totalmente elucidados. Mas, acredita-se que a superprodução de AmpC aliada a mecanismos de resistência adicionais contribuiria significativamente para a resistência desta bactéria aos carbapenêmicos (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

Esses patógenos produzem uma enzima denominada oxacilinase. Essa enzima recebe essa designação devido ao seu alto potencial de atividade hidrolítica contra cloxacilina, oxacilina e metilcilina. São diversas as oxacilinas codificadas por *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, dentre elas destacam-se a oxa-50, uma oxacilinase com propriedade carbapenêmica produzida por *P. aeruginosa*, e a oxa-51, intrínseca de *A. baumannii*, que possui propriedades β -lactâmicas, além de aumentar a hidrólise ao imipenem (ZAVASCKI *et al.*, 2010).

Em adição a elevada resistência intrínseca, esses patógenos podem apresentar dois mecanismos de resistência adquirida: a transferência horizontal de elementos genéticos e a resistência mutacional (ZAVASCKI *et al.*, 2010; BREIDENSTEIN *et al.*, 2011). Elementos de DNA, incluindo plasmídeos, transposons, integrons, profagos e ilhas de resistência podem ser transferidos entre as bactérias via conjugação, transformação ou por transdução, podendo

conferir resistência a um ou mais antimicrobianos (ZAVASCKI *et al.*, 2010; BREIDENSTEIN *et al.*, 2011; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

A resistência adaptativa acontece quando condições tais como exposições a concentrações antimicrobianas subinibitórias, formação de biofilmes e motilidade do tipo *swarming* levam ao aumento da resistência. Essas condições aumentam a regulação de genes que podem conferir resistência (BREIDENSTEIN *et al.* 2011).

2.4 Tipagem molecular em *A. baumannii* e *P. aeruginosa*

Nos últimos anos, verificou-se um aumento significativo no desenvolvimento de métodos moleculares para detecção e caracterização de bactérias patogênicas, aumentando assim a compreensão da variabilidade genética inter e intra espécies (GRISSA *et al.*, 2008).

A tipagem molecular utilizada na identificação de bactérias patogênicas é útil, particularmente em situações epidêmicas, pois evidencia a presença de um clone predominante ou a policlonalidade, possibilitando avaliar se a transmissão ocorreu pessoa a pessoa ou se resultou do uso excessivo de antimicrobianos (SAIMAN *et al.*, 2003; KIM, 2009).

Existem vários métodos diferentes para tipagem molecular de bactérias. Entretanto, estes métodos diferem quanto ao custo, tempo de execução (BOTES *et al.*, 2003), poder discriminatório, reprodutibilidade, facilidade de interpretação e de armazenamento dos resultados em bancos de dados (GRISSA *et al.*, 2008).

Segundo Tenover *et al.* (1995), a tipagem molecular tem possibilitado grandes avanços no campo da epidemiologia, pois tem facilitado a identificação de reservatórios, fontes de infecção e cadeias de transmissão. Desta forma, a tipagem deve ser aplicada a isolados que estejam relacionados a pelo menos um dos itens: (1) a uma área específica na qual a infecção está ocorrendo; (2) a um período comum a uma dada infecção, (3) ou a uma fonte comum de infecção.

Diferentes técnicas têm sido empregadas para identificação e comparação de isolados bacterianos, sendo a maioria baseada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (POURCEL *et al.*, 2005; VU-THIEN *et al.* 2007; HAUCK Y *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2013; MARÍM *et al.*, 2013; GOMILA *et al.*, 2013; WOLSKA; KOT, 2013)

Em *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, várias técnicas moleculares vem sendo aplicadas em estudo de tipagem molecular, a exemplo do que pode ser visto nos trabalhos realizados com Ribotipagem (DENAMUR *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 2007), PCR baseado em *fingerprinting* (ELAICHOUNI *et al.*, 1994; ERAÇ *et al.*, 2012), Eletroforese em Gel de

Campo Pulsado (PFGE) (JOHNSON *et al.*, 2007; TURTON; MATOS; PITT, 2009; WANG *et al.*, 2013), tipagem com MLST (KRIZOVA; NERMEC, 2010; GOMILA *et al.*, 2013), Análise de Sequências Relativamente Curtas (CRISPR) (POURCEL *et al.*, 2011; VAN *et al.*, 2012), além da Análise de Múltiplos Locos do Número Variável de VNTR (MLVA) (VU-THIEN *et al.*, 2007; TURTON; MATOS; PITT, 2009; HAUCK *et al.*, 2012). Essas técnicas, na sua maioria, são aplicadas para melhor compreender a epidemiologia da infecção causada por esse microrganismo e/ou para identificação de clones multirresistentes, bem como a existência de alguns complexos clonais dentro de populações distintas (GRISSA *et al.*, 2008).

2.5 Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR) por meio do MLVA

Atualmente, uma das maneiras para avaliar a heterogeneidade genética e a disseminação clonal das espécies presente em populações de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* é por meio da Análise de Múltiplos Locos do Número Variável de VNTR (MLVA) (ONTENIENTE *et al.*, 2003; VU-THIEN *et al.*, 2007; HAUCK *et al.*, 2012; POURCEL *et al.*, 2011). Esta técnica está sendo utilizada com sucesso em diversas espécies bacterianas, como *Bacillus anthracis* (VAN *et al.*, 2007), *Yersinia pestis* (POURCEL *et al.*, 2004), *Mycobacterium tuberculosis* (LIANG *et al.*, 2012), *Legionella pneumophila* (VISCA *et al.*, 2011), *Staphylococcus aureus* (POURCEL *et al.*, 2009), *Coxiella burnetti* (SANTOS *et al.*, 2012), *Brucella melitensis* e *Brucella abortus* (JIANG *et al.*, 2013).

Os locos VNTR consistem em sequências repetitivas (*repeats*) (Figura 10) que sofrem frequentes mutações resultando, na maioria das vezes, em alterações no número de repetições. Essas mutações ocorrem durante a replicação do DNA e podem surgir em combinação com falhas durante o mecanismo de reparo (STRAND *et al.*, 1993). As repetições variam em tamanho, localização, complexidade e modo em que se repetem. Quando possuem entre 6 e 9 pb são denominadas de microsatélites (BJORN *et al.*, 2005).

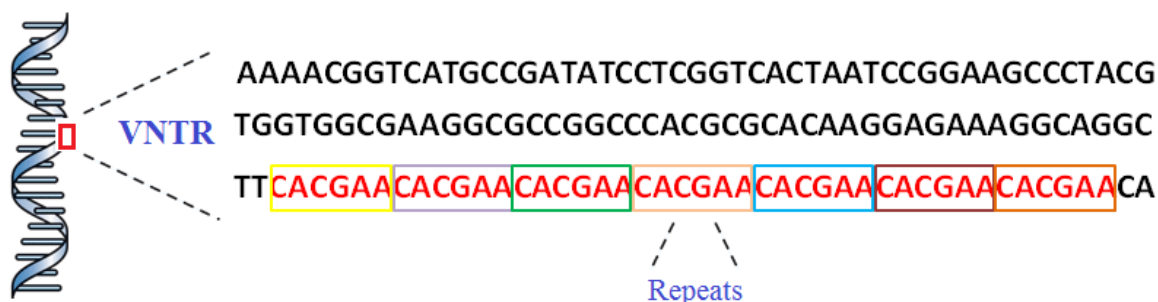


Figura 10: Esquema representativo destacando as unidades de repetições (*repeats*) presentes em um loco VNTR.

Fonte: autor

Em *A. baumannii*, Turton *et al.* (2009) realizaram a análise de 13 locos VNTR, que apresentaram elevada variabilidade genética, embora apenas oito locos tenham amplificado nos isolados analisados. Essa técnica está sendo utilizada rotineiramente, em centenas de isolados, tendo em vista que fornece informações úteis na identificação e diferenciação dos isolados, através de combinações com dados epidemiológicos.

Em 2011, Pourcel e colaboradores analisaram 25 isolados de duas instituições da Europa e sugeriram um esquema com 10 locos VNTR (Abaum_0017, Abaum_0826, Abaum_0845, Abaum_01988, Abaum_2240, Abaum_2396, Abaum_3002, Abaum_3406, Abaum_3468 e Abaum_3530). Dois locos, Abaum_0017 e Abaum_3406, apresentaram problemas na amplificação, devido à presença de bandas duplas e/ou triplas, e amplificação em apenas 50% dos isolados, respectivamente. Diante disso, estes dois locos foram retirados das análises dos perfis genéticos. Esse estudo verificou a adequada reprodutibilidade interlaboratorial dessa técnica e a concordância epidemiológica entre os isolados.

Hauck *et al.* (2012) analisaram 106 isolados de *A. baumannii* em 10 locos VNTR, os mesmos utilizados por Pourcel *et al.* (2011), provenientes de um hospital pediátrico e quatro hospitais militares franceses. Esses autores demonstraram que a incidência crescente de *A. baumannii* em infecções hospitalares requer medidas para caracterizar rapidamente os isolados e identificar clones emergentes, sendo a técnica do MLVA útil para tais pesquisas.

O primeiro estudo baseado na análise dos VNTR em *P. aeruginosa* ocorreu em 2003 com o trabalho de Onteniente e colaboradores. Nesse estudo, foram selecionados e aplicados sete locos VNTR em 89 isolados clínicos, os quais foram subtipados em 71 genótipos distintos, revelando o alto poder discriminatório dessa região do genoma.

Em 2007, Vu- Thien e colaboradores utilizaram um esquema de 15 locos VNTR em *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com Fibrose Cística. Enquanto que, Turton *et al.* (2010) utilizaram 12 locos. Entretanto, este autor, sugeriu um novo esquema simplificado para a amplificação dos locos VNTR em *P. aeruginosa* com a utilização de oito locos polimórficos (ms172, ms207, ms209, ms211, ms213, ms214, ms217 e ms222) um número reduzido quando comparados àqueles descritos previamente (ONTENIENTE *et al.*, 2003; VU-THIEN *et al.*, 2007; TURTON *et al.*, 2009; SOBRAL *et al.*, 2012), porém, sem comprometimento da análise discriminatória destas regiões. Ambos os estudos demonstraram que o MLVA é uma técnica de genotipagem eficiente que pode ser aplicada ao estudo sistemático de *P. aeruginosa*.

A aplicação dessa técnica também tem proporcionado um elevado número de informações para estudos epidemiológicos e de rastreamento de infecções causadas por esse patógeno. Larché *et al.* (2012), por exemplo, determinaram a diversidade genética em

linhagens de *P. aeruginosa* multirresistentes de dois hospitais franceses. Nesse estudo, foram identificados cinco clones e comparado seus genótipos com isolados de outros três países.

Por outro lado, Sobral *et al.* (2012), realizando ensaios automatizados com VNTR por meio de PCR multiplex, genotiparam 83 isolados provenientes de oito pacientes com FC. Os resultados identificaram a presença de um genótipo que persistiu durante oito anos de infecção crônica, além da presença de variantes de VNTR, revelando a evolução das estirpes ao longo do período de infecção.

No Brasil, a análise dos locos VNTR nunca foi realizada nas espécies de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Diante disso, a proposta deste trabalho foi à aplicação do estudo de um esquema simplificado dos locos VNTR como ferramenta para tipagem molecular desses patógenos, a fim de que os resultados obtidos auxiliem na caracterização, verificação da diversidade clonal e persistência desses isolados no cenário hospitalar.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Realizar tipagem molecular de amostras clínicas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* isoladas de um hospital público de Recife, Pernambuco, por meio da análise dos locos VNTR.

3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar o perfil genotípico de cada cepa.
- Investigar a diversidade clonal e persistência dessas espécies no ambiente hospitalar.
- Observar a existência de polimorfismos intra-repeats e sua correlação com os genótipos de cada isolado.
- Analisar as mudanças no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.
- Verificar se há existência de multicolonização por algum desses microrganismos em diferentes sítios de infecção de um mesmo paciente.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. D. *et al.* Comparative Genome Sequence Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, p. 8053-8064, 2008.

BARTH, A. L., PITT, T. L. Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 2, p. 43-61, 1998.

BOTES, J. *et al.* Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of Ribotyping and PFGE: correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 55, p. 231-240, 2003.

BREIDENSTEIN, E. B., FUENTE-NÚÑEZ, C., HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trend in Microbiology**, Cambridge, v. 19, p. 419-426, 2011.

CADY, K. C. *et al.* The CRISPR/Cas Adaptive immune system of *Pseudomonas aeruginosa* mediates resistance to naturally occurring and engineered phages. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, p. 5728-5738.

CERQUEIRA, G. M., PELEG A. Y. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. **IUBMB Life**, London, v. 63, p. 1055-1060, 2011.

CHEN, T. L. *et al.* Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 13, p. 801-806, 2007.

CISNEROS, J. M. *et al.* Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 22, p. 1026-1032, 1996.

DENAMUR, E. *et al.* Complexity of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: combined results from esterase electrophoresis and rDNA restriction fragment length polymorphism analysis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 106, p. 531-539, 1991.

DIJKSHOORN, L., NEMEC, A., SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 939-951, 2007.

DURANTE-MANGONI, E., ZARRILLI, R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. **Future Microbiology**, London, v. 6, p. 407-422, 2011.

ELAICHOUNI, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 666–671, 1994.

EL SOLH, A. A., ALHAJHUSAIN, A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, p. 229–238, 2009.

ERAÇ, B. *et al.* Prevalence of blaPER-1 and integrons in ceftazidime-resistant Gram-negative bacteria at a university hospital in Turkey. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 66, p. 146-148, 2013.

FIESTER, S. E., ACTIS, L. A. Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Future Microbiology**, London, v. 8, p. 345-365, 2013.

FOURNIER, P. E., RICHT, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, p. 692–699, 2006.

FU, J. *et al.* Genetic characterization and authentication of *Lonicera japonica* Thunb. by using improved RAPD analysis. **Molecular Biology Reports**, Basel, v. 40, p. 5993-5999, 2013.

GADDY, J. A., ACTIS, L. A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiology**, London, v. 4, p. 273-278, 2009.

GASPAR, M. C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 32, p. 1231-1252, 2013.

GELLATLY, S. L., HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 61, p. 159-173, 2013.

GOLDMANN, D. A., HUSKINS, W. C. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacterial: a strategic priority for hospitals worldwide. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 24, p. S139-S145, 1997.

GORDON, N. C., WAREHAM, D. W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 35, p. 219-226, 2010.

GRISSA, I. *et al.* On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. **Biochimie**, London, v. 90, p. 660 – 668, 2008.

GOMILA, M. *et al.*, Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. **BMC Microbiology**, London, v. 13, p. 138, 2013.

HAUCK, Y. *et al.* Diversity of *Acinetobacter baumannii* in Four French Military Hospitals, as Assessed by Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, p. e44597, 2012.

HOWARD, A. *et al.* *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, p. 243–250, 2012.

IACONO, M. *et al.* Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, p. 2616-2825, 2008.

IMPERI, F. *et al.* The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. **IUBMB Life**, London, v. 63, p. 1068-1074, 2011.

JIANG, H. *et al.* MLVA Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates from different animal species and humans and identification of *Brucella suis* vaccine strain S2 from Cattle in China. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. e76332, 2013.

JOHNSON, J. K. *et al.* Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 3707–3712, 2007.

JONES, R. N. *et al.* Antipseudomonal activity of piperacillin/tazobactam: more than a decade of experience from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2007). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 65, p. 331–334, 2009.

JOLY-GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 11, p. 868-873, 2005.

LARCHÉ, J. *et al.* Rapid identification of international multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones by multiple-locus variable number of tandem repeats analysis and

investigation of their susceptibility to lytic bacteriophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, p. 6175-6180, 2012.

LEE, D. G. *et al.* Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. **Genome Biology**, London, v. 7, p. R90, 2006.

LIANG, Q. F. *et al.* Preliminary study on the MLVA genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Fujian province. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 33, p. 1167-1170.

LISTER, P.D., WOLTER, D. J., HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, p. 582-610, 2009.

LIVERMORE, D. M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, p. 634-640, 2002.

LOUREIRO, M. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: Study of Antibiotic Resistance and Molecular Typing in Hospital Infection Cases in a Neonatal Intensive Care Unit from Rio de Janeiro City, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 387-394, 2002.

LYCZAK, J. B., CANNON, C. L., PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p. 1051-1060, 2000.

KARAGEORGOPOULOS, D. E., FALAGAS, M. E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 8, p. 751-762, 2008.

KIFFER, C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gramnegative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, p. 216-24, 2005.

KIM, J. Understanding the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Newsletter**, New York, v. 31, p. 17-23, 2009.

KISKA, D. L., GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: Murray RR, Baron EJ, Pfaller MA *et al.* **Manual of clinical microbiology**, p. 517-525, 1999.

KIPNIS, E., SAWA, T., WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 36, p. 78-91, 2006.

KNOWLES, M. R., GILLIGAN, P. H., BOUCHER, R. C. Cystic fibrosis. In: MANDELL, D.; BENETHS, J; DOLIN, R. (eds). **Principles and practice of infectious diseases**. Churchill, 1995.

KRIZOVA, L., NEMEC, A. A 63 kb genomic resistance island found in a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate of European clone I from 1977. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, p. 1915-1018, 2010.

MARRA, A. R. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1866-1871, 2011.

MARAGAKIS, L. L., PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, p. 1254-1263, 2008.

MARÍN, M. *et al.* First case of autochthonous *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 detected in Spain. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, 2013.

MARTINS, A. F. *et al.* High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 40, p. 108-112, 2012.

MATHEE, K. *et al.* Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 3100-3105, 2008.

McCONNELL, M. J., ACTIS, L., PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 37, p. 130-155, 2013.

MENEZES, E. A. *et al.* Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram negativos não fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edílson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – CE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 209 –212, 2004.

MUNOZ-PRICE, L. S., WEINSTEIN, R. A. *Acinetobacter* infection. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 358, p. 1271-1281, 2008.

NOCERA, P. P. *et al.* Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. **BMC Microbiology**, London, v. 11, p. 224, 2011.

OLIVER, A., MENA, A. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 16, p. 798–808, 2010.

OLIVER, A. Mutators in cystic fibrosis chronic lung infection: Prevalence, mechanisms, and consequences for antimicrobial therapy. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 300, p. 563–72, 2010.

ONTENIENTE, L. *et al.* Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 4991-4997, 2003.

PALLERONI, N. J. Introduction to the aerobic pseudomonads. In: Collier, L; Balows, A.; Sussman, M. (eds). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections – Systematic bacteriology**, v. 2, p. 1091-1108, 1998.

PELEG, A. Y., SEIFERT, H., PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, p. 538–582, 2008.

PIRES, E. J. V. C. *et al.* Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 384-390, 2009.

POURCEL, C. *et al.* Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. . **BMC Microbiology**, London, v. 4, p. 22, 2004

POURCEL, C., SALVIGNOL, G., VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, New York, v. 151, p. 653 – 663, 2005.

POURCEL, C. *et al.* Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 3121-3128, 2009.

POURCEL, C. *et al.* Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, p. 539–548, 2011.

SADER, H. S. *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 5, p. 200-214, 2001.

SADER, H. S. *et al.* Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 17, p. 13-18, 1993.

SAIMAN, L. *et al.* Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 24, p. 317-321, 2003.

SANTOS, A. S. *et al.* Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA-typing. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 302, p. 253-256, 2012.

SCHWEIZER, H. P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, p. 48-62, 2003.

SOBRAL, D. *et al.* A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 31, p. 2247–2256, 2012.

STRAND, S. T. A. *et al.* Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, Paris, v. 365, p. 274-276, 1993.

STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, London, v. 406, p. 959–964, 2000.

TANDER REPEATS FINDER. Disponível em: <<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>>. Acesso em: 24 Nov. 2013.

TENOVER, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TURTON, J. F. *et al.* Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of *Acinetobacter baumannii*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 28, p. 499-507, 2009.

TURTON, J. F. *et al.* Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 16, p. 1111-1116, 2010.

VAHDANI, M. *et al.* Phenotypic screening of extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. **Annals of burns and fire disasters**, v. 25, p. 78-81, 2012.

VAN ERT, M. N. *et al.* Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 2, p. e461, 2007.

VISCA, P. *et al.* Investigation of the population structure of *Legionella pneumophila* by analysis of tandem repeat copy number and internal sequence variation. **Microbiology**, New York, v. 157, p. 2582-2594, 2011.

VU-THIEN, H. *et al.* Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 3175-3183, 2007.

WANG, X. *et al.* Clonal diversity of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates revealed by a snapshot study. **BMC Microbiology**, London, v. 13, p. 234, 2013.

WHO. Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating first addendum, v. 1, p. 29; 50; 146; 289-290, 2006.

WIECZOREK, P. *et al.* Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* – the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Warszawa, v. 46, p. 257-267, 2008.

WOODWARD, T. C. *et al.* Budget impact model of tobramycin inhalation solution for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. **Journal of Medical Economics**, v. 13, p. 492–499, 2010.

WOLFGANG, M. C. *et al.* Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 100, p. 8485-8489, 2003.

WOLSKA, K., KOT, B. Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapest, v. 60, 313-328, 2013.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert review of anti-infective therapy**, London, v. 8, p. 71-93, 2010.

ZHU, L. *et al.* Complete genome analysis of three *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in China for insight into the diversification of drug resistance elements. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. e66584, 2013.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Genetic diversity of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Brazil

M. D. V. Santos¹, M. P. S. Barros², V. Silveira-Filho³, C. L. Mendes-Marques², T. C. Leal-Balbino², M. P. C. Silva¹, M. B. M. Oliveira¹

¹Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

²Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE), Recife, Pernambuco, Brazil.

³Department of Biology, Federal University of Pernambuco (UPE), Campus-Garanhuns Center, PE, Brazil.

*Corresponding author

Dr. Maria Betânia Melo de Oliveira

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50670-901, Recife –PE, Brazil.

Phone: +55 (81) 2126 8547 ext. 229; Fax: +55 (81) 2126 8576

E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* are considered opportunistic pathogens responsible for numerous infections and nosocomial outbreaks, besides presenting the ability to resist antimicrobials, leading to stay in hospital. Multiple Locus of VNTR Analysis (MLVA) was performed in 24 clinical isolates of *A. baumannii* and 39 *P. aeruginosa*. The analyses were performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and electrophoresis on 3.0% agarose gel, as well sequencing of the amplified fragments. Eighty-three percent of *A. baumannii* isolates were classified as extensively drug resistant and 17 genotypic profiles (GPA1 - GPA17) were found between the samples analyzed. GPA2 was the most commonly found (0.96%), following by GPA15, GPA3 and GPA8 with 0.72%, 0.48% and 0.48% respectively. The remaining genotypes were unique among the samples. Sixty-seven percent of the *P. aeruginosa* isolates showed high sensitivity to antimicrobials and were distributed into 37 genotypic profiles (GPP1 - GPP37), revealing genetic heterogeneity. Two isolates were grouped into two genotypes (GPP2 and GPP12), and the remaining genotypes belonged to a single sample, suggesting a *P. aeruginosa* multicolonization event. Most samples of both species, although isolated from different sites of infection and hospital sectors and with an interval of weeks and/or months, showed clonal spread, persistence in the hospital environment and increased resistance to antimicrobials, especially those admitted to the Intensive Care Unit (ICU). MLVA proved to be a useful and highly discriminatory technique for the differentiation and characterization of the *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates of the study, facilitating the understanding of the dispersion dynamics in a public hospital in Brazil.

Keywords: MLVA; nosocomial infections; antimicrobial resistance; multicolonization.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* are important opportunistic pathogens, capable of persisting in community and hospital environments, due to their ability to survive under minimum nutritional conditions and tolerate a variety of physical conditions (Fournier; Richet, 2006; Mathee *et al.*, 2007; Lister *et al.*, 2009). Studies in Brazilian hospitals have shown that these microorganisms are among the most prevalent of the isolates (Kiffer *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2011).

Different laboratories assess the genetic diversity of these species through different techniques (Hauck *et al.*, 2012). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Pirnai *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2009) restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Nowak-Zaleska *et al.*, 2008), and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Botes *et al.*, 2003; Villalon *et al.*, 2011), although robust and discriminatory techniques (Sobral *et al.*, 2012), are not easily compared among laboratories or databases (Hauck *et al.*, 2012). In contrast, Multiple Locus of VNTR Analysis (MLVA) provides a code for the number of each locus repetition (Pourcel *et al.*, 2011), which can be easily compared among laboratories (Grissa *et al.*, 2008). This tool has provided a great deal of information for epidemiological studies and tracking of infections. Furthermore, it is a reproducible, low cost and little time consuming technique, as the analysis of the PCR products for most of the loci are assessed on an agarosis gel (Sobral *et al.*, 2012).

MLVA assays of both species were performed with a reduced number of primers as compared to those previously described (Onteniente *et al.*, 2003; Vu-Thien *et al.*, 2007; Turton *et al.*, 2009; Turton *et al.*, 2010; Hauck *et al.*, 2012; Sobral *et al.*, 2012), so that they could be used for routine laboratory monitoring, but without any loss of discriminant analysis of these regions.

In this study, six VNTR loci were studied for *A. baumannii* and for *P. aeruginosa* in order to differentiate, characterize, and verify the clonal diversity and multicolonization of these microorganisms in a public hospital in Pernambuco, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains studied, culture conditions and DNA extraction

A total of 24 *A. baumannii* isolates and 39 *P. aeruginosa* isolates were obtained spontaneously from patients admitted to a public hospital in Pernambuco, Brazil in 2010.

The sites of infection of *A. baumannii* isolates ranged from blood (33.3%), tracheal aspirates (16.7%), rectal swabs (16.7%) and catheter (12.5%), urine (8.3%) and ascitic fluid (4.2%). These isolates were obtained from the Intensive Care Unit (ICU) (45.8%), coronary unit (29.2%), emergency (12.5%), Clinic (8.3%) and neonatal ICU (4.2 %) (Table 1), while the *P. aeruginosa* isolates were obtained from urine (25.2%), blood (18%), wound secretions (18%), tracheal aspirates (12.8%), rectal swabs (7.7%), oral swab (5.1%), bone fragment (2.56%), tissue fragment (2.56%), bronchoalveolar lavage (2.56%), catheter tip (2.56%) and tissue of the feet (2.56%).

The isolates were reactivated in BHI (Brain Heart Infusion Broth) (HiMedia) and incubated at 37 °C for 24 h. Cultures were plated on MacConkey agar selective medium and incubated for 24 h at 37 °C. Genomic DNA was obtained following the methodology described by Keim *et al.* (2000) and adapted by Oliveira *et al.* (2012).

Antibiotic susceptibility testing

Isolates were phenotypically identified and antimicrobial susceptibility characterized by the automated equipment BACTEC 9120 (Phoenix - BD). Antibigram profiles of the isolates were also established by the disk diffusion method according to CLSI standards (2013) on Müller-Hinton agar.

The antimicrobials used in the characterization of isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were the following: cephalosporin (ceftazidime 30µg, cefepime 30µg, cefotaxime 30µg or ceftriaxone 30µg), combinations of penicillin which is a β -lactamase inhibitor (piperacillin + tazobactam 100/10µg), carbapenems (imipenem 10µg and meropenem 10µg), fluoroquinolone (ciprofloxacin 5µg and levofloxacin 5µg), aminoglycosides (gentamicin 10µg, tobramycin 10µg or amikacin 30µg) and polymyxin (polymyxin B 300U). In addition, for the isolates of *A. baumannii* the antimicrobials folate pathway inhibitor (trimethoprim + sulfamethoxazole 25µg) and tetracycline (tetracycline 30µg) were used, while for the isolates of *P. aeruginosa*, monobactam (aztreonam 30µg) was used.

The isolates were classified as multidrug-resistant (MDR) when resistant to one or more agent in three or more categories; extensively drug resistant (XDR) when resistant to one or more antimicrobial agent in at least six categories, in other words, resistant to all except one or two; and non-multidrug-resistant (non-MDR) when susceptible to all

antimicrobial drugs tested and/or resistant to only one drug or two categories of antimicrobials (Magiorakos *et al.*, 2012).

Confirmation and identification of *A. baumannii*

The *bla*_{OXA-51} gene was used to confirm the identification the *A. baumannii* isolates, as described by Woodford *et al.* (2006). For the reactions, 20ng of DNA, 200mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 20 pmol of each oligonucleotide and 1U *Taq* DNA polymerase (Promega®) were used. The conditions used in the thermocycler SpeedCycler² (AnalytikJena) were the following: 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final extension step of 72 °C for 6 min.

Purification and Sequencing of DNA of VNTR loci

Eight loci (Abaum_17, Abaum_845, Abaum_1988, Abaum_2240, Abaum_3002, Abaum_3406, Abaum_3468, Abaum_3530) were selected for isolates of *A. baumannii*, from which four (Abaum_17, Abaum_845, Abaum_3406 and Abaum_3468) are considered microsatellites as they possess repeat units up to 9 pb (Hauck *et al.*, 2012). Concerning the *P. aeruginosa* isolates, six loci (ms172, ms209, ms213, ms214, m217 and ms222) were selected, from which only ms209 is a microsatellite (Vu-Thien *et al.*, 2007).

All isolates were amplified and sequenced using primers described previously by Hauck *et al.* (2012) for *A. baumannii*, and Vu-Thien *et al.* (2007) for *P. aeruginosa*. PCR reactions for the *A. baumannii* isolates were performed as described by Pourcel *et al.* (2011) and for *P. aeruginosa* as described by Turton *et al.* (2010).

All amplification products (5µl) were separated by electrophoresis on a 3.0% agarose gel, under 120 volts for two hours, stained with SYBR Safe (Invitrogen) and images were captured under UV light by the program Image Analysis 1D, version 3.5 (Kodak Digital Science). A 100 bp DNA ladder was used as a molecular weight marker (Invitrogen, Brazil). PCR products were purified using the enzyme ExoSAP-IT® (Affymetrix), following the user's manual. The purified products were sequenced on an Applied Biosystems 3100 automated DNA sequencer using the BigDye Kit (Applied Biosystems, Brazil).

Analysis of VNTR loci

The size of each amplicon was measured by GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>) software. The number of repeat units for the loci with up to 9 bp (Abaum_845, ms207 and ms209) was determined using the Tandem Repeats Finder (TRF) software (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) (Onteniente *et al.*, 2003).

The number of repeats for other loci were estimated by the formula described by Oliveira *et al.* (2012), using the reference strains of *A. baumannii* (ATCC 17978) and *P. aeruginosa* (PAO1) (Vu-Thien *et al.*, 2007; Hauck *et al.*, 2012). In addition, the repeats above 9 bp of *P. aeruginosa* were also analyzed by a table placed in the Web site (<http://mlva.u-psud.fr/pseudomonas/>). Sizes of intermediate repeats were reported as half (0.5) when these presented incomplete repetition units or when there were small losses in the flanking region.

Phylogenetic tree analysis of VNTR loci for each species were constructed using a spreadsheet with the number of repetitions, which was edited into a binary matrix and analyzed by NTSYSpc 2.02e program. A simple pairing method (Simple Matching) was used to evaluate the similarity of the samples and unweighted arithmetic mean grouping (UPGMA) was used for distance calculation and construction of the dendrogram.

Determination of Numerical Index of Discrimination (DI)

The discrimination rate of VNTR loci was calculated using the Hunter and Gaston discriminatory index. This index shows the probability that two related strains can be categorized in the same group (Hunter; Gaston, 1988).

RESULTS

Profile of antimicrobial susceptibility and places of isolation of *A. baumannii*

Twenty isolates of *A. baumannii* (83.3%) presented XDR profiles, three (12.5%) non-MDR and one (4.2%) MDR. All were susceptible to polymyxin B.

Eleven isolates (45.8%) were obtained from the ICU, seven (29.1%) from the Coronary Care Unit, three (12.5%) from Emergency, two (8.3%) from the Clinic and one (4.1%) from the neonatal ICU.

Genetic profile of *A. baumannii*

The gene fragment *bla*_{OXA-51} was amplified in all *Acinetobacter* isolates tested, indicating that these were all isolated from *A. baumannii*, including those previously identified as *Acinetobacter* spp., *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex and *Acinetobacter lowfii/haemolyticus* by the BACTEC (Table 1).

The six VNTR loci tested were amplified in all samples, with the exception of locus ms2240, which was not amplified in two isolates.

Intra-repeats variations were identified in two loci containing repeating units up to 9bp. Mutations were present in the locus Abaum_845 in one repeat of four isolates with substitution of a cytosine for adenine (TCTGTTC → TCTGTTA) and the locus Abaum_3468 with substitution of a guanine for adenine (TGATGGT → TGATGAT) in twelve isolates.

The locus Abaum_845 presented a greater degree of polymorphism, where nine alleles (1 to 28 repeats) were observed, followed by loci Abaum_3468 (5 to 15 repeats) and Abaum_3530 (3 to 8 repeats) with six alleles, and Abaum_1988 (1 to 5 repeats) with four alleles, respectively. Abaum_2240 and Abaum_3002 were less polymorphic, both presented three alleles (0.5 to 4 and 6 to 8 repeats, respectively) (Figure 1).

The *A. baumannii* isolates were grouped into 17 genotypic profiles (GPA1-GPA17) and four isolates (3892, 4128, 4325 and 10029) showed the same genotypic profile (GPA2). The isolates 3892 and 4325 (XDR) were obtained from the same patient in the ICU after a period of two weeks; these bacteria presented additional resistance to tetracycline and tobramycin. The isolate 10029 (XDR) was obtained five months after the 4128 isolate (XDR) and were derived from the Emergency and Coronary Care Unit, respectively (Table 1).

Curiously, the isolates 11403 and 11410 showed distinct genotypic profiles, despite having been obtained on the same day from a single patient in the ICU with XDR profile, but coming from different sites of infection (catheter tip and blood, respectively).

The GPA3 profile grouped two isolates of different origin: the 3923 isolate obtained from the ICU, and 12696 of the Coronary Care Unit. Both were classified as XDR and the 12696 isolate was collected after an interval of eight months from the isolate 3923, which enabled the acquisition of resistance to amikacin in the 12696 isolate (Table 1).

The GPA8 profile grouped the 7616 and 9077 isolates, which were obtained from different hospital sectors: ICU and routine clinical, respectively. The 9077 isolate showed

resistance to β -lactams, quinolones and aminoglycosides, except amikacin, unlike the 7616 isolate (Table 1).

The isolates 11410, 12690 and 14819, all XDR, showed the same genotype (GPA15), even though they were obtained from different patients, sites of infection and hospital sectors (Table 1).

Table 1. Identification of *Acinetobacter* isolates by BACTEC equipment and blaOXA-51 gene, antimicrobial susceptibility, site of infection, hospital sector where they were obtained and their respective genotypes.

Isolates	Date of Isolation	Identification BACTEC	Identification bla _{OXA-51}	Antimicrobial susceptibility	Site of infection	Hospital sector	Genotypic Profile
3891	12/03/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	XDR	Catheter tip	ICU	GPA1
3892	12/03/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Wound secretion	ICU	GPA2
4128	18/03/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Tracheal aspirates	Coronary Care Unit	GPA2
4325	24/03/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Tracheal aspirates	ICU	GPA2
10029	12/08/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Blood	Emergency	GPA2
3923	14/03/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Blood	ICU	GPA3
12696	01/11/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	XDR	Rectal swab	Coronary Care Unit	GPA3
4253	22/03/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Blood	Emergency	GPA4
4672	05/04/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Blood	ICU	GPA5
4840	06/04/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Blood	ICU	GPA6
5591	26/04/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	non-MDR	Blood	Neonatal ICU	GPA7
7616	14/06/2010	<i>A. lowffii/haemolyticus</i>	<i>A. baumannii</i>	non-MDR	Wound secretion	Clinic	GPA8
9077	20/07/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	MDR	Blood	ICU	GPA8
8691	08/07/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Tracheal aspirates	ICU	GPA9
8962	17/07/2010	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>A. baumannii</i>	non-MDR	Ascites fluid	Emergency	GPA10
9093	20/07/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	XDR	Catheter tip	ICU	GPA11
10864	08/09/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	XDR	Tracheal aspirates	Coronary Care Unit	GPA12
11198	18/09/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	XDR	Urine	Clinic	GPA13
11403	22/09/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	XDR	Catheter tip	ICU	GPA14
11410	22/09/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	XDR	Blood	ICU	GPA15
12690	01/11/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Rectal swab	Coronary Care Unit	GPA15
14819	30/12/2010	ABC	<i>A. baumannii</i>	XDR	Urine	Coronary Care Unit	GPA15
12697	01/11/2010	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	XDR	Rectal swab	Coronary Care Unit	GPA16
13921	06/12/2010	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>A. baumannii</i>	XDR	Rectal swab	Coronary Care Unit	GPA17

ABC: *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex

XDR: resistant to ≥ 1 agent in all categories except one or two categories of antimicrobials.

MDR: resistant to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories.

non-MDR: sensitive to all classes tested or drug resistant to only one or two categories of antimicrobials.

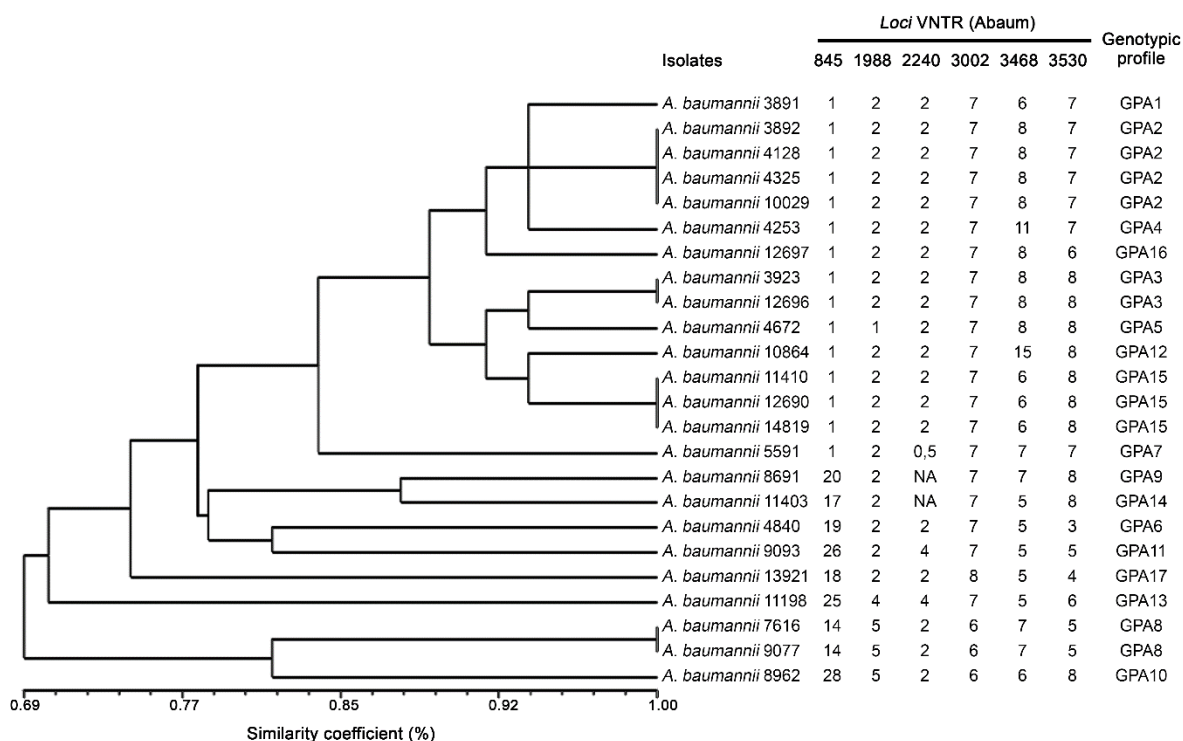


Figure 1. Dendrogram showing the number of repeats in six VNTR loci (Abaum_845, Abaum_1988, Abaum_3002, Abaum_3468, Abaum_3530) and the genotypic profiles of *Acinetobacter baumannii* from clinical isolates.
NA: non-amplified samples.

Profile of antimicrobial susceptibility and places of isolation of *P. aeruginosa*

The pattern of antimicrobial resistance of the 39 *P. aeruginosa* isolates was 66.6% non-MDR, 18% XDR and 15.4% MDR.

Regarding the hospital sectors, eight isolates (20.51%) were from the ICU, seven (17.95%) from the clinic, five (12.82%) from the neonatal ICU, five (12.82%) from clinical medicine, five (12.82%) from cardiology, four (10.26%) from the coronary care unit, two (5.13%) from the surgical clinic, two (5.13%) from the vascular clinic, and one (2.56%) obtained from general surgery (Table 2).

Genetic profile of *P. aeruginosa*

All VNTR loci showed polymorphisms. The ms209 and ms172 loci were the most polymorphic, presenting seven alleles (2 to 9 and 6 to 12 repeats, respectively). On the other hand, the ms22 locus was the least polymorphic, with only four alleles (0.5 to 3 repeats). The other loci showed variable numbers of repeats: ms213 (0.5 to 5 repeats);

ms214 (1 to 5 repeats) and ms217 (0.5 to 4 repeats) (Figure 2). Also, the ms209 locus showed variations in the last repeat (CACGAA→CACGGT) in 35 isolates (89.7%).

In addition, the 7748, 10864, 11198, 12939 isolates had a nucleotide substituted at a single repeat (CACGAA → CATGAA). This substitution was also found in five repeats of the 11352 isolate, three from 9973 and two from the 8542, 6397 and 6509 isolates.

Thirty-seven genotypic profiles were determined among 39 isolates of *P. aeruginosa* (Table 2, Figure 2). The isolates 1858 and 4344 were grouped in the genotype GPP2, the last one was obtained 40 days after the first. During this period, the isolate 4344 developed resistance to aminoglycosides (amikacin, gentamicin and tobramycin) and fluoroquinolones (ciprofloxacin and levofloxacin). Although it acquired specific resistance to certain antimicrobials, the non-MDR profile remained.

The isolates 7748 and 13351 were grouped in the genotype profile GPP12, obtained from a patient hospitalized in the ICU, and from the medical clinic, respectively. The profile of antimicrobial resistance remained the same in this time interval (Table 2, Figure 2). On the other side, isolates 9866, 9868 and 10117, all non-MDR and obtained from the same patient hospitalized in the neonatal ICU, showed distinct genotypic profiles (GPP22, GPP23 and GPP28, respectively). Isolates 13254 and 13351, both XDR and obtained from urine, were also collected from the same patient hospitalized in the medical clinic, with an interval of two days. However, they presented different genotypes, with the isolate 13254 classified as GPP37 and 13351 as GPP12 (Table 2, Figure 2).

The discriminatory index (DI) of the six VNTR loci of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* showed a value of 0.956 and 0.9973, respectively, demonstrating the high discriminatory power of this technique. According to Hunter and Gaston (1988), an index greater than 0.90 can be interpreted as reliable and is thus, desirable.

Table 2. General characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and their genotypic profiles.

Isolates	Isolation	Antimicrobial Susceptibility	Site of infection	Hospital sector	Genotypic Profile
1794	12/02/2010	non-MDR	Blood	ICU	GPP1
1858	13/02/2010	non-MDR	Blood	Surgical Clinic	GPP2
4344	25/03/2010	non-MDR	Wound secretion	Clinic	GPP2
3887	12/02/2010	non-MDR	Blood	Coronary Care Unit	GPP3
4167	19/03/2010	MDR	Bronchoalveolar lavage	Medical Clinic	GPP4
4334	25/03/2010	non-MDR	Urine	Clinic	GPP5
5199	15/04/2010	MDR	Blood	ICU	GPP6
5295	17/04/2010	non-MDR	Blood	General Surgery	GPP7
5386	20/04/2010	non-MDR	Urine	Cardiology	GPP8
6397	18/05/2010	non-MDR	Urine	ICU	GPP9
6494	20/05/2010	non-MDR	Blood	ICU	GPP10
6509	21/05/2010	non-MDR	Tracheal aspirates	Cardiology	GPP11
7748	16/06/2010	XDR	Urine	ICU	GPP12
13351	19/11/2010	XDR	Urine	Medical Clinic	GPP12
8271	29/06/2010	non-MDR	Wound secretion	Clinic	GPP13
8511	05/07/2010	non-MDR	Wound secretion	Clinic	GPP14
8542	05/07/2010	non-MDR	Tracheal aspirates	Coronary Care Unit	GPP15
8689	08/07/2010	XDR	Tracheal aspirates	ICU	GPP16
8711	09/07/2010	XDR	Bone fragment	Medical Clinic	GPP17
8872	13/07/2010	non-MDR	Tissue fragment	Cardiology	GPP18
8963	17/07/2010	non-MDR	Wound secretion	Clinic	GPP19
9089	20/07/2010	non-MDR	Wound secretion	Cardiology	GPP20
9437	29/07/2010	non-MDR	Urine	Surgical Clinic	GPP21
9866	09/08/2010	non-MDR	Rectal swab	Neonatal ICU	GPP22
9868	09/08/2010	non-MDR	Oral swab	Neonatal ICU	GPP23
9886	09/08/2010	non-MDR	Oral swab	Neonatal ICU	GPP24
9894	09/08/2010	non-MDR	Rectal swab	Neonatal ICU	GPP25
9929	10/08/2010	MDR	Urine	Coronary Care Unit	GPP26
9973	12/08/2010	non-MDR	Wound secretion	Clinic	GPP27
10117	17/08/2010	non-MDR	Swab retal	Neonatal ICU	GPP28
10671	31/08/2010	non-MDR	Tracheal aspirates	Medical Clinic	GPP29
10864	08/09/2010	XDR	Tracheal aspirates	Coronary Care Unit	GPP30
11198	18/09/2010	XDR	Urine	Clinic	GPP31
11201	17/09/2010	MDR	Urine	ICU	GPP32
11352	21/09/2010	MDR	Wound secretion	Cardiology	GPP33
11822	05/10/2010	MDR	Catheter tip	Vascular Clinic	GPP34
12939	08/11/2010	non-MDR	Foot tissue	Vascular Clinic	GPP35
13041	10/11/2010	XDR	Blood	ICU	GPP36
13254	17/11/2010	XDR	Urine	Medical Clinic	GPP37

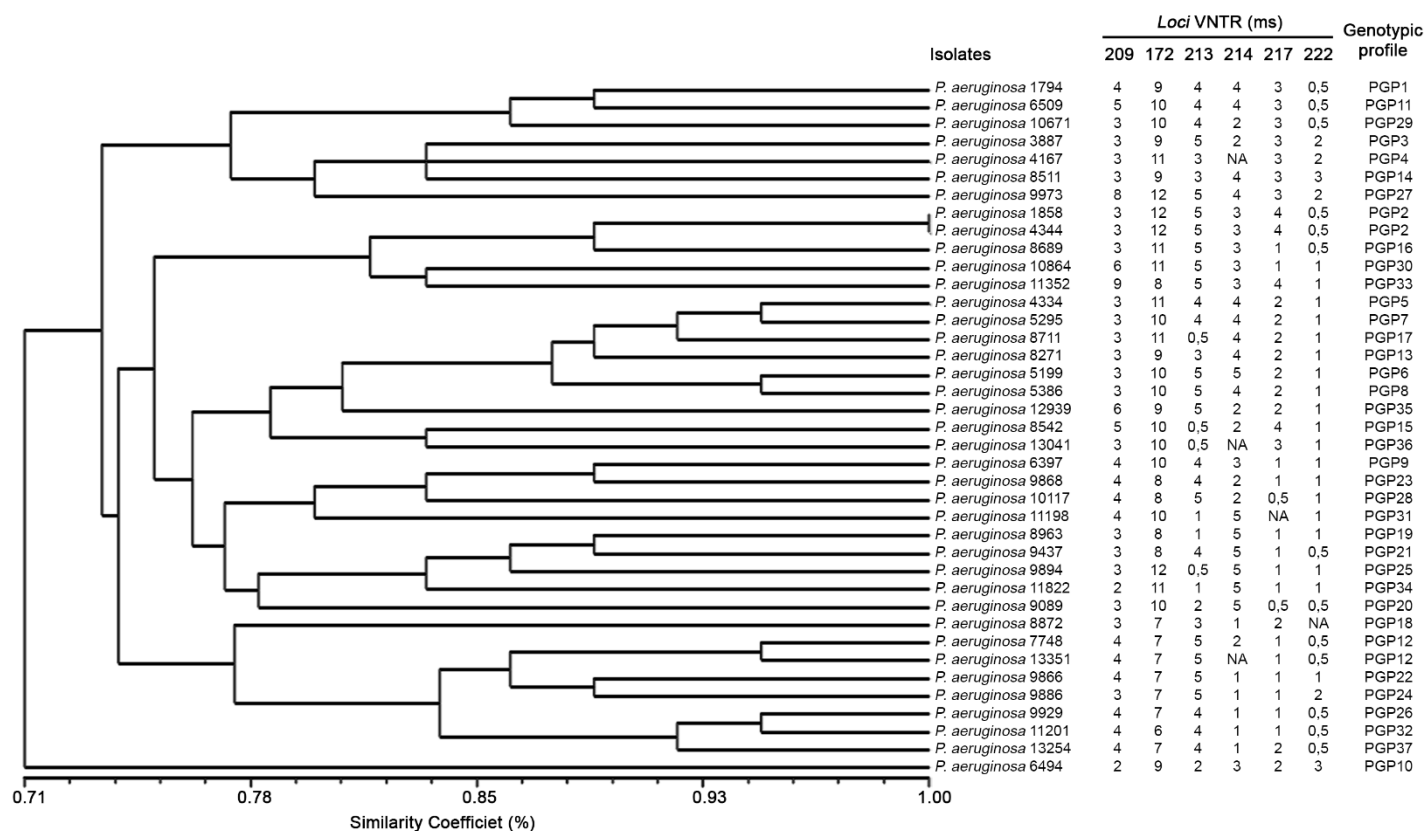


Figure 2. Dendrogram showing the correlation between the alleles of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates with their genotypic profiles.
NA: non-amplified samples.

DISCUSSION

The isolates previously identified as *Acinetobacter* spp., *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex and *Acinetobacter lowfii/haemolyticus* complex were all identified as *A. baumannii*. In order to distinguish *A. baumannii* from these other phenotypically similar species, the presence of the intrinsic enzyme oxacillinase-51 (Durante-Mangoni; Zarrilli, 2011) is necessary.

The data revealed that *A. baumannii* especially affects patients hospitalized in the ICU, and their high rate of antimicrobial resistance makes it difficult to eradicate, which may reflect an increased rate of mortality (Maragakis, Perl, 2008; Munoz-Price; Weinstein, 2008). In contrast, a profile of antimicrobial susceptibility was observed in most isolates of *P. aeruginosa*.

Although isolates of *P. aeruginosa* were obtained from hospitalized patients, it is suggested that they are of community origin, given that the isolates from the hospital

environment are mostly multiresistant (Hota *et al.*, 2009). Another factor that may have caused these high rates of sensitive isolates was the detection of the infection in its early stages (Palleroni, 1998). In this phase of infection, isolates produce small amounts of biofilm alginate and present sensitivity to antimicrobial agents (Kipnis *et al.*, 2006; Gaspar *et al.*, 2013).

Furthermore, bacterial resistance is closely related to antimicrobial use in clinical practice. Prolonged therapy can lead to the development of resistance in microorganisms which were initially sensitive but as a response of the selective pressure to the antimicrobial it gradually acquiring resistance. The emergence and dissemination of resistant microorganisms can also be derived from common mutations in resistance genes and exchange of genetic information among bacteria through gene transfer mediated by plasmids. Currently, the isolation of multiresistant *A. baumannii* and *P. aeruginosa* is frequent, which leads to the increased use of potent antimicrobial agents. This proliferation and global spread of multiresistant bacterial clones could be avoided if efficient laboratory methods in phenotypical detection of emerging resistance mechanisms were used in clinical practice (Giedraitiene *et al.*, 2011).

Some isolates of *P. aeruginosa* did not amplify for the loci ms214, ms217 and ms222. These results may reflect the deletion of part or all elements of the loci, as suggested by Hauck *et al.* (2012).

The intra-repeats analysis of VNTR loci under 9bp did not allow for the establishment of a correlation between the antimicrobial susceptibility profiles and genotypic profiles, suggesting that this tool for molecular epidemiological studies should be used exclusively to investigate variation in the number of repetition units.

This study demonstrated that *A. baumannii* and *P. aeruginosa* can colonize the host at more than one site and that different clones can be present in the same patient, indicating multicolonization events. ICU patients showed different isolates of *A. baumannii*, demonstrating that they have high susceptibility to infection and multicolonization.

Moreover, the identification of the same profiles in different strains of *A. baumannii* (GPA2, GPA3, GPA8, GPA15) and *P. aeruginosa* (GPP2 and GPP12) from different sites of infection and hospital sectors, with intervals of days or months between isolation suggests clonal dissemination and persistence of these microorganisms in the hospital environment. Furthermore, it was also observed that the isolates which had the same alleles acquired resistance to specific antimicrobials after

days and/or months of their isolation. The acquisition of resistance mechanisms and variability of genotypic profiles may reflect of the ability of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* to acquire exogenous genetic material through horizontal gene transfer among strains of the same species and/or phylogenetically related species that share the same ecological niche (Iacono *et al.*, 2008).

In conclusion, the MLVA technique based on the analysis of six VNTR loci showed that isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* obtained at a public hospital in Pernambuco, Brazil, presented high genetic diversity and multiple sources of infection, suggesting that most of these are constantly mutating in the hospital environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ/PE for use of its facilities and the author is thankful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the scholarship support.

REFERENCES

- Botes, J., Williamson, G., Sinickas, V. & Gürtle, V. (2003).** Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of Riboprinting and PFGE: correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1. *J Microbiol Methods* 55, 231-240.
- CLSI (2013).** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; 23th Informational Supplement. M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Durante-Mangoni, E. & Zarrilli, R. (2011).** Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol* 6, 407-422.

Fournier, P. E. & Richet, H. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* **42**, 692–699.

Gaspar, M. C., Couet, W., Olivier, J. C., Pais, A. A. & Sousa, J. J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis* **32**, 1231-1252.

Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R. & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina* **47**, 137-146.

Grissa, I., Bouchon, P., Pourcel, C., Vergnaud, G. (2008). On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* **90**, 660 – 668.

Hauck, Y., Soler, C., Jault, P., Mérens, A., Gérôme, P., Nab, C. M., Trueba, F., Barques, L., Thien, H. V. & others authors (2012). Diversity of *Acinetobacter baumannii* in Four French Military Hospitals, as Assessed by Multiple locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis. *PloS One* **7**, e44597.

Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G. & Gardam, M. A. (2009). Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol* **30**, 25-33.

Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**, 2465-2466.

Iacono, M., Villa, L., Fortini, D., Bordoni, R., Imperi, F., Bonnal, R. J., Sicheritz-Ponten, T., De Bellis, G., Visca, P. & others authors (2008). Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2616-2825.

Jin, H., Xu, X. M., Mi, Z. H., Mou, Y & Liu, P (2009). Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. *Chin Med J* **5**, 301-306.

Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J. & Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **182**, 2928-2936.

Kiffer, C., Hsiung, A., Oplustil, C., Sampaio, J., Sakagami, E., Turner, P., Mendes, C. & MYSTIC Brazil Group (2005). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis* **9**, 216-24.

Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* **36**, 78-91.

Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* **22**, 582-610.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G. & other authors (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **18**, 268-281.

Maragakis, L. L. & Perl, T. M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis* **46**, 1254-1263.

Marra, A. R., Camargo, L. F., Pignatari, A. C., Sukiennik, T., Behar, P. R., Medeiros, E. A., Ribeiro, J., Girão, E. & others authors (2011). Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *J Clin Microbiol* **49**, 1866-1871.

Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R. & others authors (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sciences U S A* **105**, 3100-3105.

Munoz-Price, L. S. & Weinstein, R. (2008). *Acinetobacter* infection. *New Engl J Med* **358**, 1271-1281.

Nowak-Zaleska, A., Krawczyk, B., Kotlowski, R., Mikucka, A. & Gospodarek, E. (2008). 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**, 11-17.

Oliveira MBM, Barros MPS, Silveira-Filho VM, Araújo-Nepomuceno MR, et al. (2012). The genetic diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. *Braz. Genet Mol Res* **11**, 3414-3424.

Onteniente, L., Brisse, S., Tassios, P. T. & Vergnaud G (2003). Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J Clin Microbiol* **41**, 4991-4997.

Palleroni, N. J. (1998). *Introduction to the aerobic pseudomonads*, 2nd edn. Collier, L; Balows, A.; Sussman, M, London: Topley & Wilson's microbiology and microbial infections – Systematic bacteriology.

Park, Y. K., Jung, S. I, Park, K. H., Kim, D. H., Choi, J. Y., Kim, S. H. & Ko, K. S. (2012). Changes in antimicrobial susceptibility and major clones of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex isolates from a single hospital in Korea over 7 years. *J Med Microbiol* **61**, 71-79.

Pires, E. J. V. C., Silva Júnior, V. V., Lopes, A. C. S., Veras, D. L., Leite, L. E. & Maciel, M. A. V. (2009). Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. *Rev Bras Ter Intensiva* **21**, 384-390.

Pirnay, J. P., De Vos, D., Cochez, C., Bilocq, F., Pirson, J., Struelens, M., Duinslaeger, L., Cornelis, P., Zizi, M. & Vanderkelen, A. (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiology* **41**, 1192-1202.

Pourcel, C., Minandri, F., Hauck, Y., D'Arezzo, S., Imperi, F., Vergnaud, G. & Visca P. (2011). Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J Clin Microbiol* **49**, 539–548.

Sáez Nieto, J. A., Marcos, C. & Vindel A. (1998). Multicolonization of human nasopharynx due to *Neisseria* spp. *Int Microbiol* **1**, 59-63.

Sobral, D., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E., Vu-Thien, H., Hormigos, K., Lebeau, B., Loisy-Hamon, F., Munck, A., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2012). A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 2247–2256.

Turton, J. F., Turton, S. E., Yearwood, L., Yarde, S., Kaufmann, M. E. & Pitt, T., L. (2010). Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **16**, 1111-1116.

Turton, J. F., Matos, J., Kaufmann, M. E. & Pitt, T. L. (2009). Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**, 499-507.

Vu-Thien, H., Corbineau, G., Hormigos, K., Fauroux, B., Corvol, H., Clément, A., Vernagnaud, G. & Pourcel, C. (2007). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **45**, 3175-3183.

Villalón, P. Valdezate, S., Medina-Pascual, M. J., Rubio, V., Vindel, A. & Saez-Nieto, J. A. (2011). Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiology* **49**, 875-882.

Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Amyes, S. G. & Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* **27**, 351-353.

6. CONCLUSÕES

A análise dos locos VNTR por meio da técnica do MLVA mostrou-se uma ferramenta promissora na identificação, diferenciação e caracterização dos isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, facilitando a compreensão da dinâmica de dispersão dessas espécies em um hospital público do Brasil.

A disseminação e persistência desses isolados entre os diversos setores hospitalares, deve ser um reflexo da transmissibilidade por meio dos profissionais de saúde, o que demonstra a elevada habilidade que estes patógenos possuem para sobreviver no ambiente hospitalar, além de poder multicolonizar os pacientes, principalmente àqueles internados em UTI.

Os resultados apontam que alterações genéticas e a persistência desses microrganismos, inclusive em um mesmo paciente, podem ser provenientes de falhas terapêuticas, pressão seletiva dos antimicrobianos e/ou transferência horizontal de genes de resistência, podendo refletir em aumento da morbidade e mortalidade no cenário hospitalar.

Em conclusão, a técnica de MLVA revelou que as cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* presentes em um hospital público de Recife, Pernambuco, Brasil, apresentaram elevada diversidade genética, sugerindo que a maioria esteja sofrendo constantes mutações, embora exista a persistência de alguns clones no ambiente hospitalar.