

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

mestrado

BC/46937

IB/81707

INSTITUTO DE BIOLOGIA



T/UNICAMP

H719c



Universidade Estadual de Campinas



Luciana Maria de Hollanda

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DE PACIENTES COM
FIBROSE CÍSTICA**

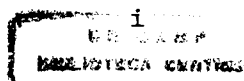
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Luciana Maria de Hollanda
e aprovada pela Comissão Julgadora.
[Signature]

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título
de mestre em Genética e
Biologia Molecular na área de
Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

- 2001-



UNIDADE IB/83707
 N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
 H719c
 V. E.
 TOMBO BC/ 9693K
 PROC 16-372101
 C ☐ D ☒
 PREC 1100
 DATA 02/11/01
 N.º CPD

CM00161027-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Hollanda, Luciana Maria de
H719/c Caracterização molecular de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*
 isoladas de pacientes com fibrose cística/Luciana Maria de Hollanda.—
 Campinas, SP.[s.n.], 2001
 104f: ilus.

Orientador: Domingos da Silva Leite
 Co-Orientador: Wanderley Dias da Silveira

1. Fator de virulência. 2. Fibrose cística. 3. Biologia molecular. I.
 Leite, Domingos da Silva. II. Silveira, Wanderley Dias da. III.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

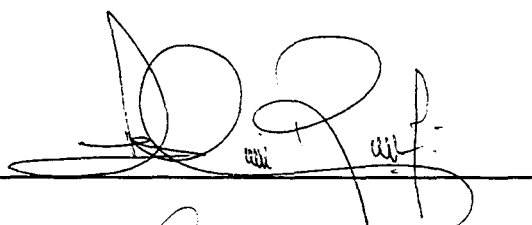
Campinas, 10 de agosto de 2001.

BANCA EXAMINADORA:

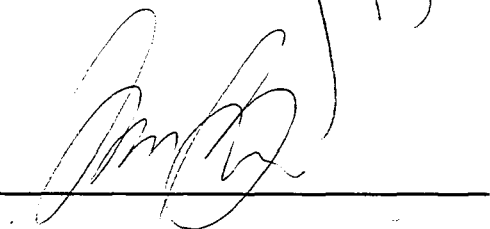
Prof. Dr. DOMINGOS DA SILVA LEITE (Orientador)



Prof. Dr. JOSÉ DIRCEU RIBEIRO



Prof. Dr. MARCELO BROCCHI



Prof. Dr. TOMOMASA YANO

*A todos aqueles que me ensinaram a como não ser,
dedico!*

Agradecimentos

Ao meu orientador Domingos da Silva Leite por ter despertado em mim o gosto pela ciência.

Ao professor Wanderley Dias da Silveira por ter despertado em mim o gosto pela biologia molecular e por ter me adotado em seu laboratório.

Ao Marcello Lancellotti por toda sabedoria, dedicação, carinho e ensinamento.

Aos professores Marcelo Brocchi, Wirla Tamashiro e Maria Silvia Vicari Gatti por terem corrigido a minha dissertação com tanto carinho.

A Keila, Gerson, Cristiane, Ângela, Cleide, Alessandra, Eliana, Izildinha, Thomazini, Tatiana, por todo companheirismo e amizade.

À UNICAMP

A FAPESP pela concessão da bolsa (Proc nº 98/02524-5)

A minha família mais querida e mais linda: Minha Mãe, Meu Pai e Tia-Olga, obrigado pelo amor, carinho e dedicação.

A minha segunda família: Lianne (Tata), Gustavo (Gugu), Lisete e Ana, que me ensinaram o verdadeiro valor da amizade e, a ser responsável por tudo aquilo que eu cativasse.

A minha grande amiga Andréa Mendez por tudo!

Ao Mario Paulo, Max, Cyrillo, Camille, Ivaldo, Traudi, Jaqueline, Christina Bottura meus eternos amigos, obrigado pela força!

Aos Corais: Oficina, Gilberto Mendes, PUCC e Cais-do-Canto por todo o ensinamento musical, por todas as farras e por todos os momentos da mais pura diversão.

Índice

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
Introdução.....	1
1. Fibrose Cística ou Mucoviscidose.....	1
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
3. Métodos de identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Objetivos.....	15
Material e Métodos.....	16
1. Cepas.....	16
2. Ensaio para determinação do perfil de produção das exoenzimas hemolisina, gelatinase e elastase.....	17
3. Perfil de Resistência a Antibióticos das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes com FC.....	18
4. Extração de DNA genômico das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
5. Eletroforese de DNA em Gel de Agarose.....	20
6. Amplificação de DNA por PCR.....	21
6.1. Oligonucleotídeos “primers” utilizados na amplificação do DNA genômico.....	21
6.2. Reação de PCR.....	22
7. Digestão com Enzimas de Restrição para Região RNAr 16S das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24

8. Digestão com Enzimas de Restrição para a Região Intergênica Espaçadora 16S-23S (ITS) das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
9. Ribotipagem.....	26
9.1. Digestão com DNA genômico.....	26
9.2. Transferência para a Membrana de Nylon.....	27
9.3. Marcação da Sonda.....	28
9.4. Hibridização.....	29
10. Dendograma.....	29
Resultados	31
1. Perfil da produção das exoenzimas hemolisina, gelatinase e elastase das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes com FC.....	31
2. Perfil de Resistência a Antibióticos de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada de pacientes com FC.....	33
3. Random Amplification Polimorfic DNA (RAPD).....	38
3.1. “Primer” OPR1.....	38
3.2. “Primer” OPR2.....	38
3.3. “Primer” OPR8.....	43
3.4. “Primer” OPR13.....	43
4. “Primer” ERIC-PCR.....	43
5. “Primer” REP-PCR.....	43
6. PCR para a região DNAr 16S.....	48
7. Polimorfismo para a região DNAr 16S.....	50
8. PCR para a região intergênica de consenso entre 16-23S(ITS).....	53
9. Polimorfismo para a região intergênica de consenso 16-23S.....	55

10. Ribotipagem.....	58
11. Dendograma de similaridade utilizando o programa POPGENE.....	62
Discussão.....	65
Conclusão.....	76
Referências Bibliográficas.....	78

Índice de Figuras

Figura 1 - Porcentagem de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes com FC, produtoras das exoenzimas (Hemolisina, Gelatinase e Elastase) (n=56).....	30
Figura 2 – Porcentagem de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóides, não mucóides e totais produtoras das exoenzimas hemolisina, gelatinase e elastase.....	32
Figura 3 – Porcentagem das 56 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a diferentes antibióticos.....	33
Figura 4 – Porcentagem de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a diferentes antibióticos nos anos de 1996 e 1997.....	34
Figura 5 - Porcentagem do Perfil de Resistência a Antibióticos das 25 cepas mucóides e 31 cepas não mucóides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes com FC.....	35
Figura 6a – Teste de RAPD para o “primer” OPR1 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	38
Figura 6b - Teste de RAPD para o “primer” OPR1 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	38
Figura 7a – Teste de RAPD para o “primer” OPR2 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	40
Figura 7b – Teste de RAPD para o “primer” OPR2 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	40
Figura 8a – Teste de RAPD para o “primer” OPR8 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	43
Figura 8b – Teste de RAPD para o “primer” OPR8 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	43

Figura 9a - Teste de ERIC-PCR para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	45
Figura 9b - Teste de ERIC-PCR para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	45
Figura 10a – Teste de PCR para a região DNAr 16S das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	48
Figura 10b – Teste de PCR para a região DNAr 16S das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	48
Figura 11a – Polimorfismo para a enzima de restrição <i>Bam</i> HI da região rDNA 16S para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	50
Figura 11b – Polimorfismo para a enzima de restrição <i>Bam</i> HI da região rDNA 16S para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	50
Figura 12a - Polimorfismo para a enzima <i>Sac</i> II da região rDNA 16S para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada de pacientes FC.....	51
Figura 12b - Polimorfismo para a enzima <i>Sac</i> II da região rDNA 16S para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada de pacientes FC.....	51
Figura 13a - PCR para a Região Intergênica de Consenso 16S-23S das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes mucoviscidóticos.....	53
Figura 13b - PCR para a Região Intergênica de Consenso 16S-23S das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	53
Figura 14a – Polimorfismo apresentado pela enzima <i>Pvu</i> II para a região intergênica de consenso 16S-23S para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	55

Figura 14b – Polimorfismo apresentado pela enzima <i>PvuII</i> para a região intergênica de consenso 16S-23S para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	55
Figura 15a - Polimorfismo apresentado pela enzima <i>DraI</i> para a região intergênica de consenso 16S-23S para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	56
Figura 15b - Polimorfismo apresentado pela enzima <i>DraI</i> para a região intergênica de consenso 16S-23S para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas dos pacientes FC.....	56
Figura 16a: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	57
Figura 16b: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	58
Figura 16c: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	58
Figura 16d: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	59
Figura 16e: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	59
Figura 17a – Dendograma de Similaridade para os "primers" OPR.....	62
Figura 17b – Dendograma de Similaridade para os "primers" ERIC-PCR.....	63
Figura 17c – Dendograma de Similaridade para a técnica Ribotipagem.....	64

Índice de Tabelas

Tabela I – Idade dos pacientes e caracterização das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com as respectivas datas de coletas.....	15
Tabela II – “Primers” utilizados nas técnicas de RAPD, REP-PCR, ERIC-PCR, RNAr 16S e 16S-23S (ITS) para a caracterização molecular das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	21
Tabela III – Protocolo para a reação de RAPD, ERIC, REP, 16S e 16-23S utilizadas para a caracterização molecular das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	22
Tabela IV – Ciclos de Amplificação utilizados nas técnicas moleculares.....	23
Tabela V – Protocolo empregado para a digestão da Região RNAr 16S das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes FC.....	24
Tabela VI – Protocolo empregado para a técnica de digestão com enzimas de restrição para a região 16S-23S de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de pacientes com FC.....	25
Tabela VII – Listagem do perfil de fatores de virulência e de resistência a antibióticos dos pacientes 13 pacientes estudados.....	36
Tabela VIII - Zimograma para o “primer” OPR1 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada dos pacientes mucoviscidóticos.....	39
Tabela IX – Zimograma para o “primer” OPR2 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada dos pacientes mucoviscidóticos.....	41
Tabela X – Zimograma para o “primer” OPR8 das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada dos pacientes mucoviscidóticos.....	44

Tabela XI – Zimograma para o "primer" ERIC das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada dos pacientes mucoviscidóticos.....	46
Tabela XII – Zimograma para Ribotipagem utilizando a sonda DNAr 16S.....	60

RESUMO

A maior causa da morbidade e mortalidade em pacientes com Fibrose Cística (FC) são aquelas causadas por infecções oportunistas crônicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Uma vez que a *P. aeruginosa* colonizou o pulmão do paciente, é praticamente impossível erradicá-la pela quimioterapia antimicrobiana. Os objetivos deste trabalho foram a caracterização fenotípica e molecular de 56 cepas de *P. aeruginosa* (25 mucóides e 31 não mucóides), isoladas de 13 pacientes com FC em tratamento no Setor de Pediatria do HC/FCM/UNICAMP. As cepas de *P. aeruginosa* foram analisadas, utilizando as técnicas fenotípicas: Perfil de Exoenzimas (Hemolisina, Gelatinase e Elastase), Perfil de Resistência a Antibióticos; e genotipadas: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ERIC-PCR, REP-PCR, RFLP, e do polimorfismo do RNA na região intergênica de consenso 16S-23S e da região 16S. A análise comparativa entre as cepas de *P. aeruginosa*, por métodos tradicionais e moleculares mostrou que: As cepas de morfotipo não mucóide expressaram em maior frequência as enzimas Elastase e Gelatinase, enquanto que as mucóides expressaram em maior frequência Hemolisina. Os antibióticos mais efetivos contra as cepas de *P. aeruginosa* foram da família das Carbapenemas, Aminoglicosídeos e Quinolonas de 3º Geração, enquanto que os menos efetivos foram das famílias de Penicilinas, Cefalosporinas de 3º Geração, Cloranfenicol, e Sulfonamidas. Uma cepa mostrou-se resistente ao Imipenema enquanto todas as demais mostraram-se sensíveis. Todas as cepas não mucóides mostraram-se sensíveis ao antibiótico Ciprofloxacina. Entre os anos de 1996 para 1997 houve um aumento da resistência para os antibióticos Ceftriaxone, Cefotaxima, Ofloxacina. Entre os testes utilizados para a análise genotípica o mais discriminatório mostrou ser o RAPD que produziu o maior número de genótipos: 51 - OPR (OPR2 e OPR8) enquanto o ERIC gerou 34 genótipos. Os ensaios de determinação do polimorfismo da região intergênica 16s-23s não apresentaram resultados discriminatórios. Nos ensaios de ribotipagem utilizando a enzima *PvuII* para a digestão do DNA cromossômico e hibridização com a sonda 16S resultaram em 10 ribotipos. O ribotipo 1 agrupou 21 cepas isoladas de 9 pacientes com FC. Os dados obtidos sugerem que os genótipos discordantes em *P. aeruginosa* desenvolvem um fenótipo comum durante a infecção na FC. E que a persistência de *P. aeruginosa* na fase crônica da FC envolve diferentes alterações fenotípicas que favorecem a capacidade de sobreviver no trato respiratório inferior.

ABSTRACT

The major cause of the morbidity and mortality in Cystic Fibrosis patients (FC) are caused by chronic opportunist infections of *Pseudomonas aeruginosa*. A time that *P. aeruginosa* colonized the lung of the patient, is practically impossible eradicate it with chemotherapy. The objectives of this work had been 56 phenotype and molecular characterization of strains of *P. aeruginosa* (25 mucoid and 31 non mucoid), isolated of 13 patients with FC handling in the Pediatrics Sector of HC/FCM/UNICAMP. Strains of *P. aeruginosa* had been analyzed, using the phenotype techniques: Profile of Exoenzymes (Hemolisin, Gelatinase and Elastase), Profiles antibiotics resistance; e genotypes: RAPD (Random Amplification Polimorphic DNA), ERIC-PCR, REP-PCR, RFLP and the polymorphism of the RNA in the intergenic region of consensus 16S-23S and region 16S. The comparative analysis between strains of *P. aeruginosa*, for traditional and molecular methods had show that: Strains nonmucoid had expressed in bigger frequency the enzymes Elastase and Gelatinase, while that the mucoids had expressed in bigger Hemolisin frequency. The antibiotics effective against strains of *P. aeruginosa* had been of the family of the Carbapenems, Aminoglycosides and Quinolones of 3^a Generation, while that effective they had been of the Penicillin families, Cephalosporins of 3^a Generation, Chloramphenicol, and Sulfonamides. Strains revealed resistant to the Imipenem while all had excessively revealed sensible. All strains nonmucoids had revealed sensible to the Ciprofloxacin antibiotic. Between 1996 and 1997 had increase of the resistance for the antibiotics Ceftriaxone, Cefotaxime, Ofloxacin. It enters the tests used for most discriminates the genotype analysis showed to be the RAPD that produced the biggest number of genotypes: 51-OPR (OPR2 and OPR8) while ERIC generated 34 genotypes. The polymorphism determination showed in the intergenic region 16S-23S had not presented resulted discriminatory. In the ribotype assays using *PvuII* enzyme for the digestion of the chromosomic DNA and hybridization with sounding lead 16S had identified of 10 ribotypes. Ribotype 1 grouped 21 strains isolated of 9 patients with FC. The gotten data suggest that the genotypes opponents in *P. aeruginosa* develop one phenotype common during the infection in the FC and that the persistence of *P. aeruginosa* in the chronic phase of the FC involves different phenotype alterations that favor the capacity to survive in the low airways tract.

INTRODUÇÃO

1. Fibrose Cística ou Mucoviscidose

A Fibrose Cística (FC) ou Mucoviscidose é um distúrbio monogenético que atinge crianças no mundo inteiro, das quais muitas não chegam à fase adulta (Boat *et al.*, 1989). A FC foi inicialmente descrita como enfermidade clínica nos anos 30, entretanto numerosas referências de crianças e adolescentes portadores de íleo meconial, pancreatite e pneumonia são encontrados na literatura desde 1650 (Taussig, 1984). Em 1936, Fanconi (In: Boat *et al.*, 1989) relatou o caso de uma criança com características clínicas de FC, mas falhou no reconhecimento desta doença. Anderson (1938), trabalhando com crianças que morriam no período neonatal com lesões histopatológicas características no pâncreas, foi a primeira a reconhecer, descrever e nomear essa enfermidade como “fibrose cística do pâncreas”. Farber (1945) sugeriu que a FC era uma doença das glândulas exócrinas, caracterizada em grande parte pela falência na produção secretória de muco. O mesmo introduziu o termo médico “mucoviscidose”, empregado até os dias de hoje (In: Boat *et al.*, 1989).

Nos anos 40, Anderson & Hodges (1942), trabalhando com primos heterozigotos para o gene, sugeriram que a FC era uma herança paterna recessiva. Nesta década, as infecções pulmonares crônicas foram reconhecidas como a principal causa agravante do estado de saúde de pacientes mucoviscidóticos e, por esse motivo, a antibioticoterapia começou a ser empregada nos mesmos (Boat *et al.*, 1989). Em 1953, Di Sant’Agnese *et al.*, 1953, investigando a perda de sal em crianças com FC pelo suor, documentaram que, os níveis de sódio e cloro eram elevados em todos os indivíduos mucoviscidóticos. Tal observação levou Gibson & Cooke (1959) a desenvolver o método do teste do suor, que é empregado até os dias de hoje, para diagnosticar

pacientes com FC. Nos últimos 30 anos uma progressiva descrição da FC e suas complicações emergiu, até culminar com a descoberta e o completo seqüenciamento do gene responsável pela doença nos anos de 1985 e 1986 (Tsui *et al.*, 1985; Wainwright *et al.*, 1985; White *et al.*, 1985). Verificou-se assim que a FC é a enfermidade monogenética autossômica recessiva mais comum e grave na população caucasóide, com uma incidência de 1/3000 nascimentos e uma frequência gênica que pode chegar a 1/20 (Boat *et al.*, 1989; Maróstica *et al.*, 1998; Tümmler & Kwitz, 1999; White *et al.*, 1985). Em nosso meio, escassos relatos sugerem que a incidência seja de 1/2500 mucoviscidóticos mas, sendo o Brasil um país de grande contingência migratória, estimativas apontam que esse número possa ser maior (<http://criesp.com.br/inform/injan98.html>).

A FC caracteriza-se por mutações em um gene localizado no braço longo do cromossomo 7 (Fauci, 1998) e a análise da seqüência do cDNA desse gene, mostrou que ele possui 250Kb, 27 exons e codifica uma proteína transmembrânica com 1480 aminoácidos, denominada Regulador de Condutância da Fibrose Cística (CFTR) (Govan & Deretic, 1996; Morales *et al.*, 1999). O CFTR está localizado na membrana apical das células epiteliais (Bijmann & Quiton, 1987) e o seu RNAm é expresso no pulmão e em outros tecidos, como testículos, duodeno, traquéia e rim (Morales, *et al.*, 1999). Qualquer falha na expressão desse gene ocasionará problemas de absorção de eletrólitos nesses tecidos.

Baseado na análise da seqüência de aminoácidos da CFTR, Collins e colaboradores (1990) propuseram que a proteína CFTR possui dois domínios de transmembrana (TM), dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBD) e um domínio central R. A CFTR funciona como um canal de transporte para o íon cloro e também pode atuar modulando outros canais condutores como o canal de sódio, e cloretos (Deretic *et al.*, 1994, Morales *et al.*, 1999). A CFTR pertence à família de proteínas de transmembrana que inclui a glicoproteína P e o produto do gene de

resistência a multidrogas, o qual reduz a eficácia da quimioterapia para o câncer por excreção anormal de agentes quimioterápicos (Wainwright, 1991).

Em pacientes mucoviscidóticos, mais de 170 mutações diferentes foram descritas no gene da CFTR (Collins, 1992). Indivíduos afetados têm dois alelos defeituosos. Sujeitos que têm uma cópia normal e outra defeituosa não são sintomáticos e provavelmente não desenvolverão a doença (Morales *et al.*, 1999). Uma deleção de três pares de base no exon 10 é responsável por aproximadamente 70% dos alelos mutantes (Collins, 1992). Esta deleção resulta na perda de um simples aminoácido, a fenilalanina, no códon 508 (ΔF 508). O fenótipo de pacientes portando a mutação ΔF 508 varia consideravelmente, mas, esta mutação é a mais severa causando maiores danos aos pacientes (Morales, *et al.*, 1999).

A fisiopatologia da fibrose cística nas vias respiratórias tem sido atribuída a anormalidades nas taxas de transporte de Sódio e Cloro, que levam a produção de secreções desidratadas e pouco depuradas, dificultando o batimento ciliar (Fauci *et al.*, 1998). Há também um aumento da sulfatação dos proteoglicanos no muco. Essas moléculas modificadas podem interagir com a bactéria ou seus exoprodutos, contribuindo com a viscosidade da secreção respiratória (Koch & Hoiby, 1993). A desidratação da superfície e o aumento da sulfatação do glicocálix da via respiratória podem explicar o desenvolvimento de uma secreção persistente, observada nas vias respiratórias de pacientes mucoviscidóticos. Tal secreção proporciona um meio favorável para o crescimento de micróbios pois, a função mucociliar não é eficiente para remover bactérias e outros patógenos (Deretic *et al.*, 1994).

A maior causa da morbidade e mortalidade em pacientes portadores de fibrose cística são aquelas causadas por infecções oportunistas crônicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Estas infecções destroem progressivamente o parênquima do pulmão e

levam a complicações como as hipertensões pulmonares, bronquiestasia e hipertrofia ventricular esquerda ocasionando a falência respiratória e a morte (Boat *et al.*, 1989).

Durante os primeiros anos de vida, os pulmões das crianças mucoviscidóticas são colonizados e desenvolvem uma pneumonia secundária por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenza* ou, mais comumente, por *Klebsiella pneumoniae*. Essas infecções são de fácil tratamento, se os antibióticos corretos forem empregados (Wheeler & Colten, 1998). Depois dos 18 anos 70% dos pacientes, nos EUA, apresentam infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (FitzSimmons, 1993).

2. *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbico gram-negativo, com 0,5 µm de largura por 1,5µm de comprimento, possui um longo flagelo polar, móveis, e não apresenta esporos (Sauders *et al.*, 1963). São bactérias que sobrevivem nos mais variados ambientes, podendo ser encontradas na água, no solo, nos alimentos, em plantas e colonizando a pele e o intestino humano e animal (Salyers & Whitt, 1994). Clinicamente, têm sido isoladas de feridas, queimaduras e infecções no trato urinário. Metabolizam muitos compostos orgânicos e o aceptor final de elétrons do metabolismo respiratório é o O₂ ou NO₃. Glicose e outras hexoses são degradadas via Entner-Duodoroff, e todo substrato orgânico é eventualmente oxidado para CO₂. Podem fermentar substratos na ausência de oxigênio e nitrato, mas não lactose (<http://www-personal.umd.umich.edu/~abushar/bergey/http/psearg.htm>).

De acordo com Martin e colaboradores (1995) existe uma variação significativa no fenótipo de *P. aeruginosa* isolada de pacientes mucoviscidóticos, que mostram uma variedade

no aspecto das colônias, incluindo colônias mucóides (M), não mucóides (NM) e variantes que não são móveis, são deficientes em lipopolissacarídeos, diferem na composição de polissacarídeos, na estabilidade do fenótipo mucóide, são auxotróficas e multiresistentes (Olivier *et al.*, 2000; Pugashetti *et al.*, 1982). Além disso, o desenvolvimento de fenótipos mucóides, que é considerado como etapa principal no estabelecimento da infecção pulmonar crônica, usualmente depende do aparecimento de variantes mucóides estáveis (Deretic *et al.*, 1994). Uma vez que a forma mucóide emerge, é comumente detectada a presença de ambas as formas, mucóides e não mucóides, no escarro dos pacientes (Govan & Deretic, 1996; Pugashetti *et al.*, 1982). Em muitos casos é possível demonstrar a presença de várias cepas mucóides e não mucóides do microrganismo no trato respiratório de um mesmo paciente (Pugashetti *et al.*, 1982).

P. aeruginosa de fenótipo mucóide é considerada como o patógeno mais freqüente na infecção pulmonar crônica em pacientes com FC e é responsável por muitos dos casos de morbidade e mortalidade associados a esta enfermidade (Hoiby, 1977, Roychoudhury *et al.*, 1991).

O polissacarídeo alginato produzido pela cepa mucóide de *P. aeruginosa* é um exopolissacarídeo linear, o-acetilado, formado de ácido L-glicurônico e de ácido D-manurônico, unidos através de ligação β -1,4 (Evans & Linker, 1973; Ohman & Chakrabarty, 1981; Schlichtman, *et al.*, 1994, Pugashetti *et al.*, 1982). A síntese de alginato é uma outra propriedade característica de *P. aeruginosa* isolada de pacientes mucoviscidóticos. Tem-se observado que as características específicas do pulmão desses pacientes podem exercer um papel importante na expressão dos genes responsáveis pela síntese do alginato (Roychoudhury, *et al.*, 1991). Um desses fatores é a alta osmolaridade, causada por concentração anormal dos íons Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} e K^+ no pulmão, além de um ambiente desidratado.

Um grande aumento na produção do muco traqueobronquial, excessivamente viscoso, é uma das primeiras manifestações da FC. Tal condição dificulta o tratamento da infecção pulmonar em pacientes portadores de FC e tem como consequência a morte dos mesmos (Boat, et al. 1989). Ele não causa apenas a obstrução dos brônquios, mas fornece um meio ideal para a colonização bacteriana no pulmão de pacientes com FC. Durante a terapia com antimicrobianos, grande parte das bactérias adquirem a forma mucóide, a qual é resistente à grande maioria dos antibióticos (Roychoudhury *et al.*, 1991).

Várias características do alginato contribuem na patogênese pulmonar em pacientes com FC: (a) propriedade anti-fagocitária associada, mas não limitada à ineficiente opsonização (Pier *et al.*, 1990) ; (b) adesão (Ramphal & Pier, 1985); (c) resistência ao tratamento com antibióticos (Anwar *et al.*, 1992); (d) Possível supressão na função dos leucócitos (Mai *et al.*, 1993) e (e) proteção aos intermediários da oxidação (Learn *et al.*, 1987, <http://www.ucs.mun.ca/~lawhee/index.htm>).

Os anticorpos para alginato podem ser detectados em todos os pacientes portadores de FC com infecção crônica causada por *P. aeruginosa*, independentemente se a forma mucóide é isolada do pulmão desses pacientes (Pedersen *et al.*, 1990).

O alginato suprime a função dos linfócitos (Mai *et al.*, 1993) quando utilizado em altas doses para imunização em camundongos, assim como, reduz células T citotóxicas (CD3⁺ e CD8⁺) (Pier *et al.*, 1993). Também estimula a liberação de IL-8 por células epiteliais, contribuindo para o recrutamento de neutrófilos, os quais dominam a inflamação da via respiratória em indivíduos com FC (Johansen *et al.*, 1994). A presença do alginato também sugere um papel na patologia da lesão pulmonar das FC na indução do aumento da resposta imune humoral, associada com

deficiente função pulmonar, sendo os danos alveolares ocasionados pela formação e deposição de complexos imunes (Pedersen *et al.*, 1992).

P. aeruginosa também pode produzir enzimas proteolíticas tais como as proteases alcalinas e neutras que exercem um papel importante na virulência durante a colonização. Tais enzimas contribuem para o desmoronamento das barreiras físicas do hospedeiro, aumentando a proliferação bacteriana, fornecendo aminoácidos e peptídeos das proteínas teciduais às bactérias. Em estágios mais avançados, podem interferir com o mecanismo de defesa imune por degradar imunoglobulinas. A protease alcalina tem sua atividade máxima em $\text{pH} \approx 7$ e 9, é inibida por compostos quelantes como o EDTA, bem como por metais pesados (Lory & Tai, 1985). Já a protease neutra (elastase) é capaz de degradar a elastina, um dos principais componentes dos tecidos. Tal enzima é muito encontrada no pulmão e é considerada um importante fator de virulência, responsável pelos danos teciduais pulmonares em pacientes com FC (Bandjee *et al.*, 1995, Lory & Tai, 1985). A elastina corresponde a quase 30% do total de proteínas do tecido pulmonar e é um importante componente da parede dos vasos sanguíneos, sendo responsável pelo poder de recuperação da parede desses vasos (Salyers & Whitt, 1994).

Além da ação sobre a elastina, a elastase também pode degradar ou inativar importantes tecidos e componentes do sistema imune como, por exemplo, imunoglobulinas, fatores do complemento, o inibidor da proteinase α_1 , colágeno e fibrina. A elastase também atua sinergisticamente com a protease alcalina para inativar as citocinas humanas γ -interferon e o $\text{TNF-}\alpha$ (Rust *et al.*, 1996).

Outras enzimas proteolíticas excretadas por *P. aeruginosa* são as hemolisinas (Gray & Vasil, 1981) que diferem entre si quanto à composição e modo de ação. Uma delas é um glicolípido de baixo peso molecular, estável ao calor e que atua solubilizando lipídeos. A outra,

é uma proteína com atividade de fosfolipase C, lábil ao calor e que cataliza a hidrólise de fosfatidilcolina da fosforilcolina e diacilglicerol (Berka *et al.*, 1981). Ambas são excretadas na fase estacionária, sob condições de crescimento limitadas por fosfato (Lory & Tai, 1985). Essas hemolisinas atuam em cooperação com a fosfatase alcalina, liberando fosfato inorgânico de fosfolipídios (Kurioka & Liu, 1967). A hemolisina atua como determinante de virulência na patogênese da infecção pulmonar (Berka *et al.*, 1981). Liu e colaboradores (1979) verificaram que a combinação de glicolípido hemolítico e de fosfolipase C pode produzir considerável lesão no tecido pulmonar, durante a infecção. Posteriormente, Southern e colaboradores (1970) postularam que a fosfolipase C pode aumentar a colonização do tecido pulmonar por *P. aeruginosa*, como também exercer um importante papel na formação de lesões de pele.

Uma vez que a *P. aeruginosa* ocupou o pulmão do paciente mucoviscidótico, é praticamente impossível erradicá-la pela quimioterapia antimicrobiana (Römling *et al.*, 1994), já que as cepas apresentam resistência intrínseca a um grande número de agentes antimicrobianos (Poole *et al.*, 1993).

A seleção de agentes quimioterápicos para o tratamento de *P. aeruginosa* é uma problemática freqüente nos dias de hoje. Nos primórdios do tratamento, as taxas de mortalidade para esta bactéria utilizando a Polimixina B e E ficavam em 95%. Entretanto, essa droga é extremamente tóxica para o paciente e foi substituída pelo tratamento com carbenicilina e gentamicina, apresentando bons resultados na década de 60. De qualquer forma, esse tratamento hoje em dia é pouco viável desde que a resistência a esses dois agentes emergiu (Kovacs *et al.*, 1998). Nas duas últimas décadas, numerosos agentes antibacterianos com atividade *in vitro* contra *P. aeruginosa* foram desenvolvidos. Eles incluem a terceira geração de cefalosporinas (cefoperazone, cefsulodine, cefatzadima), a quarta geração de cefalosporinas (cefepime,

cefpirome, cefclidina), monobactâmicos (aztreonama), carbapenems (imipenem, meropenem) e quinolonas (ciprofloxacina, enoxacin, ofloxacina). Uma consequência esperada para o uso prolongado e freqüente da terapia antimicrobiana é o desenvolvimento de cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes a todas as classes de drogas antipseudomonas (Saiman, 1993).

3. Métodos de Identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Os métodos convencionais de caracterização de cepas de *P. aeruginosa* são pobremente reproduzidos, ou podem apenas detectar diferenças instáveis entre clones relacionados, ou ainda, podem ser aplicados a poucos isolados (Poh & Yeo, 1993). Métodos de tipagem convencional também não obtiveram sucesso na diferenciação de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que sofreram adaptação fenotípica, para o meio ambiente pulmonar (Ojeniyi *et al.*, 1991, Speert *et al.*, 1990). Estas desvantagens podem ser minimizadas pelo uso de métodos genotípicos (Pujana *et al.*, 2000, Hla *et al.*, 1996).

Métodos de tipagem molecular ou genotípicos são os mais importantes na elucidação das rotas de transmissão de patógenos microbianos (Renders *et al.*, 1996, Pfaller *et al.*, 1996). Pelo monitoramento fechado da variabilidade genética, distâncias filogenéticas podem ser calculadas. E esses dados podem conceder um discernimento da inter-relação dos isolados de bactérias, fungos e protozoários (Karlin *et al.*, 1994). Análises genéticas detalhadas produzem evidências da plasticidade genotípica e evolutiva dessas bactérias, caracterizando a sua adaptação aos mais variados ambientes. Este tipo de informação pode ser utilizado no cenário clínico para discriminar a existência de epidemias (Renders *et al.*, 1996), ou infecções cruzadas que podem aumentar a prevalência dessas bactérias no hospedeiro (Grothues *et al.*, 1988).

Para a epidemiologia hospitalar, técnicas de subtipagem que definem a inter-relação clonal entre cepas isoladas (Ørskov & Ørskov, 1983) estão sendo utilizada para o reconhecimento de infecção nosocomial e, portanto, preencher a lacuna no treinamento do controle de infecção.

Vários métodos fenotípicos e genotípicos foram utilizados durante a última década para analisar isolados de *P. aeruginosa* em pacientes mucoviscidóticos (Ogle & Vasil, 1993 e Ojeniyi *et al.*, 1991). Métodos de macrorestrição genômica podem ser os mais discriminativos e indicar que (i) isolados independentes de *P. aeruginosa* são freqüentemente distinguíveis um dos outros, (ii) diferentes cepas podem colonizar os pacientes com FC, (iii) uma determinada cepa pode manter-se no mesmo paciente por meses ou anos, (iv) um paciente pode portar duas ou mais cepas ao mesmo tempo (Grothues *et al.*, 1988 e Strulens *et al.*, 1993).

Estes métodos de macrorestrição para as análises filogenéticas incluem: Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD), ERIC-PCR, Ribotipagem, e a análise das regiões intergênicas de consenso, entre outros.

A técnica de RAPD, baseada na amplificação de segmentos de DNA com um “primer” composto por uma sequência de nucleotídeos arbitrária, tem sido amplamente utilizada nas investigações epidemiológicas para muitos microrganismos (Van Belkum, 1994) incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (Elaichouni *et al.*, 1994; Kerr *et al.*, 1995; Kersulyte *et al.*, 1995). Esta técnica também tem recebido considerável atenção como um método de tipagem molecular pela sua simplicidade, sensibilidade, flexibilidade e baixo custo (Van Belkum, 1994; Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1997).

O genoma procariótico, por ser pequeno, quando comparado ao eucariótico, conserva regiões repetitivas de DNA, não codificáveis, que são mantidas na reprodução celular bacteriana. Há exemplos de regiões codificáveis em que o códon terminal de um gene sobrepõe o códon

inicial do próximo gene. Todavia, pequenas famílias de seqüências repetidas intergênicas têm sido descritas em bactérias (Versalovic *et al.*, 1991).

Versalovic e colaboradores (1991) estudando a distribuição de seqüências repetidas de DNA em bactérias, examinaram os elementos Palindrômicos Repetitivos Extragênicos (REP), também conhecido como unidades palindrômicas (PU). Os elementos REP, foram primeiramente descritos como um potencial regulatório de seqüências interiores de regiões não traduzíveis de operons, pela virtude de sua natureza palindrômica e pela habilidade de formar estruturas “stem-loop”, estáveis na transcrição do RNA. Um consenso é que a seqüência REP, foi formulada pelo alinhamento múltiplo de seqüências REP-like de *Escherichia coli* e *S. enterica*. Estes 38 pb da seqüência consenso REP, contêm seis posições totalmente degeneradas, incluindo um “loop” de 5 pares de base em cada lado da haste conservada do palíndromo. Múltiplas funções têm sido descritas para esta região altamente conservada: dispersão dos elementos REP, incluindo a função na terminação da transcrição, estabilidade do RNA mensageiro e o domínio da organização cromossomal *in vivo*. Recentemente, uma nova família de elementos repetitivos, denominados Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC), também conhecido como unidades repetitivas intergênicas (IRUs), tem sido definida utilizando informações das seqüências obtidas primariamente de *E. coli* e *S. enterica*. Em contrapartida ao REP, este elemento ERIC possui 126-pb que compõe uma repetição invertida altamente conservada, que está localizada em regiões extragênicas (Versalovic *et al.*, 1991, Louws *et al.*, 1994). As seqüências ERIC não possuem relação com as seqüências REP.

A distribuição dos elementos REP e ERIC em diversos genomas procarióticos, inclusive em *P. aeruginosa* foi examinada por Versalovic e colaboradores (1991) pelo método de PCR. Tais análises revelaram que as distâncias entre seqüências REP e ERIC têm um padrão

específico para diferentes cepas e espécies bacterianas. Este estudo demonstrou que as seqüências REP e ERIC estão presentes em muitas espécies diferentes e podem ser utilizadas para gerar diferentes “fingerprints” com reações de PCR para os diversos genomas bacterianos.

Além disso, a tipagem por métodos moleculares tem aumentado a nossa compreensão no estudo da epidemiologia de ambas as infecções, hospitalares e comunitárias, causadas por bactérias patogênicas (Arbeit, 1995). Muitos métodos de tipagem molecular têm sido utilizados, com um grande sucesso, para a tipagem de patógenos bacterianos. Porém, a ribotipagem, tem sido dentre todos os métodos, o mais eficiente (Arbeit, 1995; Strulens *et al.*, 1993) e o mais sensível na detecção de pequenas alterações na organização do DNA (Picard *et al.*, 1994).

Outros métodos baseados na amplificação do DNA genômico estão tendo um papel muito importante na identificação e detecção de microrganismos, bem como no diagnóstico clínico microbiológico (Kostman *et al.*, 1992).

O complexo ribossomal de Eubactérias é composto de quantidades equimolares de três tipos de RNAr (5S, 16S e 23S). Os genes estão organizados em operons denominados DNAr e, em muitas espécies bacterianas, podemos encontrar mais de uma cópia (Bingen *et al.*, 1994). Em particular, a *P. aeruginosa* contam 4 unidades transcricionais por cromossomo. Enquanto que os genes RNAr são altamente conservados, as regiões intergênicas não o são (Hartmann *et al.*, 1986; Römling *et al.*, 1989). Tal fato, permitiu a Grimont e Grimont (1986) sugerir o uso do RNAr de *E. coli* para construir uma sonda universal empregada no estudo do polimorfismo de DNAr de qualquer espécie bacteriana. Tais análises são conhecidas como ribotipagem.

A ribotipagem de *P. aeruginosa* tem sido usada por muitos autores utilizando diferentes combinações de enzimas, sondas e quantidades de DNA genômico (Bingen *et al.*, 1994; Poh &

Yeo, 1993). Cepas diferentes são evidenciadas por diferenças nos perfis de bandas revelados por este método (Benekov *et al.*, 1996).

Análises de PCR baseadas na amplificação da região espaçadora entre 16S-23S têm sido sugerido como estratégia para tipagem de isolados de *P. cepacia* e *N. meningitides* (McLaughlin, *et al.*, 1993). Se essa região for amplificada e cortada com enzimas de restrição é possível verificar as diferenças e similaridades entre cepas de uma mesma espécie.

A partir das técnicas anteriormente descritas caracterizaremos genotipicamente 56 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de 13 pacientes com Fibrose Cística em tratamento no Setor de Pediatria do Hospital de Clínicas da UNICAMP e verificaremos qual o método mais efetivo para a discriminação dessas amostras.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos a caracterização fenotípica e molecular de cepas de *P. aeruginosa*, isoladas de pacientes com fibrose cística, procurando verificar se os pacientes poderiam estar contaminados com uma ou mais cepas, ou se vários pacientes poderiam estar contaminados pela mesma cepa e qual é o método genotípico mais efetivo para esta caracterização.

Para tanto, as cepas foram analisadas, utilizando

1. Perfil de Exoenzimas (Hemolisina, Gelatinase e Elastase).
2. Perfil de Resistência a Antibióticos.
3. Polimorfismo genético através das técnicas de: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ERIC-PCR, REP-PCR, Ribotipagem.
4. Polimorfismo da região intergênica entre os quais codificadores das subunidades ribossômicas 16S e 23S.

MATERIAL E MÉTODOS

1. CEPAS

As cepas de *P. aeruginosa* utilizadas foram cedidas pelo Prof. Dr. Ulisses M. de Oliveira, do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Um total de 56 cepas provenientes do escarro de 13 pacientes com fibrose cística, foram obtidas no período de 1996 e 1997. Dessas, 25 expressaram o morfotipo mucóide (M) e 31 o morfotipo não mucóide (NM). As cepas encontram-se listadas na Tabela I.

Tabela I – Idade dos pacientes e caracterização das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com as respectivas datas de coleta.

Paciente e Idade	Número da Cepa	Código	Data da Coleta	Paciente e Idade	Número da Cepa	Código	Data da Coleta
P1 16 anos	263NM	P1ANM	02/10/96	P6 14 anos	272M	P6AM	25/10/96
	263M	P1AM	02/10/96		272NM	P6ANM	25/10/96
	281NM	P1BNM	09/12/96		22NM	P6BNM	25/02/97
	40M	P1CM	17/04/97		49M	P6CM	09/05/97
P2 3 meses	264M	P2AM	17/04/96	P7 10 anos	49NM	P6CNM	09/05/97
	264NM	P2ANM	17/04/96		23M	P6DM	27/01/98
P3 10 anos	09NM	P3ANM	23/01/97		254NM	P7ANM	25/10/96
	16NM	P3BNM	04/02/97		254M	P7AM	25/10/96
	62M	P3CM	22/05/97		273M	P8AM	25/10/96
	62NM	P3CNM	22/05/97	P8 15 anos	273NM	P8ANM	25/10/96
P4 23 anos	268NM	P4ANM	10/10/96		50M	P8BM	09/05/97
	268M	P4AM	10/10/96	P9 18 anos	17NM	P9AM	04/02/97
	12M	P4BM	23/01/97		42M	P9BM	18/04/97
	12NM	P4BNM	23/01/97		42NM	P9BNM	18/04/97
	61M	P4CM	22/05/97		64M	P9CM	07/06/97
P5 9 anos	18M	P5AM	04/02/97		64NM	P9CNM	07/06/97
	57M	P5BM	16/05/97		68M	P9DM	16/06/97
	57NM	P5BNM	16/05/97		68NM	P9DNM	16/06/97

Paciente e Idade	Número da Cepa	Código	Data da Coleta	Paciente e Idade	Número da Cepa	Código	Data da Coleta
P10 6 anos	265M	P10AM	08/10/96	P12 7 anos	19M	P12AM	14/02/97
	265NM	P10ANM	08/10/96		43M	P12BM	18/04/97
	15M	P10BM	23/01/97		43NM	P12BNM	18/04/97
	15NM	P10BNM	29/01/97		55M	P12CM	16/05/97
P11 10 anos	250NM	P11ANM	26/08/96	P13 7 anos	55NM	P12CNM	16/05/97
	262NM	P11BNM	26/09/96		252NM	P13ANM	29/08/96
	275NM	P11CNM	01/11/96		266NM	P13BNM	08/10/96
	21NM	P11DNM	18/02/97		266M	P13BM	08/10/96
	31NM	P11ENM	27/03/97		28M	P13CM	18/03/97
	36NM	P11FNM	01/04/97				
	67NM	P11GNM	13/06/97				

P = Paciente

A, B, C, D = Datas de diferentes coletas

M = Morfotipo mucóide

NM = Morfotipo não mucóide

2. ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE PRODUÇÃO DAS EXOENZIMAS HEMOLISINA, GELATINASE E ELASTASE.

Para a realização do ensaio de hemolisina utilizou-se ágar sangue preparado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Para a detecção da formação de halos de hemólise, as cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foram inoculadas em pontos equidistantes nas placas de Petri, e incubadas a 37°C por 24 horas (Moriyama, 1964). A atividade hemolítica foi verificada pela formação de halos ao redor das colônias pela ação da enzima hemolítica.

A atividade proteolítica de *P. aeruginosa* foi testada em solução de gelatina. Inicialmente, as cepas foram inoculadas em BHI (Brain Heart Infusion) e após a incubação a 37°C durante 24 horas, o pré-inóculo foi inoculado em tubos de 13x130mm (semeadas em profundidade) contendo 5 mL de uma solução de gelatina a 12%, preparada em tampão fosfato pH 7,4. Após incubação a

37°C por 24 horas, a atividade proteolítica é observada quando ocorre liquefação da gelatina (Wilson, 1930).

A produção de elastase foi determinada pelo método descrito por Sbarra e colaboradores (1960), Mull & Callahan (1963) e Morihara, (1964).

As placas de Petri, contendo o meio de cultura com: 1% de Elastina e 2% de ágar bacteriológico, diluídos em tampão Tris-HCl (hidroximetil) aminometano 0,03M pH 8,0, foram inoculadas pontualmente com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e incubadas por 72 horas a 37°C. A atividade de elastase foi determinada pela observação de zonas claras ao redor do ponto de inoculação, em decorrência da ação da enzima (Morihara, 1964 – modificado).

3. PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

A determinação dos perfis de resistência das 56 cepas de *P. aeruginosa* aos antibióticos foram realizadas pelo Setor de Microbiologia do laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo método de difusão em discos de papel. Os antibióticos empregados foram: ampicilina (família das penicilinas), ceftriaxone e cefotaxima (família das cefalosporinas de 3ª Geração), imipenema (família carbapenemas), amicacina, gentamicina, netilmicina (família aminoglicosídeos), cloranfenicol (família cloranfenicol), ciprofloxacina e ofloxacina (família quinolonas de 3ª Geração) e cotrimoxazol (família sulfonamidas).

4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

A extração de DNA das amostras de *P. aeruginosa* foi realizada de acordo com o método descrito por Ausubel e colaboradores em (1987).

As cepas foram inoculadas em 4 mL de meio BHI, em duplicata, mantidas a 37°C por um período de 24 horas e, em seguida, centrifugadas (12.000 rpm por 2 minutos). Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos contendo as células bacterianas foram ressuspensos com 500µL de Tampão T.E. 1X (1mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5mM EDTA pH 8,0). As cepas foram novamente centrifugadas (12.000 rpm por 2 min), os sobrenadantes descartados e aos sedimentos adicionaram-se 400µL de Tampão T.E. 1X, 49µL de lisozima (10mg/mL) e 1µL de RNase (10mg/mL). A mistura foi homogeneizada e incubada por 4 horas a 37°C. Transcorrido este tempo, foram adicionados 70µL de SDS 10% e 5 µL de Proteinase K (10mg/mL). A mistura foi novamente homogeneizada e colocada em banho maria a 65°C por 10 minutos. Transcorrido o tempo foram adicionados 100µL de 5M NaCl e 100µL de solução de CTAB/NaCl sendo então homogeneizada até a formação de líquido com aspecto leitoso. A mistura foi colocada em banho maria a 65°C por 10 minutos, e, em seguida, adicionaram-se 750µL de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A preparação foi agitada por pelo menos 10 segundos e centrifugada à temperatura ambiente (12000 rpm por 5 minutos), obtendo-se ao final a formação de três fases onde o DNA se encontrava na fase aquosa. O sobrenadante aquoso, contendo o DNA da primeira fase, foi transferido para um tubo esterilizado e a este foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol. Em seguida, a mistura foi mantida a -20°C por 30 minutos, sendo centrifugada à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O sedimento obtido foi lavado

duas vezes com 1mL de Etanol 70% e seco à temperatura ambiente. Completado o processo de secagem do DNA, este foi ressuspendido em Tampão T.E. 1X pH 8,0.

O DNA genômico teve sua concentração determinada por leitura em espectrofotometria (λ 260nm e λ 280nm).

5. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese foi realizada de acordo com o método de Sambroock *et al.* 1989.

O DNA foi visualizado através do sistema de eletroforese horizontal em gel de agarose submerso. A concentração do gel de agarose foi variável de acordo com o tamanho dos fragmentos. A agarose foi fundida em tampão TEB 1X, sendo o mesmo tampão utilizado para as corridas eletroforéticas.

Os produtos das reações de PCR, de RAPD e o DNA extraído, foram misturados com tampão de ressuspensão 5X (Sacarose 50%; azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%). As corridas eletroforéticas foram feitas inicialmente a 20 volts e, em seguida, a 80 volts até o final.

Após o término da corrida, os géis foram transferido para uma cuba contendo solução de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e incubados por 20 minutos.

A visualização das bandas foi feita em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados com filme de revelação instantânea ASA 600 Polaroid, com o auxílio de filtro vermelho.

Os géis de agarose também foram analisados pelo sistema Kodak Digital ScienceTM 1D Image Analysis Software para o cálculo do peso molecular dos fragmentos encontrados.

6. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR (Reação de Polimerase em Cadeia)

As reações de RAPD (Random Amplification Polimorphic DNA - “Operon 10-mer Kit R” - Operon Technologies, Inc.); ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Versalovic *et al.*, 1991); REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic - Versalovic *et al.*, 1991); amplificação da Região 16S do RNA ribossômico (Toschka *et al.*, 1988) e amplificação da região 16S-23S (ITS) “Internal Transcribed Spacer” (Tyler *et al.*, 1995) foram realizados em triplicata, utilizando a máquina de termociclagem (Gene Amp System PCR 9700 – Perkin Elmer Cetus).

6.1. Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados na amplificação do DNA genômico

Os “primers” utilizados na técnica de RAPD foram selecionados a partir do “Operon 10-mer Kit R” (Operon Technologies, Inc), e os “primers” para as reações de ERIC-PCR, REP-PCR, 16S RNAr e 16S-23S, foram sintetizados pela “Gibco-BRL Custom Primers” tendo-se como base, as seqüências obtidas no Gene Bank (<http://www.ncbi.nih.nlm.gov>).

Os oligonucleotídeos foram ressuspensos em 1,0 ml de H₂O ultrapurificada pelo Sistema Mili-Q esterilizada e mantidos a 4°C até completa dissolução (cerca de 1 hora). A suspensão foi distribuída em alíquotas de 100µl mantidas a -20°C.

Os “primers” utilizados encontram-se listados na Tabela II.

Tabela II – “Primers” utilizados nas técnicas de RAPD, REP-PCR, ERIC-PCR, RNAr 16S e 16S-23S ITS para a caracterização molecular das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com FC.

Nome do Inicializador	Seqüência (5' → 3')	Técnica em que o "primer" foi utilizado
OPR 1	TgC ggg TCC T	RAPD
OPR 2	CAC AgC TgC C	
OPR 8	CCC gTT gCC T	
OPR 13	ggA CgA CAA g	
ERIC 1	ATg TAA gCT CCT ggg gAT TCA C	ERIC-PCR
ERIC 2	AAg TAA gTg ACT ggg gTg AgC g	
REP 1	III ICg ICg ICA TCI ggC	REP-PCR
REP 2	ICg ICI TAT Cig gCC TAC	
RIBO16S1	GCg gAC ggg TgA gTA ATg CCT	16S RNAr
RIBO16S2	CTT CTg gAg CAA CCC ACT CCC	
1623RIBO1	ggA Cgg TTA CCA Cgg AgT GA	16S-23S (ITS)
1623RIBO2	GgC ATC CAC CgT ATg CgC TT	

6.2. Reação de PCR

Soluções estoque dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), foram misturados em quantidade equimolares para uma concentração final de 10 mM.

A solução estoque dos “primers”, os dNTPs, o DNA genômico e o tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10x) foram sempre mantidos em gelo. A enzima *Taq* DNA polimerase foi mantida a -20°C até o uso.

Os reagentes foram misturados e mantidos em banho de gelo conforme protocolos da Tabela III. Os tubos foram aquecidos a 95°C por 10 minutos e “Hot Start” por 5 minutos. A

enzima *Taq* DNA polimerase foi adicionada na concentração de 2,5 unidades por reação. As reações foram feitas de acordo com a Tabela IV.

Tabela III – Protocolos para a reação de RAPD, ERIC, REP, 16S e 16-23S, utilizadas para a caracterização molecular das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com FC.

Técnica	DNA 40ng/μl	Inicializador 1 (50μM)	Inicializador 2 (50μM)	MgCl ₂ (50mM)	dNTPs (10mM)	Tampão	H ₂ O (A)
						da enzima (10x)	
RAPD	5 μL	1 μL	–	1,5 μL	1 μL	5 μL	31,5 μL
ERIC	5 μL	1 μL	2 μL	1,5 μL	1 μL	5 μL	29,5 μL
REP	5 μL	1,25 μL	1,25 μL	1,5 μL	1 μL	5 μL	30 μL
16S	5 μL	1 μL	1 μL	1,5 μL	1 μL	5 μL	30,5 μL
16-23S	5 μL	2 μL	1 μL	1,5 μL	1 μL	5 μL	29,5 μL

(A) H₂O Destilada pelo Sistema Mili-Q esterilizada

Tabela IV – Ciclos de amplificação utilizados nas técnicas moleculares.

Técnica	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Estoque
RAPD	94°C	33°C	72°C		4°C
	1 min	1 min	2 min	-	∞
	45 ciclos				
ERIC - PCR	90°C	52°C	72°C		4°C
	30 seg	1 min	8 min	72°C	
	30 ciclos			16 min	∞

Técnica	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Estoque
REP – PCR	90°C	40°C	72°C	72°C	4°C
	30 seg	1 min	8 min	16 min	∞
	30 ciclos				
RNAr 16S	94°C	63°C	72°C	72°C	4°C
	1 min	2 min	1 min	10 min	∞
	30 ciclos				
16S-23S (ITS)	94°C	61°C	72°C		4°C
	1 min	2 min	2 min	-	∞
	30 ciclos				

Após o término dos ciclos as reações de PCR foram mantidas a 4°C e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %. Aproximadamente 10 µl da reação de PCR foram aplicados na canaleta juntamente com 5µl do tampão de ressuspensão 5x (Apêndice 2).

7. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA A REGIÃO RNAr 16S DAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Depois de amplificada, a região RNAr 16S foi digerida com as seguintes enzimas de restrição: *Bam*HI (G↓GATCC), *Sac*II (CCGC↓GG), *Eco*RI (G↓AATTC), *Pvu*II (CAG↓CTG) (Sambroock *et al.*1989). Os reagentes foram misturados em tubos de centrífuga de 0,5 mL esterilizados e mantidos a 37°C por 18 horas conforme indicado na Tabela V.

Tabela V – Protocolos empregados para a digestão da região RNAr 16S das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com FC.

Enzima	Quantidade de Enzima utilizada	DNA	Tampão	H ₂ O ^(A)
<i>Bam</i> HI	1 µL	5 µL	4 µL (2X)	10µL
<i>Sac</i> II	1 µL	5 µL	2 µL (1X)	12 µL
<i>Eco</i> RI	1 µL	5 µL	4 µL (2X)	10 µL
<i>Pvu</i> II	1 µL	5 µL	2 µL (1X)	12 µL

^(A) Água Destilada pelo Sistema Mili-Q esterilizada

Após a digestão, os fragmentos obtidos foram novamente visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Aproximadamente 10 µl da reação de PCR foram adicionados na canaleta juntamente com 5 µl do tampão de ressuspensão 5x.

8. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA A REGIÃO INTERGÊNICA ESPAÇADORA 16S-23S DAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Depois de amplificada, a região intergênica espaçadora 16S-23S foi diferida, com as seguintes enzimas de restrição: *Dra*I (TTT↓AAA), *Pvu*II(CAG↓CTG), *Sal*I (G↓TCGA) e *Sau*3AI (↓GATC) (Sambroock *et al.*1989). Os reagentes foram misturados em tubos de centrifuga de 1,5 mL esterilizados e mantidos a 37°C por 24 horas, conforme indicado na tabela

VI.

Tabela VI – Protocolo empregado para a técnica de digestão com enzimas de restrição para a região 16S-23S de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com FC.

Enzima	Quantidade de Enzima utilizada	DNA	Tampão	H ₂ O ^(A)
<i>DraI</i>	1 µL	5 µL	2 µL (1X)	12 µL
<i>PvuII</i>	1 µL	5 µL	2 µL (1X)	12 µL
<i>SalI</i>	1 µL	5 µL	4 µL (2X)	10 µL
<i>Sau3AI</i>	1 µL	5 µL	2 µL (1X)	12 µL

^(A) Água Destilada pelo sistema Mili-Q esterilizada

Em seguida os fragmentos obtidos pela digestão foram novamente visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Aproximadamente 10 µl da reação de PCR foram adicionados na canaleta juntamente com 5 µl do tampão de ressuspensão.

9. RIBOTIPAGEM

Southern Blotting (Sambroock *et al.*1989)

9.1. Digestão do DNA genômico

O DNA extraído das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de pacientes mucoviscidóticos, foi quantificado e digerido com a enzima de restrição *PvuII* (CGAT↓CG). Os reagentes foram misturados em tubos de centrifuga de 0,5 mL esterilizados e mantidos a 37°C por 24 horas na seguinte ordem:

DNA (3-5 µg/mL)	Quantidade de Enzima <i>PvuII</i> utilizada	Tampão da enzima (10x)	H ₂ O ^(A) q.s.p
5 µg	2 µL	2 µL (1X)	20 µL

(A) Água Destilada pelo Sistema Mili-Q

Após a eletroforese ter sido corada com Brometo de Etídeo e visualizada, o gel foi fotografado e seguiu-se a transferência para a membrana de Nylon.

9.2. Transferência para a Membrana de Nylon

Observando a técnica descrita por Sambroock *et al.* (1989), o gel foi denaturado por 45 minutos em 500 mL de solução de denaturação (Apêndice 3), rapidamente lavado em água destilada pelo sistema Mili-Q e neutralizado com 300 mL da solução de neutralização (Apêndice 3) por 30 minutos. A solução foi substituída e continuou-se a neutralização por mais 15 minutos.

Enquanto o gel era neutralizado pedaços de papel Watman 3MM foram cortados e rapidamente saturados com tampão 10XSSC (Apêndice 3), colocado sobre o suporte de transferência.

A membrana de Nylon foi cortada no tamanho do gel, rapidamente imersa em água destilada pelo sistema Mili-Q e colocada por 5 minutos numa solução 2XSSC. O gel foi removido da solução de neutralização e colocado invertido sobre o suporte de transferência. A membrana de Nylon foi colocada sobre o gel e, em seguida, foram colocados 2 papéis de Watman 3MM cortados do tamanho do gel e molhados com tampão 2XSSC.

Em cima desse sistema foram colocados 8cm de papel toalha e um peso de 500g. A transferência do DNA ocorreu durante 48 horas. Transcorrido esse tempo, o papel toalha e o

papel Watman 3MM foram removidos e os pontos de aplicação foram marcados com lápis d'água.

A membrana de Nylon foi passada por uma solução 6XSSC e seca em forno a vácuo por 2 horas a 80°C.

9.3. Marcação da Sonda

A sonda escolhida foi um fragmento de DNA de 600pb correspondente a região RNAr 16S, amplificado por PCR utilizando-se como molde o DNA genômico de uma cepa de *P. aeruginosa* isolada de paciente com Fibrose Cística.

A quantidade de 1 µg de DNA amplificado, foi diluída em 20µL de Tampão (Kit BioPrime™ DNA Labeling System – Life Technologies) e colocados no gelo. No gelo foram adicionados 20 µL de 2.5X *Random Primers Solution* (Kit BioPrime™ DNA Labeling System – Life Technologies). A mistura foi colocada em banho maria a 95°C por 5 minutos e imediatamente inserida no gelo. Foram adicionados logo em seguida 5µL de uma solução de 10X dNTP (Kit BioPrime™ DNA Labeling System – Life Technologies) e água destilada pelo sistema Mili-Q esterilizada para um volume final de 49µL. A mistura foi gentilmente agitada e 1µL de *Klenow Fragment* (Large Fragment of DNA Polymerase I - Kit BioPrime™ DNA Labeling System – Life Technologies) foi adicionado. A mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C. Adicionou-se 5 µL de *Stop Solution* (Kit BioPrime™ DNA Labeling System – Life Technologies).

9.4. Hibridização

Em uma garrafa de hibridização foram colocados: a membrana de Nylon pré-hidratada em 2XSSC com 100 μ L por cm² de solução de hibridização (Hibridization Solution-Life Technologies catálogo nº 15592-017). Incubou-se a 42°C por 4 horas. A solução de pré-hibridização foi removida e adicionou-se a nova solução contendo a sonda denaturada (100ng/mL) e resfriada e 100 μ L/cm² de solução de hibridização. A membrana foi incubada por 16 a 18 horas a 42°C, após o que esta foi lavada três vezes com 250mL de 0,1XSSC por 30 minutos (cada lavagem) a 42°C. A membrana foi deixada durante 1 minuto no tampão 1 (Kit BlueGene ® Nonradioactive Nucleic Acid Detection System, catálogo 18279-018) e, em seguida, foi incubada durante 1 hora a 65°C no Tampão 2 (Kit BlueGene ® Nonradioactive Nucleic Acid Detection System, catálogo 18279-018). Depois, a membrana foi lavada em tampão 1 por 15 minutos e posteriormente em tampão 3 (Kit BlueGene ® Nonradioactive Nucleic Acid Detection System, catálogo 18279-018) por 10 minutos. A membrana foi incubada em um saco de hibridização contendo a solução de coloração até total visualização das bandas (Kit BlueGene ® Nonradioactive Nucleic Acid Detection System catálogo 18279-018)., após o que a membrana foi lavada duas vezes em água destilada pelo sistema Mili-Q e seca a temperatura ambiente entre folhas de papel de filtro.

10. DENDOGRAMA

O dendograma de similaridade foi montado pelo programa POPGENE desenvolvido por Francis Yeh, Rongcai Yang e Timothy Boyle e distribuído gratuitamente pelo site <http://www.ualberta.ca/~fyeh/info.htm>.

Através destas técnicas avaliaremos o grau de similaridade genética entre as cepas e a ocorrência de infecção cruzada entre os pacientes. Foi também possível avaliar a incidência de infecção por determinada cepa e sua precedência no período compreendido por este estudo.

RESULTADOS

1. PERFIL DA PRODUÇÃO DAS EXOENZIMAS HEMOLISINA, GELATINASE E ELASTASE DAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES COM FC

Das 56 cepas de *P. aeruginosa*, isoladas de pacientes com Fibrose Cística, 30 (53,6 %) foram positivas para a produção de hemolisina, 21 (37,5 %) foram produtoras de gelatinase e 28 (50,0 %) apresentaram elastase positiva, como pode ser observado na Figura 1. As cepas P1BNM, P3ANM, P4AM, P9BM, P9CNM, P9CM, P9DNM, P12AM, P12BM, P12CM, P13BNM, P13CM não produziram as exoenzimas aqui estudadas (Tabela VIII). Já as cepas P1CM, P4ANM, P6AM, P6CM, P11DNM, P11GNM, P12BNM, P12CNM produziram as três exoenzimas.

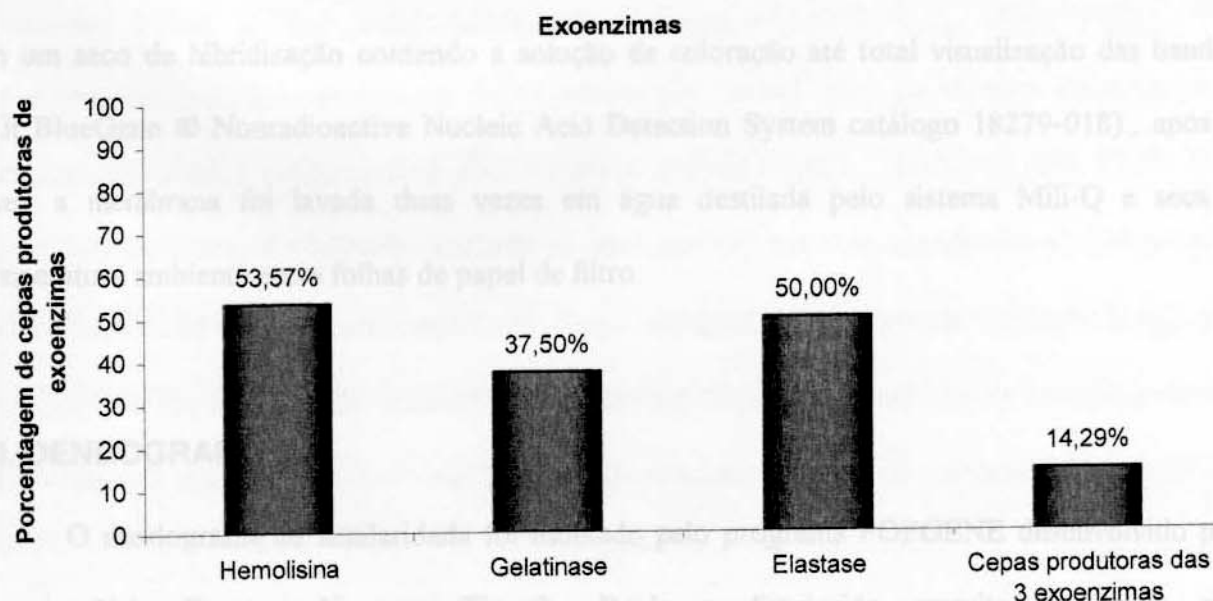


Figura 1 - Porcentagem de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, produtoras das exoenzimas (Hemolisina, Gelatinase e Elastase) (n=56).

Além da capacidade de produção dessas exoenzimas, as amostras foram agrupadas de acordo com a presença ou não da cápsula polissacarídica (mucóide ou não mucóide).

A produção de hemolisina foi verificada através da formação de halos de hemólise ao redor da área do inóculo, em placas de ágar sangue de carneiro, após um período de 24 horas. De um total de 56 cepas analisadas, 16 (28,57%) com o morfotipo mucóide foram positivas para essa característica enquanto que 14 (25,00%) cepas não mucóides, foram positivas (Figura 2).

A capacidade das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de produzir proteinase foi determinada pelo teste de liquefação de gelatina, como descrito no item 3 de Material de Métodos.

Como expresso na Figura 2, pode-se verificar a produção de gelatinase pelos diferentes morfotipos, mucóide e não mucóide. Entre as 56 cepas estudadas, 9 cepas mucóides (16,07%) mostraram-se positivas e 12 cepas não mucóides (21,43%) foram positivas.

A capacidade das cepas de produzirem elastina foi verificada, através da formação de halos de degradação de elastina em volta da colônia no teste de ensaio em placa, como descrito no item 3 do Capítulo de Material e Métodos. Das 56 cepas analisadas, 9 mucóides (16,07%) foram positivas para o teste da elastase, enquanto que, das 19 (33,93 %) cepas não mucóides foram positivas (Figura 2).

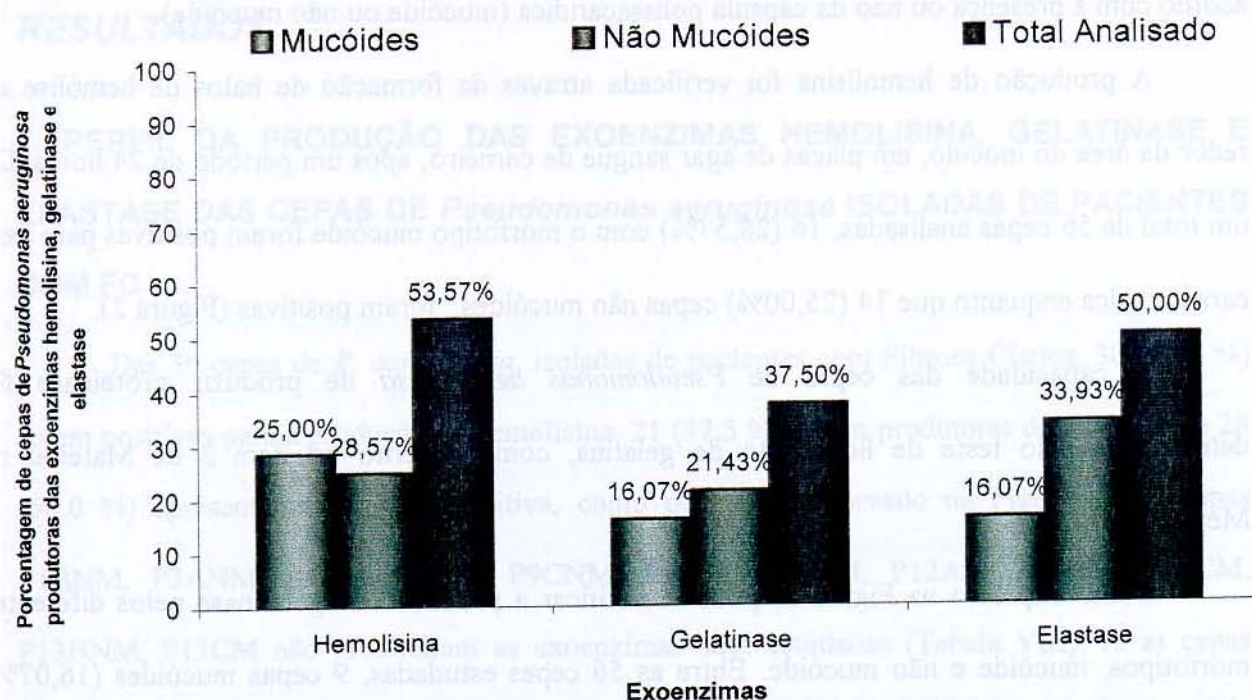


Figura 2 – Porcentagem de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mucóides, não mucóides e totais produtoras das exoenzimas Hemolisina, Gelatinase e Elastase

2. PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES COM MUCOVISCIDOSE.

Na Figura 3 estão expressos os resultados dos testes de resistência a antibióticos das cepas de *P. aeruginosa* obtidos junto ao laboratório de Patologia Clínica do HC/UNICAMP. Uma grande diversidade de resistência a antibióticos foi encontrada. Dentre as 56 cepas analisadas: 96,4% (54/56) mostraram-se resistentes à Ampicilina; 85,7% (48/56) ao Clorafenicol e Cotrimoxazol, 67,9% (38/56) à Cefotaxima; 48,2% (27/56) à Ceftriaxone; 28,6% (16/56) à Gentamicina; 17,9% (10/56) à Netilmicina e Ofloxacina; 14,3% (8/56) à Amicacina e 1,8% (1/56) à Imipenema e Ciprofloxacina.

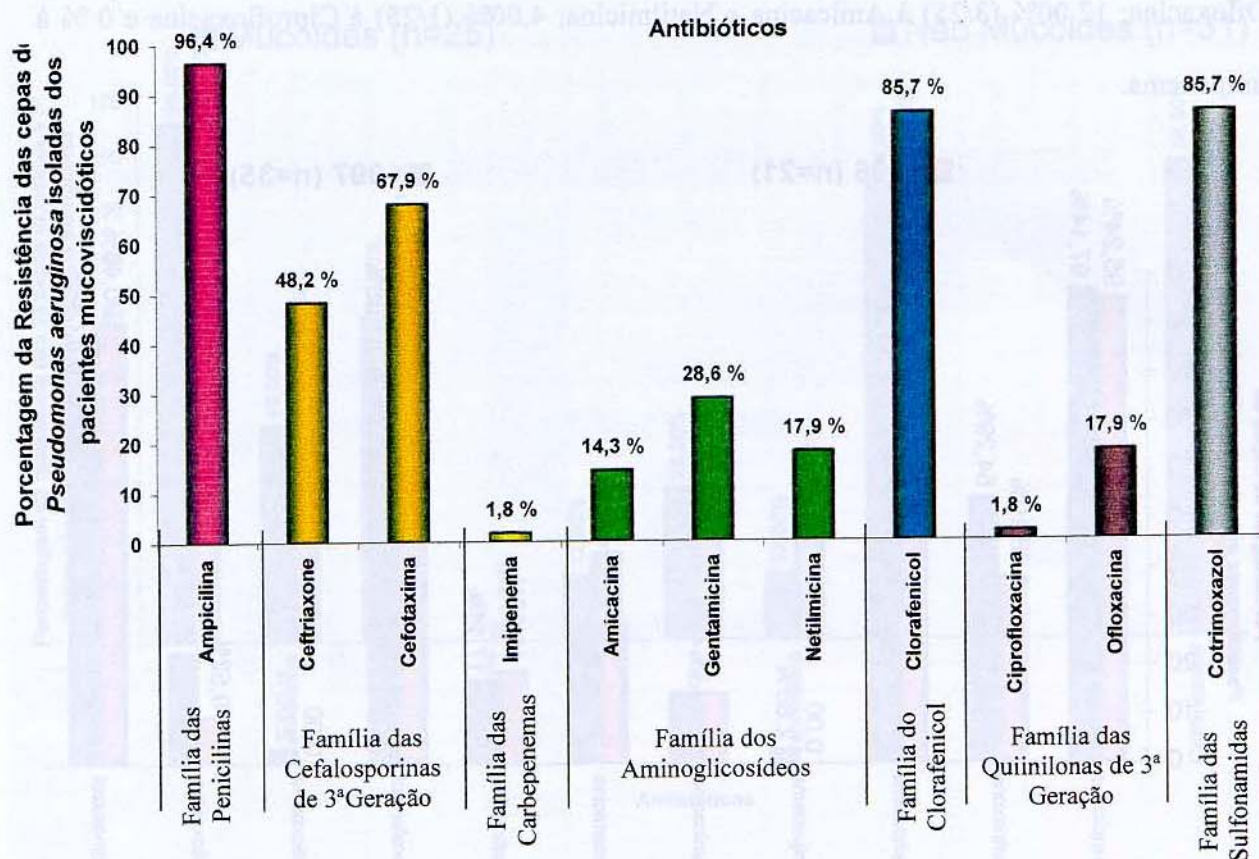


Figura 3 - Porcentagem das 56 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a diferentes antibióticos

Encontramos diferenças dos perfis de resistência entre os anos analisados como podemos observar na Figura 4. Verificamos o aumento da resistência na passagem do ano de 1996 para 1997 para as drogas: Cefotaxima de 47,62% (10/21) para 80,00% (28/35), Ceftriaxone de 38,10% (8/21) para 54,29% (19/35) e Ofloxacina de 9,52% (2/21) para 22,86% (8/35).

Analisando as cepas mucóides, observamos uma diversidade no perfil de resistência a antibióticos (Figura 5). Das 25 cepas estudadas, 96,00% (24/25) mostraram-se resistentes à Ampicilina; 88,00% (22/25) à Cotrimoxazol, 84% (21/25) à Clorafenicol, e 60,00% (15/25) à Cefotaxima; 40,00% (10/25) à Ceftriaxone; 28,00% (7/25) à Gentamicina; 24,00% (6/25) à

Ofloxacina; 12,00% (3/25) à Amicacina e Netilmicina; 4,00% (1/25) à Ciprofloxacina e 0 % à Imipenema.

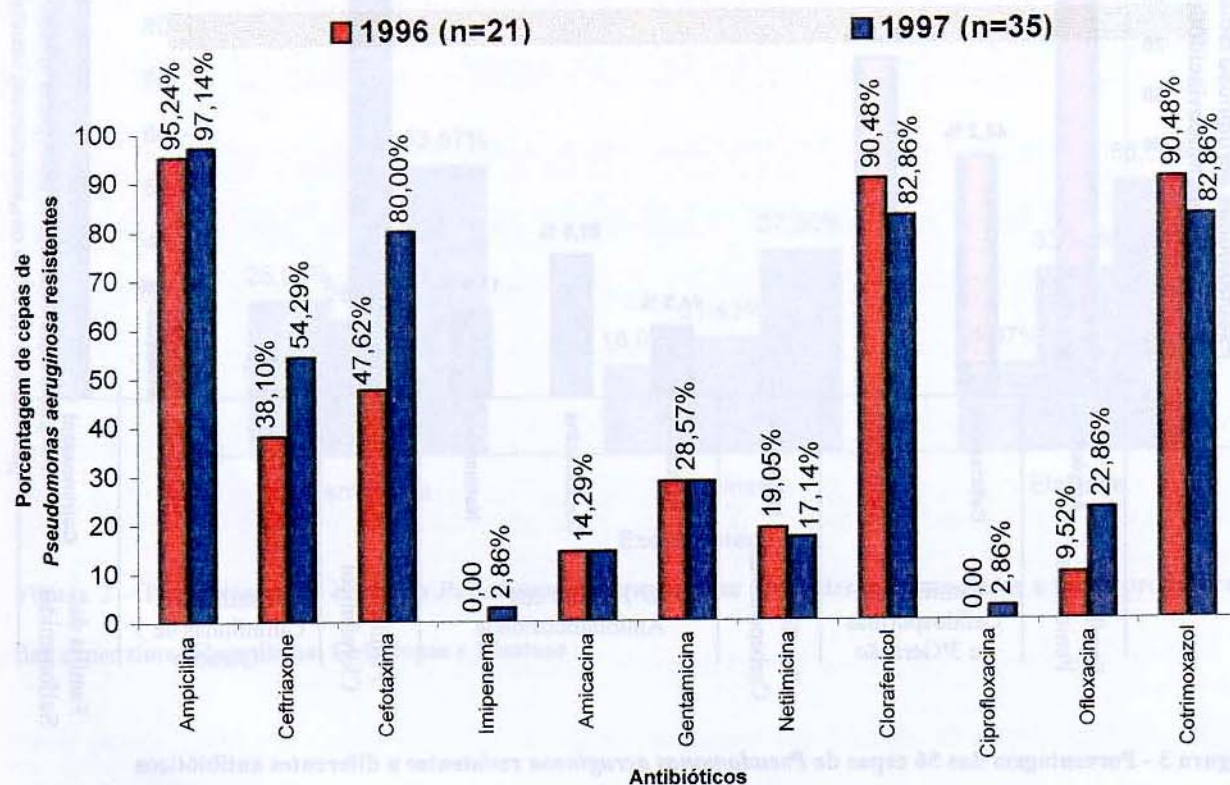


Figura 4 - Porcentagem de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a diferentes antibióticos nos anos de 1996 e 1997

Também foi encontrada diversidade de resistência a antibióticos entre as cepas não mucóides (Figura 5). Das 31 cepas analisadas, 87,10 % (27/31) mostraram-se resistentes à Clorafenicol, 96,77% (30/31) Ampicilina; 83,87% (26/31) à Cotrimoxazol, 74,19% (23/31) à Cefotaxima, 54,84% (17/31) à Ceftriaxone; 29,03% (9/31) à Gentamicina; 22,58% (7/31) à Netilmicina; 16,13% (5/31) à Amicacina; 12,90% (4/31) à Ofloxacina; 3,23% (1/31) à Imipema e 0 % para Ciprofloxacina

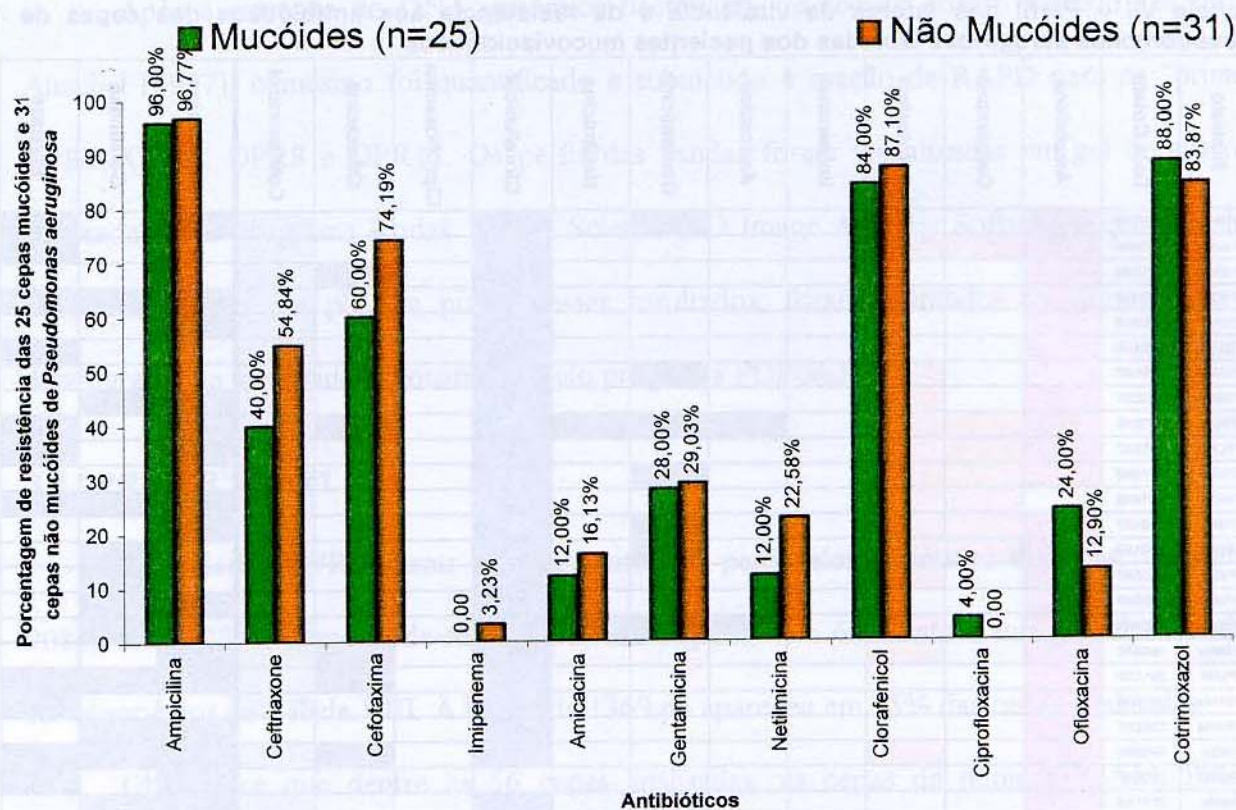


Figura 5 – Porcentagem de resistência das 25 cepas mucóides e 31 cepas não mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* isolada dos pacientes com FC

Analisando o perfil de resistência de *P. aeruginosa* em relação aos 13 pacientes, pode-se verificar que houve uma alteração nos perfis relativos aos fatores de virulência e de resistência aos antibióticos. Estes dados estão colocados na Tabela VII onde os quadrados preenchidos significam resistência aos antibióticos e produção das exoenzimas hemolisina, gelatinase e elastase.

[illegible][illegible]

3. RANDOM AMPLIFICATION POLIMORFIC DNA (RAPD)

Após a extração do DNA genômico bacteriano, de acordo com o método descrito por Ausubel (1987), o mesmo foi quantificado e submetido à reação de RAPD para os “primers”: OPR1, OPR2, OPR8 e OPR13. Os perfis das bandas foram visualizadas em gel de agarose e analisadas pelo programa Kodak Digital Science (1D Image Analysis Software), que calculou o peso das bandas em pb. De posse desses resultados, foram montados os Zimogramas e o dendograma de similaridade construído pelo programa POPGENE.

3.1 “PRIMER” OPR1

O iniciador OPR1 gerou 12 fragmentos de perfis eletroforéticos distintos, variando de 908pb até 3007pb, como pode-se observar nas Figuras 6a e 6b. Vinte e seis genótipos puderam ser observados na Tabela VIII. A banda de 1369 pb apareceu em 75% das cepas analisadas.

Observa-se que dentre as 56 cepas analisadas, as cepas de número P4AM, P9CM e P12CM não evidenciaram produto de amplificação.

3.2 “PRIMER” OPR2

Para o iniciador OPR2 foram encontrados vinte fragmentos amplificados de peso molecular distintos variando de 557pb a 3224pb (Figuras 7a e 7b). A banda de 1004pb apareceu em 75% das cepas analisadas e as bandas de 1212 e 689 apareceram em 50% das cepas. Trinta e dois genótipos diferentes foram evidenciados para esse “primer” como pode-se observar no Zimograma (Tabela IX).

As cepas cujo DNA não resultou produto de amplificação foram: P1AM, P4AM, P4CM, P5BNM, P6BNM e P9CM.



Figura 6a – Teste de RAPD para o “primer” OPR1 das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1kb-Marcador de Peso Molecular; 1-P1ANM; 2- P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6BNM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 25-P7AM; 26 P7ANM; 27-P8AM; 28-PANM; 29-P8BM. **Cepa não amplificada: 12-P4AM.**

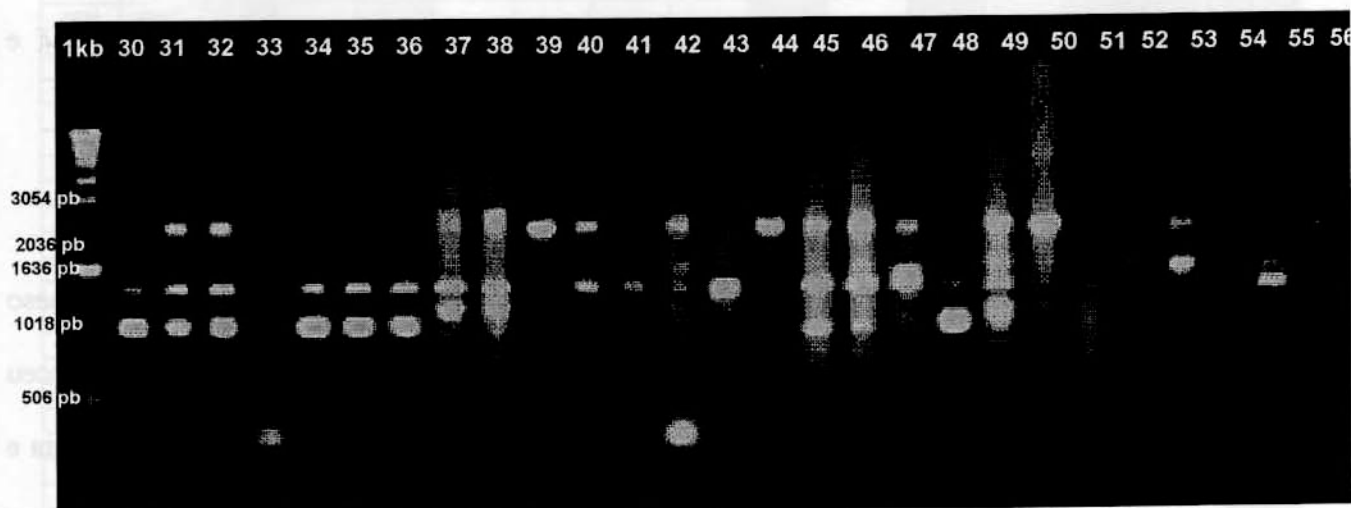


Figura 6b - Teste de RAPD para o “primer” OPR1 das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1kb-Marcador de Peso Molecular; 30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BN; 33-P9CM; 34-P9CNM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 44-P11DNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM.

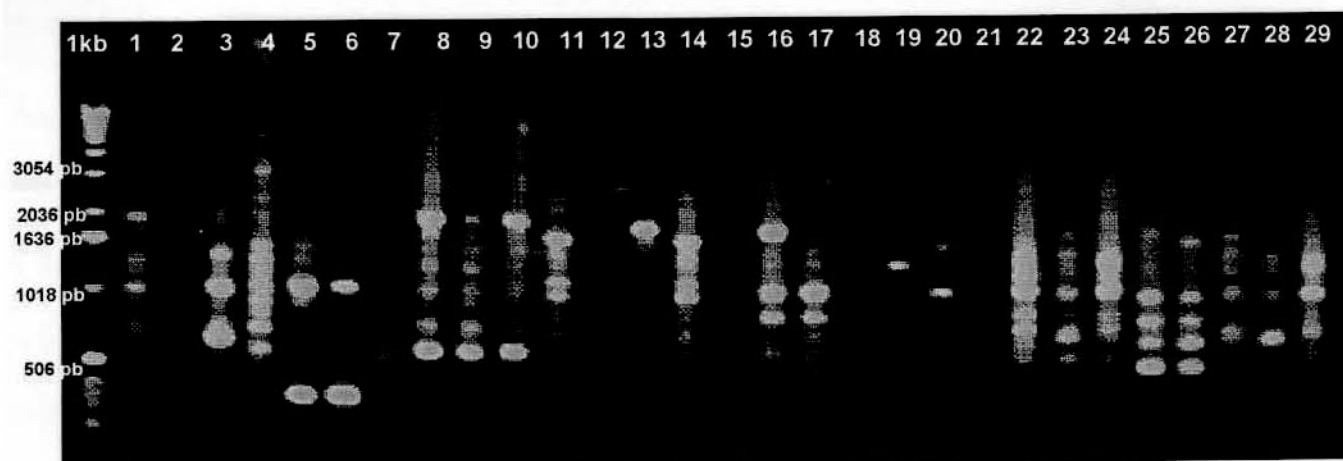


Figura 7a – Teste de RAPD para o “primer” OPR2 das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1kb-Marcador de Peso Molecular; 1-P1ANM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 16-P5AM; 17-P5BM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 25-P7AM; 26-P7ANM; 27-P8AM; 28-P8ANM; 29-P8BM. **Cepas não amplificadas: 2-P1AM; 12-P4AM; 15-P4CM; 18-P5BNM; 21-P6BNM.**

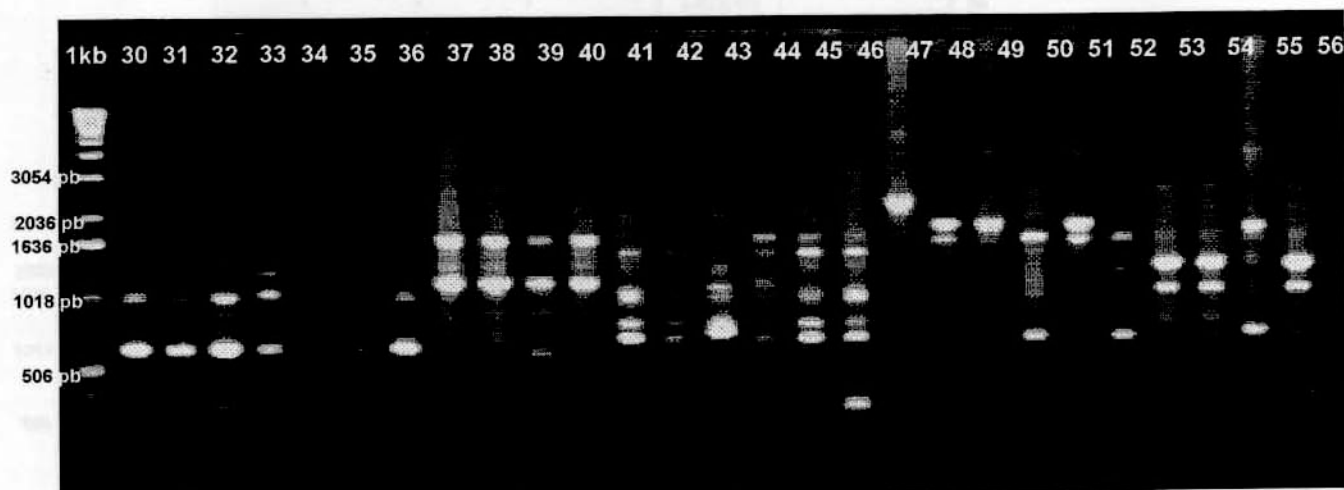


Figura 7b – Teste de RAPD para o “primer” OPR2 das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1kb-Marcador de Peso Molecular; 30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BN; 33-P9CM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 44-P11DNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM. **Cepa não amplificada: 34-P9CNM.**

3.3 “PRIMER” OPR 8

Encontra-se 22 perfis de fragmentos eletroforéticos distintos variando de 475pb a 2115pb (Figuras 8a e 8b), distribuídos em 36 genótipos, como pode ser observado no Zimograma apresentado na Tabela XI. A banda de 1867pb apareceu em mais de 60% das cepas analisadas.

As cepas cujo DNA não resultou produto de amplificação foram: P7AM, P11DNM, P12CM, P12CNM, P13CM

3.4 “PRIMER” OPR13

Nenhuma cepa amplificou com esse “primer”.

4. ERIC-PCR

Na tipagem por ERIC-PCR, foram encontrados 19 perfis de amplificação. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 12216pb até 396pb (Figuras 9a e 9b). As cepas foram distribuídos em 34 genótipos (Zimograma construído na Tabela XII). Quatro bandas (12216pb, 1205pb, 674pb, 488pb) apareceram em mais de 50% das cepas analisadas, sendo que a banda de 488pb apareceu em 96% das cepas. As cepas cujo DNA não resultou produto de amplificação foram: P3CM e P6CNM.

5. REP-PCR

Não consideramos os resultados para a amplificação com esse “primer” porque das 56 cepas nenhuma amplificou.



Figura 8a – Teste de RAPD para o “primer” OPR8 das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1kb-Marcador de Peso Molecular; 1-P1ANM; 2- P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 12-P4AM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6BNM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 26-P7ANM; 27-P8AM; 28-P8ANM; 29-P8BM. Cepas não amplificadas: P7AM

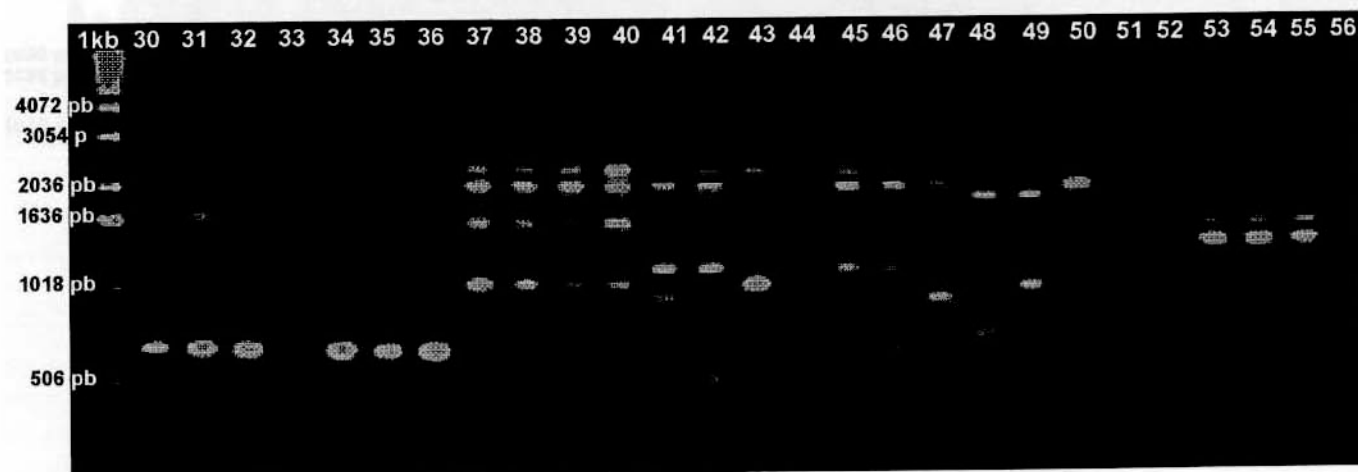


Figura 8b – Teste de RAPD para o “primer” OPR8 das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1kb-Marcador de Peso Molecular; 30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BN; 33-P9CM; 34-P9CNM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM. Cepas não amplificadas: 44-P11DNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 56-P13CM.

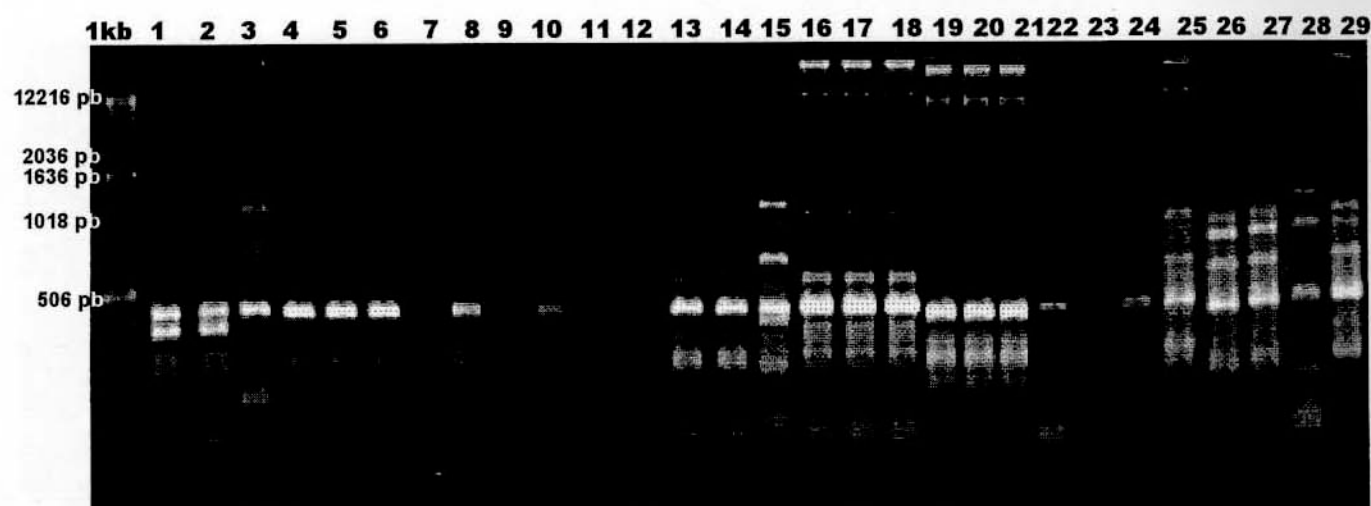


Figura 9a - Teste de ERIC-PCR para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1kb-Marcador de Peso Molecular; 1-P1ANM; 2-P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 12-P4AM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6CM; 22-P6BNM; 24-P6DM; 25-P12ANM; 26-P12BM; 27-P12CM; 28-P12BNM; 29-P12CNM. Cepas não amplificadas 9-P3CM; 23-P6CNM.

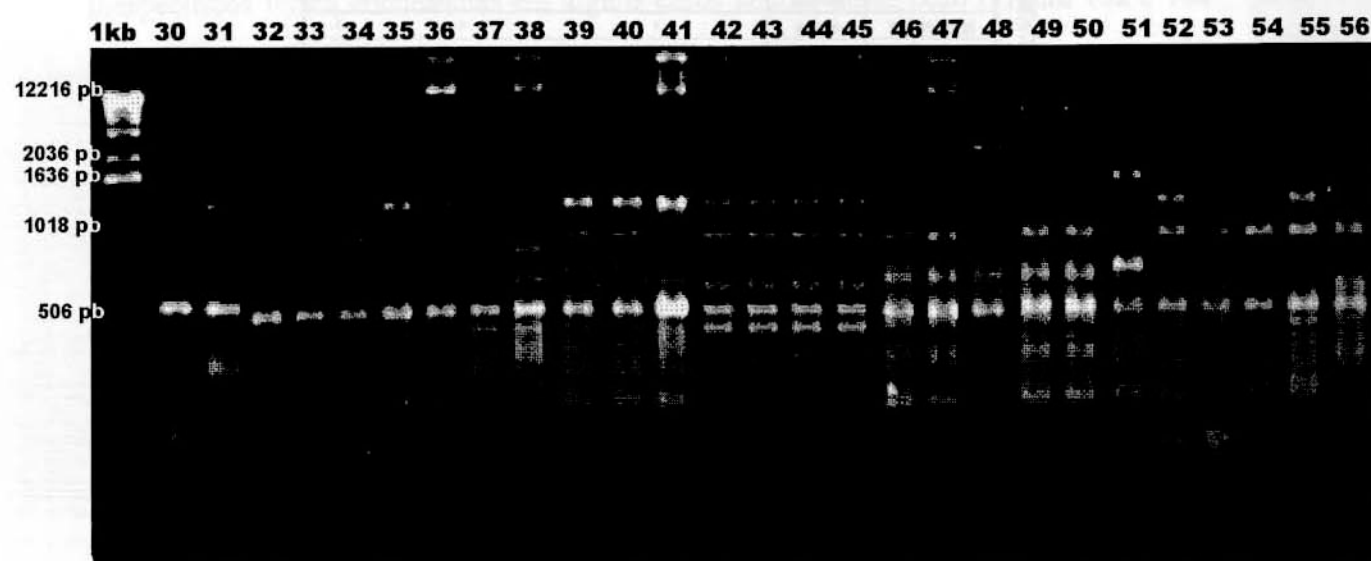


Figura 9b - Teste de ERIC-PCR para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1kb-Marcador de Peso Molecular; 30-P7ANM; 31-P7AM; 32-P8AM; 33-P8ANM; 34-P8BM; 35-P9AM; 36-P9BNM; 37-P9BM; 38-P9CM; 39-P9CNM; 40-P9DM; 41-P9DNM; 42-P10AM; 43-P10ANM; 44-P10BM; 45-P10BNM; 46-P11ANM; 47-P11BNM; 48-P11DNM; 49-P11ENM; 50-P11FNM; 51-P11GNM; 52-P11CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM.

6. PCR PARA A REGIÃO DNAr 16S

Os DNAs extraídos de todas as amostras foram quantificados e submetidos a reação de PCR com os “primers” RIBO16S (RIBOS16s1 e RIBO16s2), por nós desenhados de acordo com a sequência abaixo descritas por Toshka *et al.*, (1988) e depositadas no Gene Bank com o número X06684 em 19/09/1991. Para o desenho esses “primers” foram utilizados o programa Blast, que mostrou que essa sequência é específica para a região DNAr 16S, e o programa Blast2 “Sequences” que analisou se o primer tinha homologia com a sequência descrita.

O padrão eletroforético após amplificação foi visualizado em gel de agarose. Como esperado, essa banda apresentou o peso molecular de 1300pb. Produtos de amplificação inespecíficos foram encontradas em alguns casos abaixo desse peso (Figura 10a e 10b). Como padrão de peso molecular foi utilizado o padrão de 100pb.

Os “primers” por nós desenhados foram :

```

1   gaactgaaga gtttgatcat ggctcagatt gaacgctggc agcaggggcc ttcaacacat gcaagtcgag cttatgaagg
81  gagcttgccct tggattcagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaatct gcctggtagt .....
    5' -----> 3' - RIBO16S1
1201 ..... gccagggcta cacacgtgct acaatggtcg gtacaaaggg ttgccaagcc gcgagtggga gctaattcca
1281 taaaaccgat cgtagtccgg atcgcagtct gcaactcgac tgcgtgaagt cggaatcgct agtaatcgtg aatcagaatg
    16RIBOS2 3' <----- 5'
1361 tcacggtgaa tacgtccccg ggccttgtag acaccgcccc tcacaccatg ggagtegggt gctccagaag tagctagtct
1441 aaccgcaagg gggacgggta ccacggagtg attcatgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtagg ggaacctgcg
1521 gctggatcac ctcctta

```



Figura 10a – Teste de PCR para a região DNAr 16S das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes FC.

100pb-Marcador de Peso Molecular; 1-P1ANM; 2- P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 12-P4AM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6BNM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 25-P7AM; 26 P7ANM; 27-P8AM; 28- P8ANM; 29-P8BM.

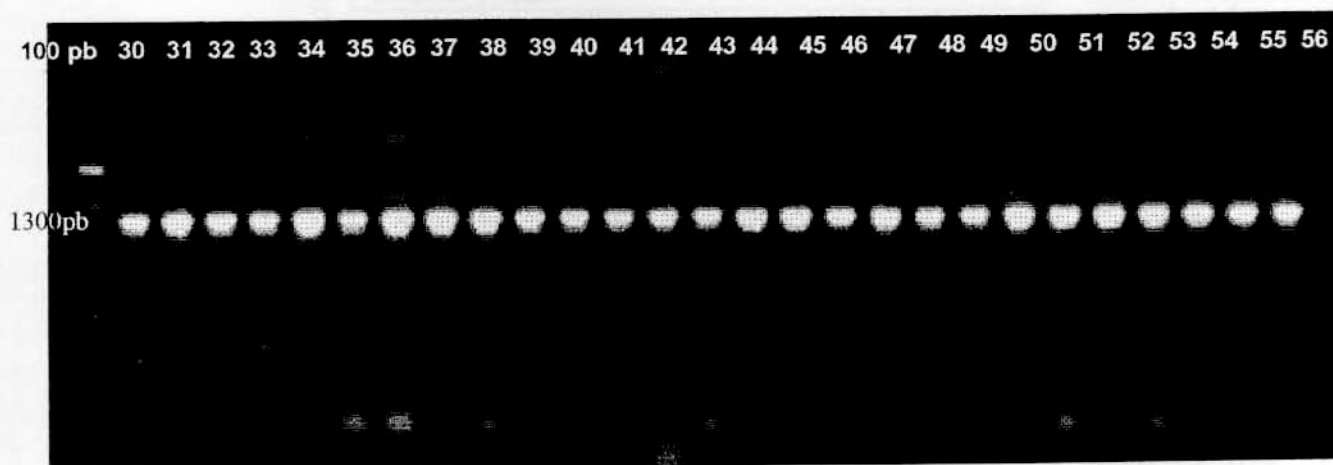


Figura 10b Teste de PCR para a região DNAr 16S das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes FC.

100pb-Marcador de Peso Molecular; 30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BN; 33-P9CM; 34-P9CNM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 44-P11DNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM.

7. POLIMORFISMO PARA A REGIÃO DNAr 16S

O fragmento correspondente ao rDNA 16S das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* amplificado na Reação da Polimerase em Cadeia foi digerido com diferentes enzimas de restrição para determinação de polimorfismo. As enzimas testadas para a detecção do polimorfismo foram: *HaeIII*, *BamHI*, *SmaI*, *SacII*, *EcoRI*, *EcoRIV*, *PvuII*.

Para todas as cepas analisadas, a digestão com a enzima *BamHI* (Figuras 11a e 11b), resultou em dois fragmentos de 700pb e 600pb, respectivamente. Um único padrão de digestão foi obtido com a enzima *SacII* e resultou nos fragmentos de 900pb e 400pb para todas as cepas analisadas (Figuras 12a e 12b). Todos os fragmentos DNAr 16S apresentaram sítios para essas enzimas.

Os genes DNAr não apresentaram sítios de restrição para as enzimas: *HaeIII*, *SmaI*, *EcoRI*, *EcoRIV*, *PvuII*.

Desta forma, não foi possível diferenciar as cepas entre si utilizando essa técnica

Nas Figuras 11a, 11b, 12a e 12b observamos uma banda de 1300pb referente ao fragmento DNAr 16S amplificado que não foi totalmente digerido e, as bandas que aparecem abaixo de 600pb são produtos inespecíficos que não amplificaram na reação de PCR.

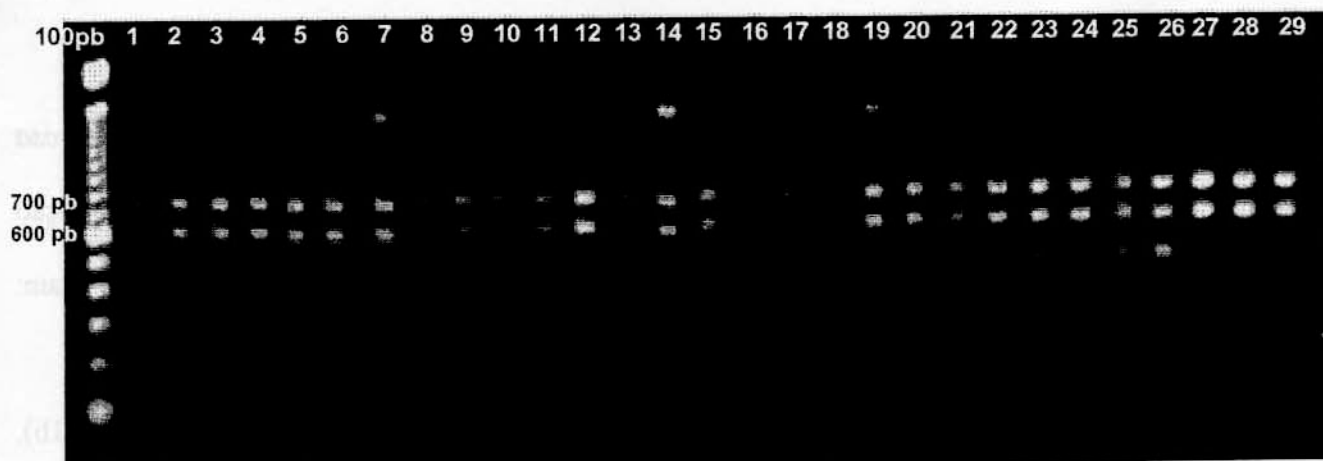


Figura 11a – Polimorfismo para a enzima de restrição *Bam*HI da região rDNA 16S para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes FC.

100pb-Marcador de Peso Molecular; 1-P1ANM; 2-P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 12-P4AM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6BNM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 25-P7AM; 26-P7ANM; 27-P8AM; 28-P8ANM; 29-P8BM.

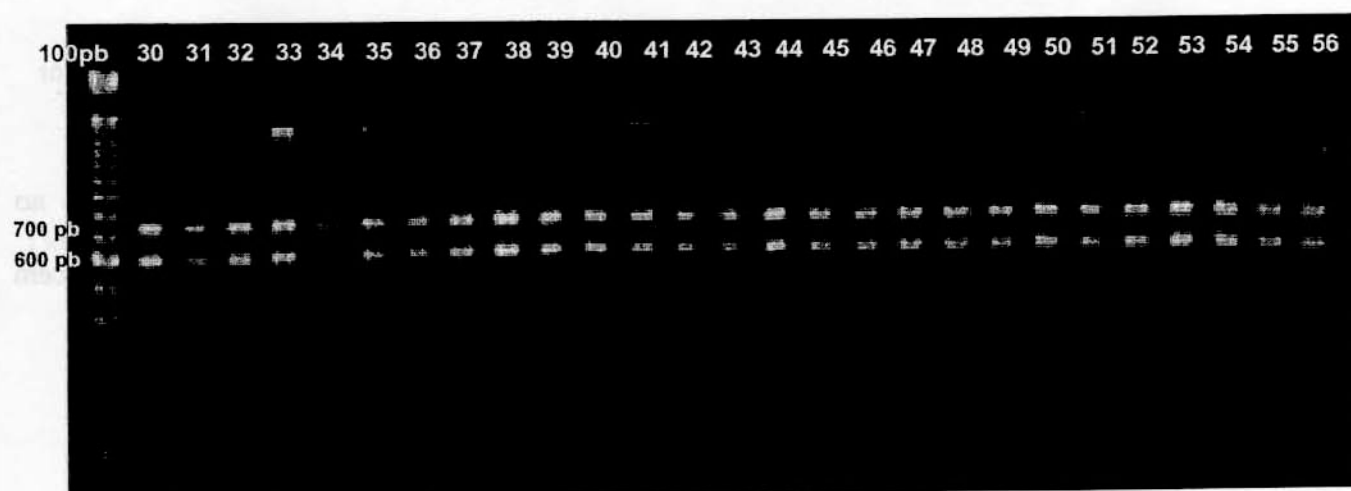


Figura 11b – Polimorfismo para a enzima de restrição *Bam*HI da região rDNA 16S para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes mucoviscidóticos.

100pb-Marcador de Peso Molecular; 30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BN; 33-P9CM; 34-P9CNM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 44-P11DNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM.

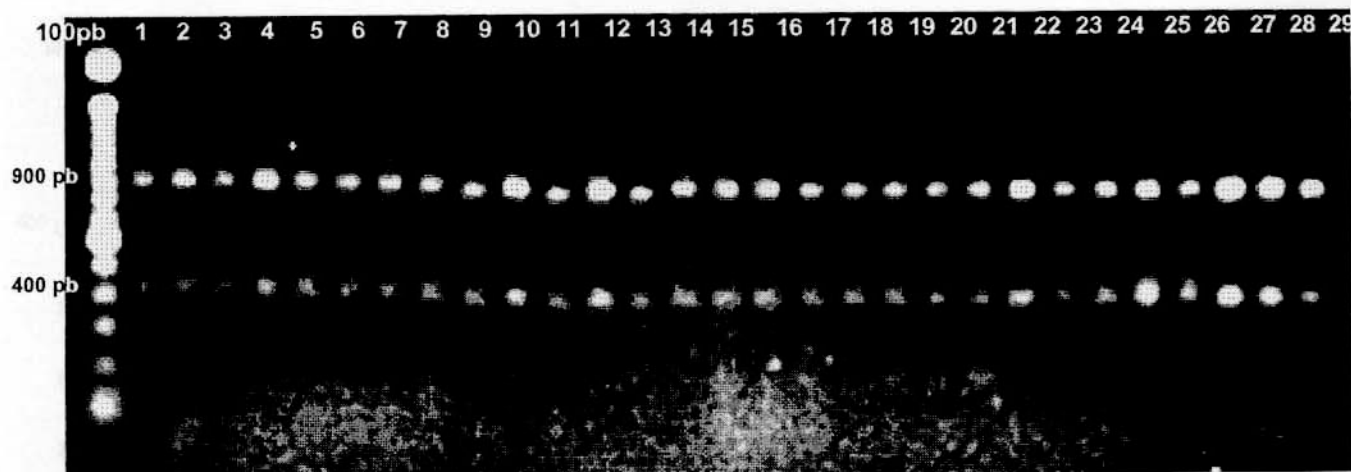


Figura 12a - Polimorfismo para a enzima *SacII* da região rDNA 16S para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes FC

100pb-Marcador de Peso Molecular; 1-P1ANM; 2-P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 12-P4AM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6BNM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 25-P7AM; 26-P7ANM; 27-P8AM; 28-P8ANM; 29-P8BM.

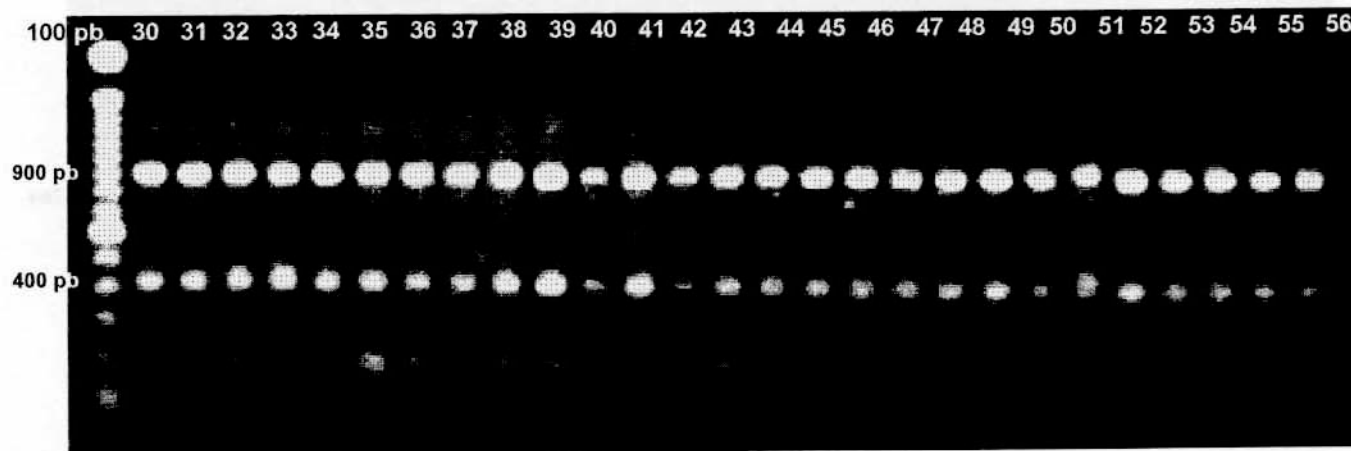


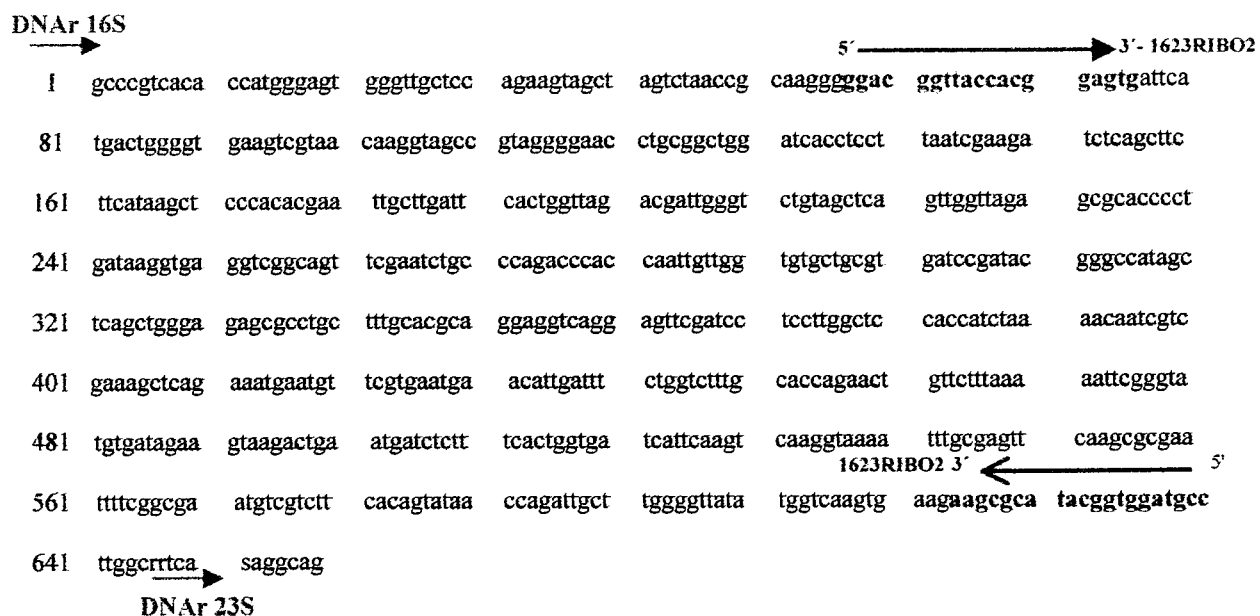
Figura 12b - Polimorfismo para a enzima *SacII* da região rDNA 16S para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes mucoviscidóticos

100pb-Marcador de Peso Molecular; 30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BNM; 33-P9CM; 34-P9CNM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 44-P11DNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM.

8. PCR PARA A REGIÃO INTERGÊNICA CONSENSO ENTRE 16-23S (ITS)

A partir do DNA extraído, de acordo com o método descrito por Ausubel (1987), realiza-se a reação de PCR utilizando os “primers” 1623RIBO1 e 1623RIBO2, por nós desenhados de acordo com a sequência descrita abaixo por Tyler *et al.*, (1995) e depositada no GenBank com o número de acesso L28150. As sequências também foram submetidas aos programas Blast e Blast 2 “Sequence”.

Observa-se após a eletroforese em gel de agarose 1,5% que todas as cepas amplificaram com o par de “primers”, gerando um produto de 600pb (Figuras 13a e 13b), conforme esperado.



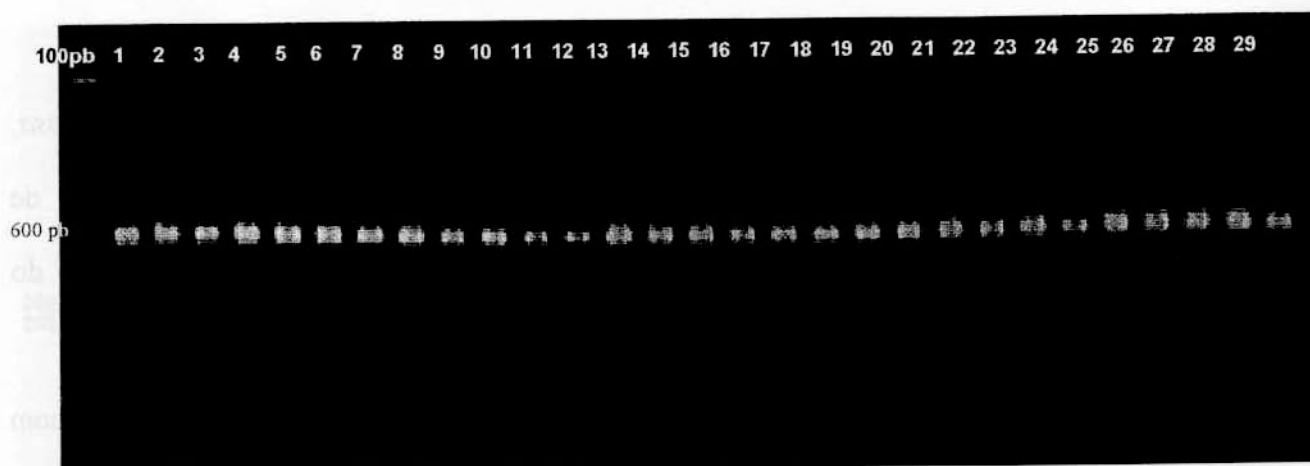


Figura 13a - PCR para a Região Intergênica de Consenso 16S-23S das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes FC.

1-P1ANM; 2- P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 12-P4AM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6BNM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 25-P7AM; 26 P7ANM; 27-P8AM; 28-P8ANM; 29-P8BM.



Figura 13b - PCR para a Região Intergênica de Consenso 16S-23S das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes FC.

30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BN; 33-P9CM; 34-P9CNM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 44-P11DNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM.

9. POLIMORFISMO PARA A REGIÃO INTERGÊNICA CONSENSO 16S-23S

O fragmento correspondente ao rDNA 16s-23s das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, amplificado por Reação da Polimerase em Cadeia, foi digerido com diferentes enzimas de restrição para determinação do polimorfismo. As enzimas testadas para a detecção do polimorfismo foram: *DraI*, *SalI*, *Sau3AI*, *EcoRI*, *PvuII*.

A digestão com a enzima *PvuII*, resultou em dois fragmentos, um com 250pb e outro com 350pb para todas as cepas analisadas (Figura 14a e 14b).

Um único padrão de digestão foi obtido com a enzima *DraI* e resultou nos fragmentos de 200pb e 400pb como podemos verificar nas Figuras 15a e 15b. Para essa enzima, só foi apresentado um gel, já que o segundo gel mostrou-se igual ao primeiro.

Todos os fragmentos amplificados não apresentaram sítios de restrição para as enzimas: *SalI*, *Sau3AI*, *EcoRI*

Desta forma essa técnica mostrou-se ineficiente na discriminação entre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.



Figura 14a – Polimorfismo apresentado pela enzima *PvuII* para a região intergênica de consenso 16S-23S para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes FC.

1-P1ANM; 2- P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 12-P4AM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6BNM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 25-P7AM; 26 P7ANM; 27-P8AM; 28-P8ANM; 29-P8BM.

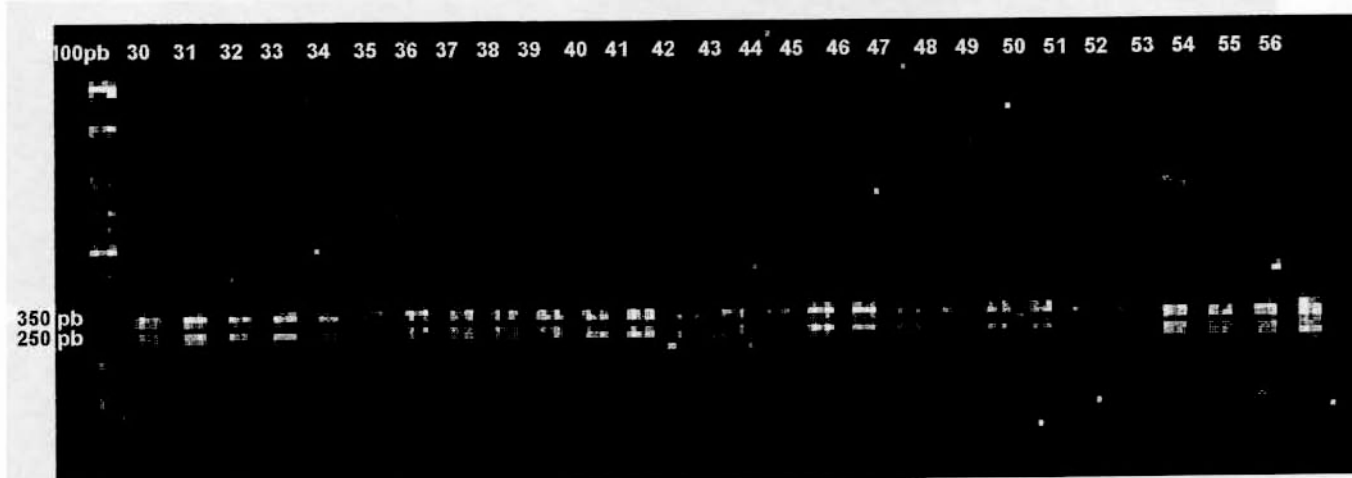


Figura 14b – Polimorfismo apresentado pela enzima *PvuII* para a região intergênica de consenso 16S-23S para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BN; 33-P9CM; 34-P9CNM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 44-P11DNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM.

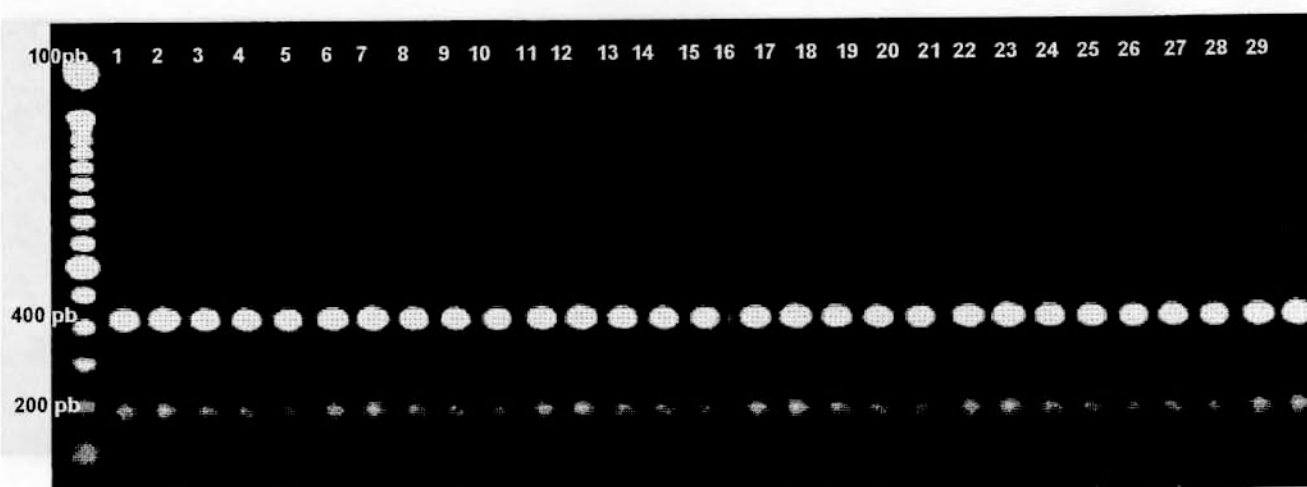


Figura 15a - Polimorfismo apresentado pela enzima *DraI* para a região intergênica de consenso 16S-23S para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes FC.

1-P1ANM; 2- P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3ANM; 8-P3BNM; 9-P3CM; 10-P3CNM; 11-P4ANM; 12-P4AM; 13-P4BM; 14-P4BNM; 15-P4CM; 16-P5AM; 17-P5BM; 18-P5BNM; 19-P6AM; 20-P6ANM; 21-P6BNM; 22-P6CM; 23-P6CNM; 24-P6DM; 25-P7AM; 26 P7ANM; 27-P8AM; 28-P8ANM; 29-P8BM.



Figura 15b - Polimorfismo apresentado pela enzima *DraI* para a região intergênica de consenso 16S-23S para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes FC.

30-P9ANM; 31-P9BM; 32-P9BN; 33-P9CM; 34-P9CNM; 35-P9DM; 36-P9DNM; 37-P10AM; 38-P10ANM; 39-P10BM; 40-P10BNM; 41-P11ANM; 42-P11BNM; 43-P11CNM; 44-P11DNM; 45-P11ENM; 46-P11FNM; 47-P11GNM; 48-P12AM; 49-P12BM; 50-P12BNM; 51-P12CM; 52-P12CNM; 53-P13ANM; 54-P13BNM; 55-P13BM; 56-P13CM.

10. RIBOTIPAGEM

O DNA genômico das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi digerido com a enzima *PvuII* e os fragmentos resultantes separados por eletroforese em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda do rDNA 16S amplificado. Os perfis eletroforéticos encontram-se nas Figuras 16a a 16e.

As cepas foram consideradas idênticas quando os perfis de bandas apresentaram fragmentos com tamanhos iguais, e consideradas diferentes quando um ou mais fragmentos de restrição, que hibridizaram com a sonda, apresentaram tamanhos diferentes.

As linhagens cujo DNA não hibridizou com a sonda foram: P5BNM, P6DM, P8ANM, P12AM, P12BM, P12CM.

Foram detectados 8 bandas de peso molecular distintas entre 2151 a 12216 pb, os quais agruparam as cepas em 10 ribotipos, como pode ser observado no Zimograma construído na Tabela XIII.

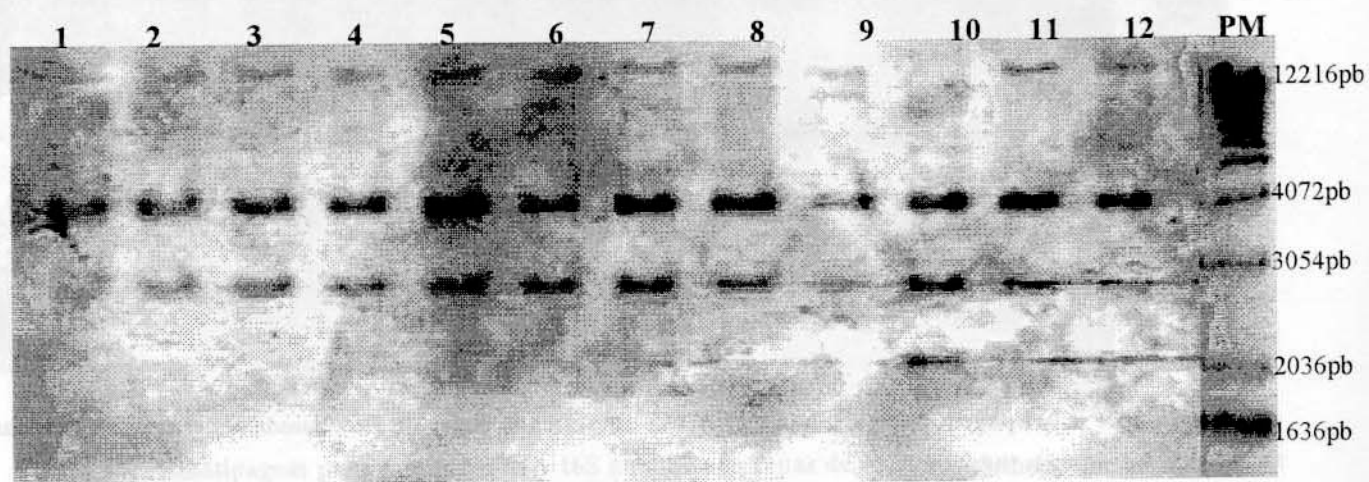


Figura 16a: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes FC

1- P1ANM; 2- P1AM; 3-P1BNM; 4-P1CM; 5-P2AM; 6-P2ANM; 7-P3BNM; 8-P4BM; 9-P4BNM; 10-P4CM; 11-P5AM; 12-P5BM; PM- Padrão de peso molecular de 1KB.

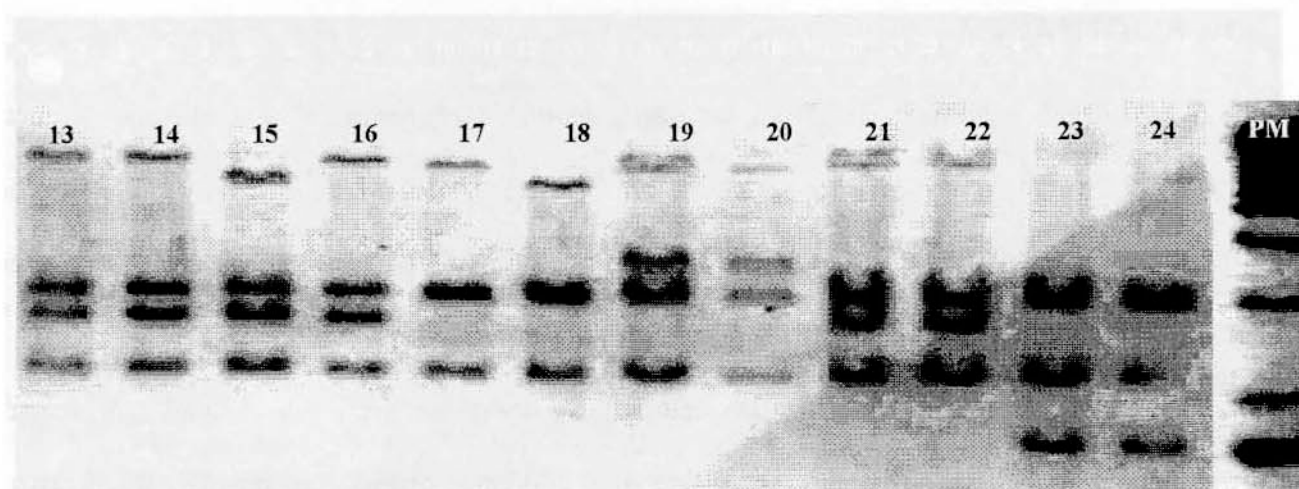


Figura 16b: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes FC

13-P9BM; 14-P9ANM; 15-P8BM; 16-P8AM; 17-P7AM; 18-P7ANM; 19-P12CNM; 20-P6CNM; 21-P6CM; 22-P6BNM; 23-P6ANM; 24-P6AM; PM- Padrão de peso molecular de 1KB.

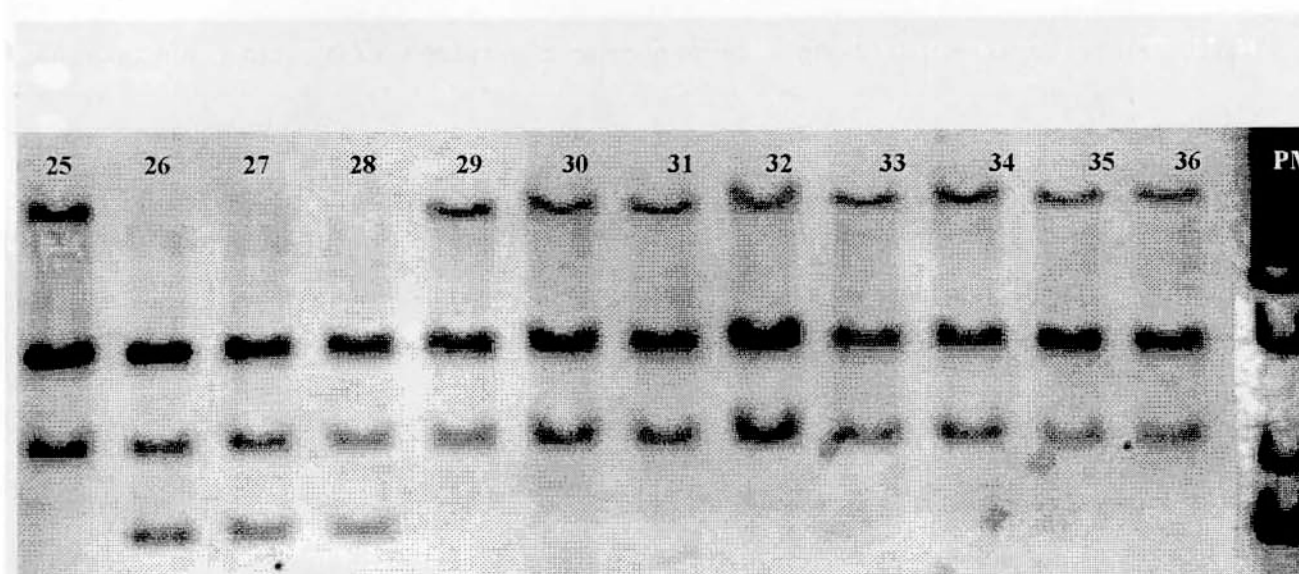


Figura 16c: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes mucovisciditóticos

25-P9BNM; 26-P9CNM; 27-P9DM; 28-P9CM; 29-P10AM; 30-P10ANM; 31-P10BM; 32-P10BNM; 33-P11ANM; 34-P11DNM; 35-P11ENM; 36-P11FNM; PM- Padrão de peso molecular de 1KB.

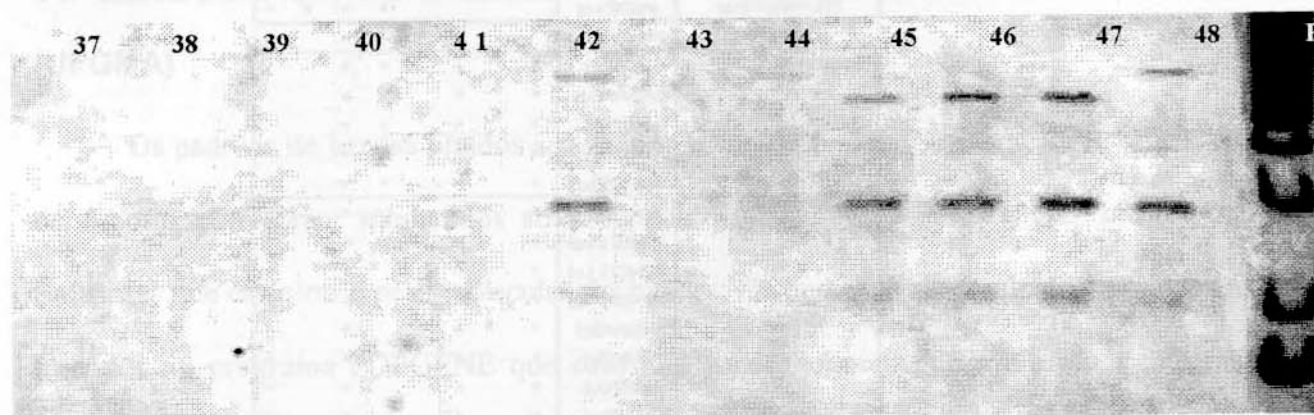


Figura 16d: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes mucovisciditóticos

37-P8AN; 38-P12CM; 39-P12BM; 40-P12AM; 41-P6DM; 42-P6CNM; 43-P5BNM; 44-P4AM; 45-P4ANM; 46-P3CNM; 47-P3CM; 48-P3ANM; PM- Padrão de peso molecular de 1KB.

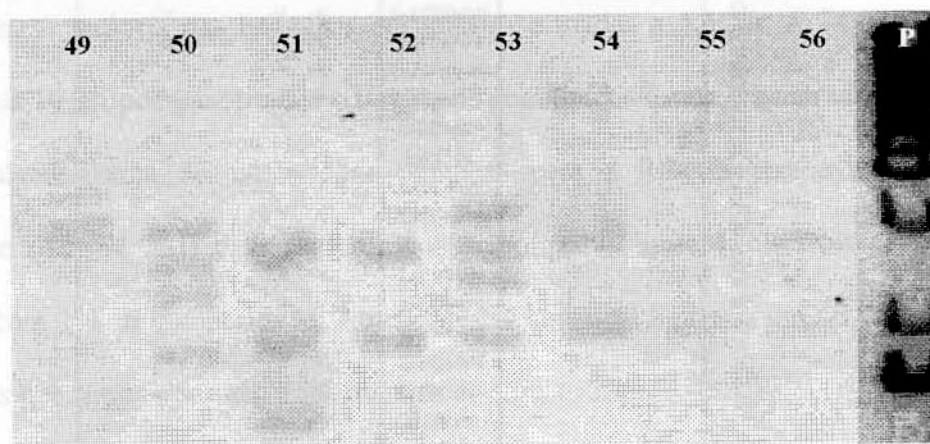


Figura 16e: Ribotipagem para a sonda rDNA 16S amplificado cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes mucovisciditóticos

49-P13CM; 50-P13BM; 51-P13BNM; 52-P13ANM; 53-P11CNM; 54-P11GNM; 55-P11BNM; 56-P9CM; PM- Padrão de peso molecular de 1KB.

11. DENDOGRAMA DE SIMILARIDADE UTILIZANDO O PROGRAMA POPGENE (UPGMA)

Os padrões de bandas obtidos após a amplificação com os "primers" OPR, ERIC-PCR e da Ribotipagem foram submetidos ao programa Kodak Digital Science (1D Image Analysis Software) que calculou o peso molecular das bandas. De posse desses resultados, os dados foram inseridos no programa POPGENE que construiu os dendogramas de similaridade mostrados a seguir.

Foi construído um dendograma (Figura 17a) único para os "primers" OPR, o que resultou na formação de 51 genótipos, distribuídos em dois grandes grupos com 2,26% de similaridade. O primeiro grupo foi ligado a 12,64% de similaridade. Em 73,30%, encontramos 28 genótipos diferentes e em 89,24% 8 genótipos diferentes foram encontrados.

Para o dendograma de similaridade montado a partir dos resultados de ERIC-PCR (Figura 17b), foram encontrados 35 genótipos distribuídos em dois agrupamentos, com 2,31% de similaridade. A maioria das linhagens encontram-se unidas a 5,51%. A 74,22% de similaridade encontramos 16 grupos genotípicos e 10 grupos genotípicos foram encontrados em 87,48%.

O dendograma de similaridade montado para a Ribotipagem evidenciou 8 perfis de ribotipagem (Tabela XII) distribuídos em 10 ribótipos (Figura 17c). Dois grandes grupos são formados com 1% de Similaridade. A maioria das amostras ligam-se em 46,72% de similaridade. Metade dos genótipos possuem 76% ou mais de similaridade.

Dos dendogramas montados o que foi mais eficiente para a análise de epidemiologia molecular foi o dendograma RAPD (Figura 15a), porque ele permitiu um maior número de genótipos.

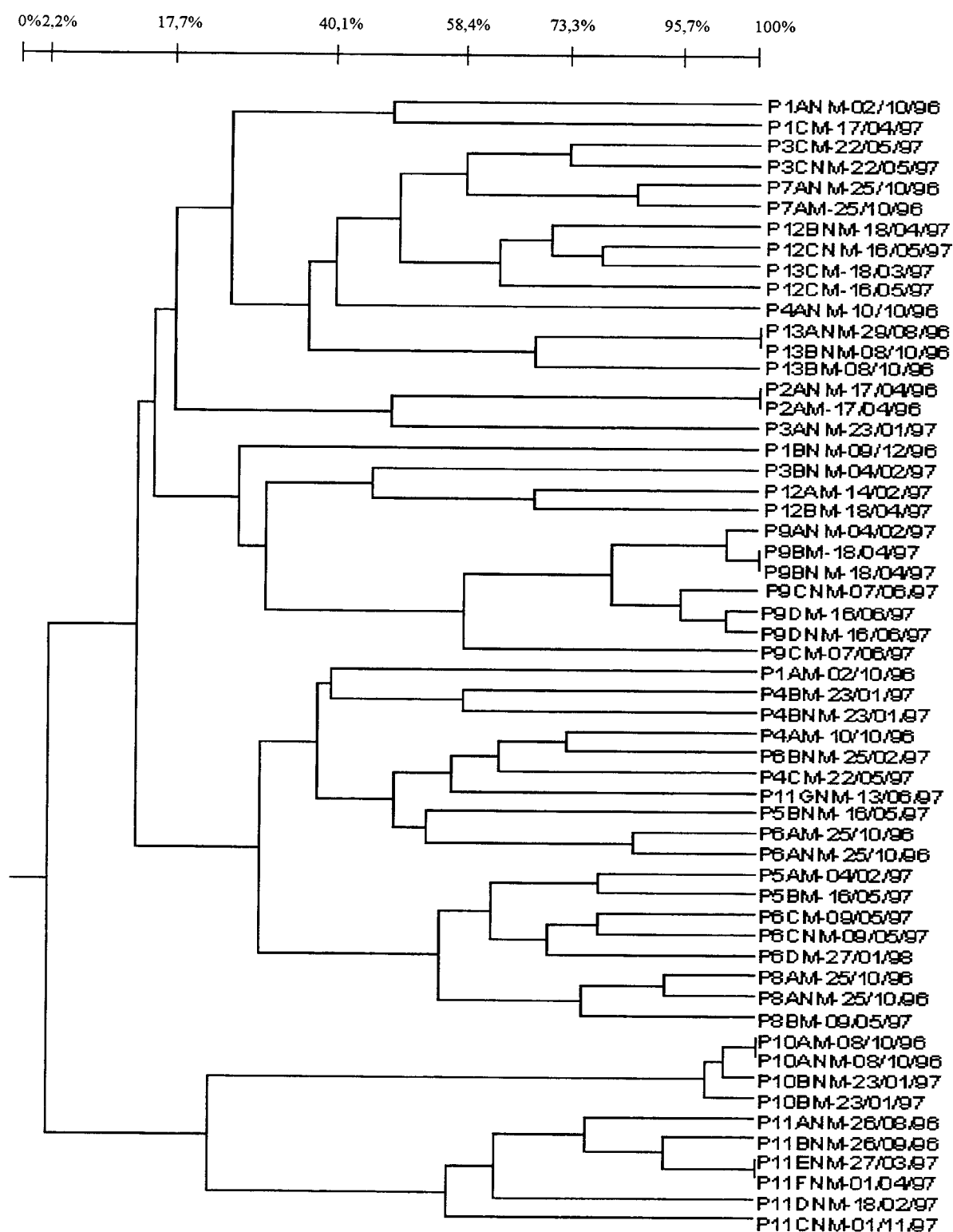


Figura 17a – Dendrograma de Similaridade para os "primers" OPR.

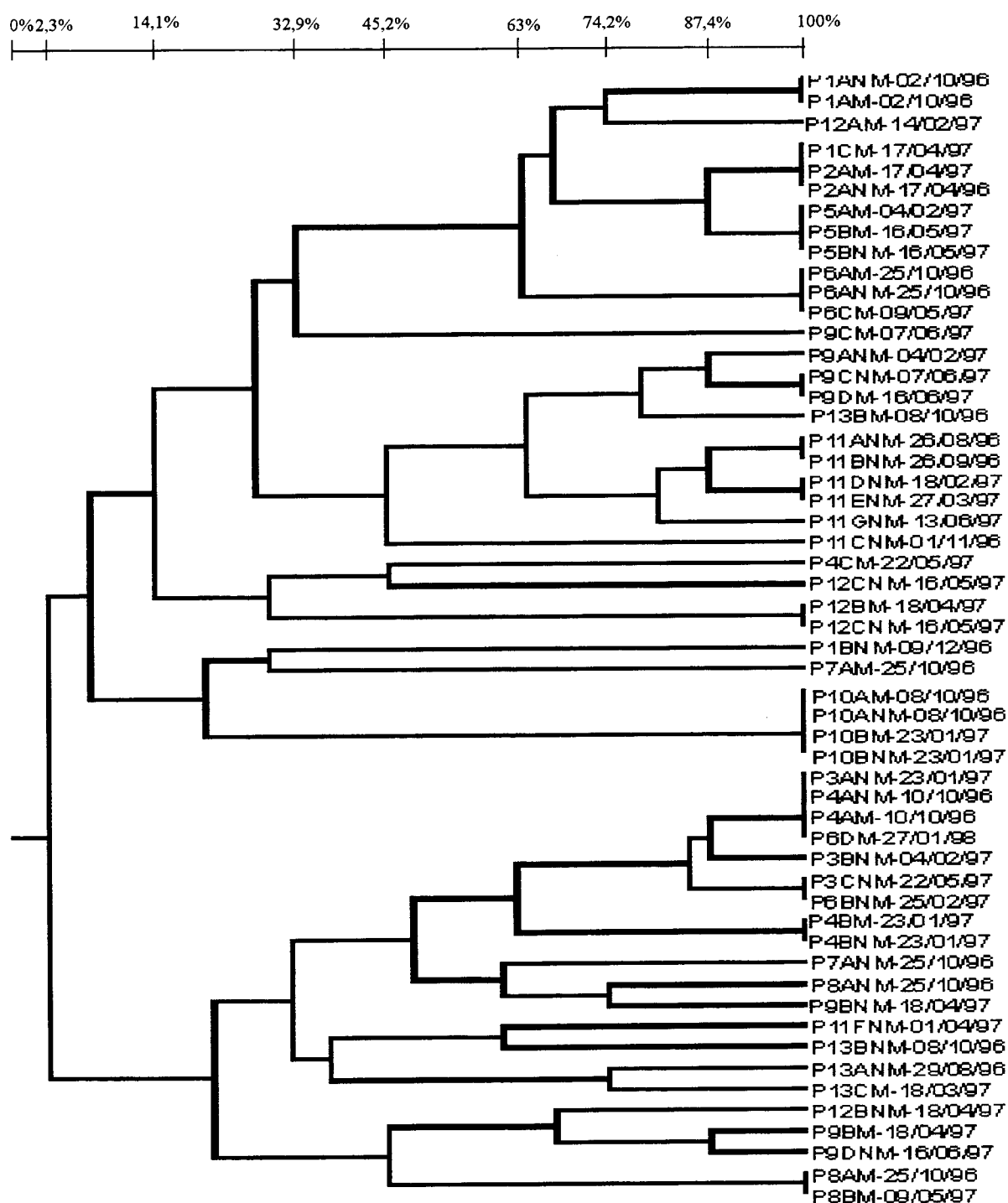
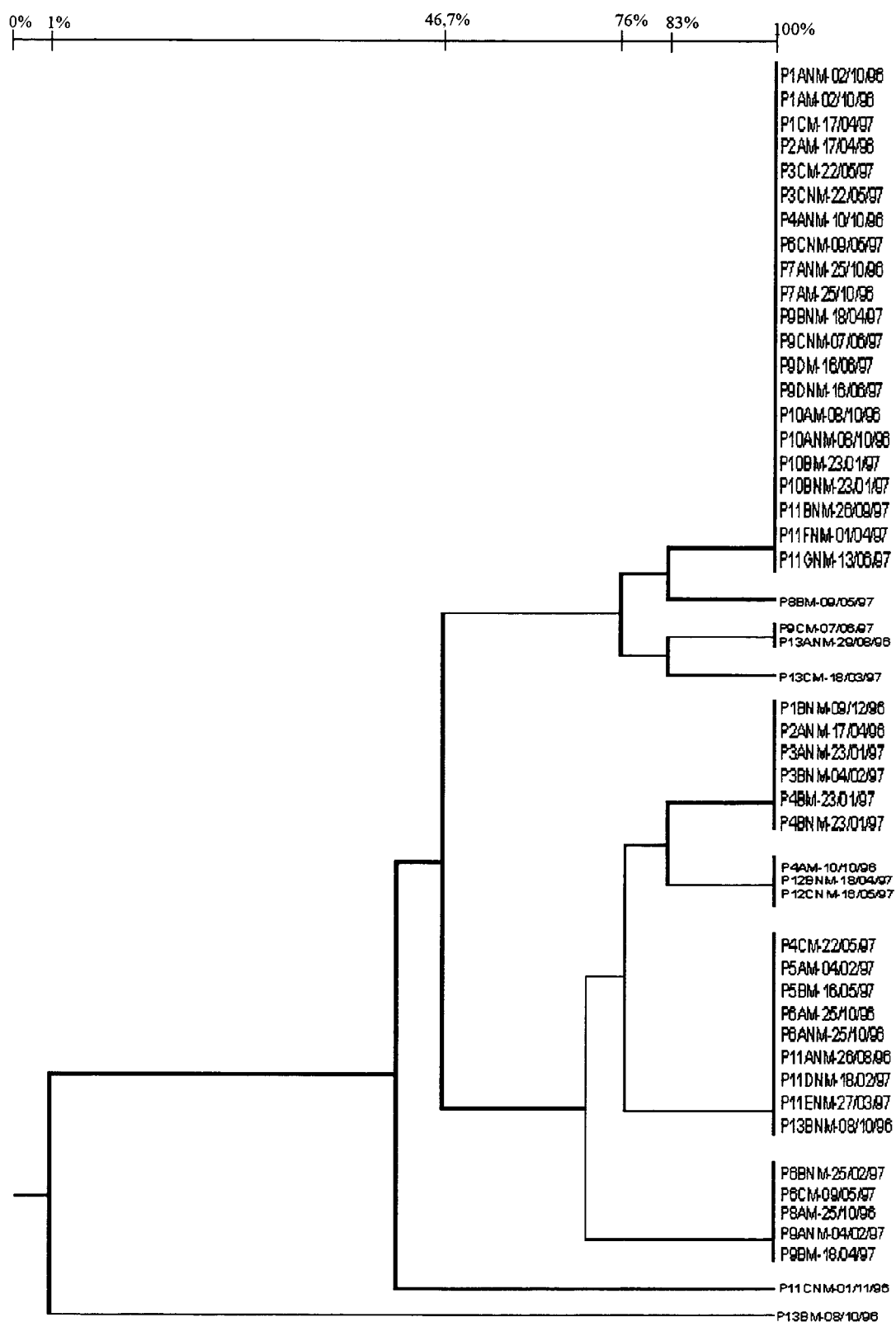


Figura 17b – Dendrograma de Similaridade para a técnica ERIC-PCR.



17c – Dendrograma de Similaridade para a técnica de Ribotipagem.

DISCUSSÃO

Pseudomonas aeruginosa é o patógeno mais frequente, encontrado em pacientes mucoviscidóticos e diferenças morfológicas desse microrganismo como: ausência de flagelo, auxotrófias, deficiência em LPS, resistência a antibióticos e na produção da cápsula podemos encontrar cepas mucóides que são comumente encontradas em amostras de escarro isoladas desses pacientes (Mereghetti *et al.*, 1998, Olivier *et al.*, 2000). Cepas mucóides de *P. aeruginosa* são importantes patógenos bacterianos pulmonares, responsáveis pelas altas taxas da mortalidade e morbidade em pacientes com Fibrose Cística e servem para o estabelecimento da infecção no hospedeiro (Hoiby, 1977, Olivier *et al.*, 2000). A observação que pacientes mucoviscidóticos estejam inicialmente colonizados por uma única cepa não mucóide de *P. aeruginosa* que converte para a variante mucóide *in vivo* não é mais aceita diante das evidências. Agora sabemos que muitos pacientes são colonizados por ambas cepas, mucóides e não mucóides, e que, em muitos casos, é bem possível demonstrar a existência de várias cepas mucóides e não mucóides no trato respiratório de um único paciente (Pugashetti *et al.*, 1982).

Dos 13 pacientes analisados no presente trabalho e no período compreendido pro este estudo, apenas o paciente P11 apresentou somente cepas não mucóides. Todos os outros pacientes apresentaram cepas mucóides e não mucóides para o mesmo período.

A infecção por *P. aeruginosa* é um processo multifatorial que envolve fatores bacterianos e do hospedeiro. A interação entre eles contribui para o largo espectro de doenças causadas por este microrganismo, podendo ainda se observar infecção aguda em vítimas de queimadura, em pacientes neutropênicos com infecção crônica e no pulmão de pacientes com Fibrose Cística.

P. aeruginosa elabora um grande número de exoenzimas, incluindo enzimas proteolíticas (elastase e protease alcalina) e hemolisina, além de fatores de colonização e cápsula de alginato, os quais, são determinantes nas infecções causadas por este microrganismo.

A produção de hemolisina aparece como importante determinante de virulência entre as cepas de *P. aeruginosa*, nas quais propicia o aumento da capacidade para provocar lesão e colonização do tecido pulmonar (Liu, 1979 e Southern *et al.*, 1970).

Berka e colaboradores (1981), realizaram um estudo comparativo entre linhagens de *P. aeruginosa* de diferentes origens (10 cepas isoladas de pacientes com Fibrose Cística, onde 5 amostras possuíam o morfotipo mucóides e 5 não mucóides e 18 cepas de outros casos clínicos), quanto a produção de hemolisina. Esses autores verificaram que dos isolados 80% mucóides e 20% não mucóides foram responsáveis pela produção dessa enzima. Posteriormente, Matján e colaboradores (1991), relataram que entre 218 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes quadros clínicos, 57% delas apresentaram atividade hemolítica.

Em nossos estudos, observa-se que dentre as 56 cepas estudadas, 30 (53,6%) foram positivas para a produção de Hemolisina. Entre as 25 cepas mucóides isoladas de FC, 14 (56 %) foram positivas para essa característica, enquanto que das 31 cepas não mucóides, 16 (51,6%) foram positivas (Figuras 1, 2). Assim, os resultados aqui apresentados diferem dos relatados por Berka e colaboradores (1981), contudo observa-se semelhança com aqueles obtidos por Majtán e colaboradores (1991) para a produção de hemolisina.

Assim, conclui-se que o estudo da produção de hemolisina como fator de virulência em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com Fibrose Cística deve ser conduzido com cautela, visto que um grande número de cepas Mucóides e Não Mucóides podem expressar este fenótipo.

Algumas bactérias são capazes de produzir a enzima gelatinase, a qual hidrolisa proteínas em aminoácidos. Esses aminoácidos podem ser transportados para o interior da célula bacteriana favorecendo o seu metabolismo. A hidrólise da gelatina tem sido associada à patogenicidade em alguns microrganismos, acreditando-se que bactérias patogênicas podem quebrar os arranjos celulares, destruindo os tecidos e espalhando-se por tecidos adjacentes.

Sheehan e colaboradores (1982), descreveram que dentre 25 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes quadros clínicos, 48% delas apresentavam a característica de liquefazer a gelatina e, mais recentemente, Majtán e colaboradores (1991), relataram dentre as 218 cepas de diferentes origens clínicas estudadas, 95,2% eram gelatinase positiva. Dentre as 56 cepas por nós estudadas 37,5% apresentaram a capacidade de liquefazer a gelatina. Dentre as cepas de *P. aeruginosa* de morfotipo mucóide 36% foram positivas enquanto que as de morfotipo não mucóide 38,7% mostraram-se positivas (Figura 1 e 2). Logo, nossos resultados são mais próximos daqueles encontrados por Sheehan e colaboradores (1982) que dos resultados encontrados por Majtán e colaboradores (1991).

Estes resultados já eram esperados, já que a capacidade para degradar proteínas é fundamental na fase de colonização e adaptação do microrganismo no tecido do hospedeiro, por isso as cepas não mucóides apresentaram uma porcentagem maior.

A elastina é um dos principais componentes do pulmão, daí a importância de estudar-se a capacidade de expressão das cepas bacterianas para a exoenzima elastase. Sheehan e colaboradores (1982), observaram que, dentre as 25 cepas isoladas de espécimes clínicos 28% foram positivas para essa enzima. Já Majtán *et al.*, (1991), relataram que dentre as 218 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes quadros clínicos, somente 17,1% apresentaram atividade elastolítica.

Em nossos resultados, verificamos que dentre as 56 cepas analisadas 50% mostraram-se positivas para esse fator. Nossos resultados também demonstraram que, 61,29% das cepas de *P. aeruginosa* com morfotipo não mucóide expressaram esse fator enquanto que apenas 36% das cepas com morfotipo mucóide foram positivas para essa característica.

Como a elastina é encontrada no tecido alveolar e endotélio, as cepas que estão em contato direto com o sangue e tecidos adjacentes devem ser capazes de expressar essa enzima afim de facilitar a adesão, penetração e colonização desses tecidos. Através dos nossos resultados, podemos inferir que as cepas não mucóides devem expressar maior atividade elastolítica que as cepas mucóide, o que permitirá a sua instalação e posterior adaptação as condições ambientais do trato respiratório inferior do paciente com Fibrose Cística.

Uma vez que a *P. aeruginosa* estabeleceu-se no pulmão dos pacientes mucoviscidóticos é muito difícil erradicá-la pelo processo de quimioterapia antimicrobiana (Govan & Nelson, 1992) e, segundo Römling *et al.*, (1994), a resistência a diversos antibióticos é desenvolvida durante o tratamento, e que em uma única amostra de escarro de pacientes portadores de mucoviscidose multiplas colônias com diferenças de resistência antimicrobiana podem ser isoladas (Mereguetti *et al.*, 1998).

Strulens e colaboradores (1993), estudando cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes mucoviscidóticos encontraram uma diversidade na resistência a antibióticos. As cepas mostraram-se resistentes para até os 14 tipos de antibióticos analisados (Piperacilina, Ceftriaxona, Aztreonam, Imipenem, Ciprofloxacina, Canamicina, Neomicina, Estreptomicina, Gentamicina, Tobramicina, Netilmicina, Amicacina, Sisomicina, e Espectomicina).

Em nossa pesquisa, verificou-se uma alta variedade de resistência a antibióticos entre as cepas analisadas, podendo-se observar cepas resistentes de 1 até 9 antibióticos diferentes de 11

antibióticos analisados e ainda, que a maioria das cepas foram resistentes a 5 ou mais antibióticos (Tabela VII).

Lari e colaboradores (1998), realizaram um estudo onde 2488 amostras de *P. aeruginosa* foram coletadas entre 20 de março de 1995 e 20 de março de 1997. A resistência dessas cepas a Carbenicilina, Cotrimoxazol e Tetraciclina foi superior a 95% durante o período estudado. Em 1995, a resistência à Gentamicina era de 89%, passando para 98% em 1997. Também a resistência de Amicacina foi de 49% em 1995 e 90% em 1997. A porcentagem de cepas de *P. aeruginosa* resistente a Ciprofloxacina foi de 45% em 1995 e 82% em 1997.

Os nossos resultados para os testes de avaliação de resistência para os antibióticos Cotrimoxazol encontrou-se 90% de resistência em 1996 e 82,9% para o ano seguinte. Verificou-se também aumento na porcentagem de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos Ceftriaxone, Cefotaxima e Ofloxacina os quais passaram de 40 para 54,3%, de 50 para 80% e de 10 para 22,9%, respectivamente, nos isolados dos anos de 1996 para 1997. De acordo com o Prof. Dr. Ulysses M. de Oliveira, as drogas: Amicacina, Cefalotina, Oxacilina, Cefotaxima e Ciprofloxacina foram administradas aos pacientes quando internados na Enfermaria, o que sugere que o uso de tais medicamentos selecionaram cepas resistentes a algumas drogas.

Walton *et al.*, (1997), estudando *P. aeruginosa* isoladas de pacientes que haviam sofrido queimaduras, observaram que 79% das cepas isoladas mostraram-se resistentes aos aminoglicosídeos e que 58% foram multiresistentes para os aminoglicosídeos de primeira e segunda gerações, imipenema e cefalosporinas. Em nossa pesquisa verificamos que 80% das cepas apresentaram multiresistência aos antimicrobianos Ampicilina, Cloranfenicol e Cotrimoxazol (Figura 3 e Tabela VII).

Mereguetti e colaboradores (1998), estudando 250 isolados de 6 pacientes, obtiveram 8 diferentes antibiótipos. Analisando especificamente as cepas isoladas de um mesmo paciente, observamos que do paciente P9 foram estudadas 7 cepas e dentre estas 6 antibiótipos podem ser observados; entre as 6 cepas do paciente P6 foram encontrados 5 antibiótipos e entre as 6 cepas do paciente P11 encontrou-se 6 antibiótipos (Tabela VII). As variações por nós observadas podem ser devido ao maior número de pacientes e ao menor número cepas estudadas ou ainda, por que essas cepas foram obtidas num período de 17 meses

Uma grande diversidade de padrões de resistência a antibióticos foi encontrada nas cepas isoladas de pacientes com Fibrose Cística, variando de 1 a 9 marcas de resistência. Strulens e colaboradores (1993) citam que muitos pacientes mucoviscidóticos têm contato social regular com outros pacientes portadores da enfermidade e com outras pessoas tanto no ambiente hospitalar como no ambiente familiar e escolar. De acordo com o Prof. Dr. Ulysses M. Oliveira, o Departamento de Pediatria do HC da Unicamp estabeleceu uma rotina de atendimento preventivo para o grupo de pacientes com Fibrose Cística, rotina essa que inclui consultas mensais, fisioterapia e coleta de escarro para fins de isolamento. Eventualmente outras consultas são realizadas quando o paciente apresentava um agravamento na infecção pulmonar. Acredita-se que esta rotina possibilite que diferentes pacientes fossem contaminados com as mesmas cepas de *P. aeruginosa* e que o tratamento desenvolvido com cada um desses pacientes somado às características individuais de cada um serviu de diferencial na seleção das cepas predominantes.

Convencionalmente métodos como sorotipagem, tipagem de piocianina, e fagotipagem são ineficientes na caracterização de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes mucoviscidóticos em razão da variabilidade fenotípica e da convergência adaptativa (Ojeniyi & Hoiby, 1991; Pitt, 1988). A análise do perfil plasmidial é também de uso limitado neste grupo de

cepas, uma vez que menos de 20% das *P. aeruginosa* apresentam plasmídeos (Pitt, 1988; Struelens *et al.*, 1993)

Métodos de tipagem molecular são importantes para a análise das rotas de transmissão e, pelo monitoramento da variabilidade genética, distâncias filogenéticas podem ser calculadas mostrando-nos as interrelações entre essas cepas bacterianas. Recentes estudos têm examinado a diversidade genotípica e a evolução das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes mucoviscidóticos por métodos genotípicos, incluindo RFLP, RAPD, Ribotipagem e ERIC-PCR (Renders, *et al.*, 1996). Segundo Liu *et al.*, (1996), a técnica de ERIC-PCR tem sido utilizada para obtenção de fingerprints de DNA, onde pode-se notar as diferenças e semelhanças entre duas cepas. RAPD tem recebido considerável atenção como um método de tipagem molecular graças à sua simplicidade, sensibilidade, flexibilidade e baixo custo (Pacheco *et al.*, 1997).

Mereghetti e colaboradores (1998), estudando 6 pacientes colonizados por *P. aeruginosa* obtiveram 8 tipos diferentes de RAPD em 250 cepas isoladas, sendo que 52% eram mucóide e 28% eram não mucóides, e 20% foram consideradas como “crenallates”. Essas cepas foram isoladas juntas ou separadas. Relataram ainda que não ocorreu correlação entre perfil de resistência a antibióticos, morfologia das colônias e RAPD.

Renders *et al.*, (1996) trabalhando com 87 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com Fibrose Cística demonstraram que o tamanho de fragmentos gerados pela técnica de RAPD eram claramente dependentes dos "primers" utilizados. Com o "primer" ERIC-2 foram gerados de 8 a 15 fragmentos, com pesos moleculares variando de 100 a 2500pb e para o "primer" RAPD1 17 fragmentos foram gerados, com o "primer" 325, 16 fragmentos foram gerados.

Assim como Renders e colaboradores (1996), em nosso trabalho, obteve-se diferentes fragmentos genotípicos no RAPD e esses fragmentos variaram de acordo com o "primer" utilizado. Os "primers" de RAPD que mais se destacaram foram os "primers" OPR2, OPR8 (ambos com 70% GC na sua sequência) os quais geraram 20 e 22 fragmentos, respectivamente, distribuídos em 32 e 36 agrupamentos genotípicos (Tabelas X e XI).

Na técnica de ERIC-PCR foram obtidos 19 fragmentos distribuídos em 34 diferentes genotipos (Tabela XII). Através desses resultados pode-se inferir que esses três "primers" são os mais discriminativos para esse grupo de cepas (Figuras 15a e 15b).

Nossos resultados para a técnica de RAPD também mostraram que de 56 cepas isoladas, foram formados 51 perfis genotípicos, levando-se em consideração o dendograma montado pelo programa POPGENE (Figuras 15a e 15b), sendo que as linhagens P2AM e P2ANM e P10BM e P10BNM mostraram-se idênticas para os "primers" OPR e ERIC, apesar de diferirem fenotipicamente visto que a cepa P2AM mostrou-se hemolisina positiva e elastase negativa enquanto que a cepa P2ANM mostrou resultados contrários. A cepa P10BM foi sensível para o antibiótico Gentamicina, negativa para hemolisina e positiva para elastase, enquanto que a cepa P10BNM foi resistente para Gentamicina, positiva para hemolisina e negativa para elastase.

As cepas P13ANM e P13BNM, P6ANM e P6AM, P11BNM e P11ENM, menores de 0,14% de Dissimilaridade, foram consideradas semelhantes. Os pacientes P7, P8, P9, P10 e P13, apresentaram todas as suas cepas dentro de um "cluster". Os pacientes P6 e P8, que são irmãos, apresentaram cepas dentro de um mesmo "cluster" com um grau de similaridade próximo de 46%.

Para explorar a estrutura genética e epidemiológica de populações de *P. aeruginosa* dentro e entre pacientes mucoviscidóticos, Olivier *et al.*, (2000) executaram o teste de RAPD de

128 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de 30 pacientes. Os resultados obtidos por esses autores mostraram que, vinte cinco pacientes com FC apresentaram cepas idênticas quanto a técnica de RAPD distintos, três pacientes mucoviscidóticos apresentaram cepas com dois perfis de RAPD e outros dois pacientes apresentaram 3 tipos. Não foi encontrada evidências de transmissão entre os pacientes.

O dendograma apresentado na Figura 15a apresenta os resultados globais dos “primers” OPR, e nele pode-se observar que não houve colonização cruzada pelas cepas de *P. aeruginosa* entre os pacientes.

Por outro lado, no dendograma obtido pelo ERIC-PCR pode-se constatar que os pacientes P1 e P2, cepas P1CM, P2AM e P2ANM; P3, P4 e P6, cepas P3ANM, P4ANM, P4AM e P6DM; P3 e P6, cepas P3CNM e P6BNM apresentaram 100% de similaridade.

Como Mereghetti et al., (1998) também verifica-se que não existe nenhuma correlação entre perfil de resistência a antibióticos, morfologia das colônias e RAPD já que provavelmente esses “primers” amplificaram regiões cromossômicas diferentes de onde essas marcas fenotípicas não são expressas, por isso não conseguiu-se encontrar nenhuma correlação.

Investigações da epidemiologia nosocomial de *P. aeruginosa* têm sido dificultadas pela inadequada capacidade discriminatória dos métodos fenotípicos convencionais. Técnicas modernas baseadas na ribotipagem tem sido utilizadas (Liu et al., 1996, Ojeniyi et al., 1991).

A ribotipagem baseia-se na visualização de segmentos de genes ribossomais altamente conservados entre as mais diferentes espécies bacterianas, além disso é discriminatória e pode ser aplicada a uma grande variedade de espécies bacterianas. Diferenças entre as cepas são detectadas por diferenças entre as bandas analisadas e pela presença ou ausência de sítios de

restrição entre as cepas. Os espaços intergênicos entre os ribossomos (rDNAs) são tidos como as regiões mais conservadas entre as cepas bacterianas (Bennekov *et al.*, 1996).

O ribossomo bacteriano 70S é composto por quantidades equimolares de 3 tipos de rRNA (23S, 16S e 5S). Os genes de rRNA são organizados em operons (rDNA) e, em muitas espécies bacterianas estão presentes em inúmeras cópias (Bingen *et al.*, 1994). *P. aeruginosa*, em particular, contém quatro unidades transcricionais por cromossomo. Enquanto que os genes de rRNA são altamente conservados, suas regiões flanqueadoras não são (Hartmann *et al.*, 1986; Römling *et al.*, 1989). Análises do polimorfismo de DNA em regiões cromossômicas contendo genes de RNAr são referidas como Ribotipagem. Ribotipagem tem sido utilizada por muitos laboratórios para a análise epidemiológica, já que possui um alto poder discriminativo e pode ser aplicada a muitas espécies bacterianas, não requerendo equipamentos sofisticados (Nociari *et al.*, 1996). A ribotipagem de *P. aeruginosa* tem sido apresentada por muitos autores utilizando diferentes combinações de enzimas, sondas e quantidades de DNA genômico (Bingen *et al.*, 1994).

Nossos resultados demonstraram que a região intergênica entre a região 16S e 23S e a região RNAr 16S são altamente conservadas, visto que em nossos experimentos não pudemos observar diferenças genóticas para as enzimas de restrição utilizadas (Figuras 12a, 12b, 13a e 13b).

Nociari *et al.*, (1996) estudaram 51 cepas de *P. aeruginosa* pela digestão de seus DNAs genômicos com as enzimas *PvuII*, *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *ClaI*, *CfoI*, *NspV* e posterior hibridização com a sonda de cDNA de *E. coli* carregando RNAr 16S-23S. A combinação das enzimas *EcoRI-BamHI-PstI-ClaI* distinguiu 17 genótipos. A combinação de *PvuII-BamHI* ou

PvuII-EcoRI discriminou 19 genótipos. A combinação de *PvuII-HindIII* também distinguiu 19 genótipos. A digestão somente com *PvuII* gerou 18 genótipos.

Os nossos resultados da digestão do DNA cromossômico pela enzima *PvuII* hibridizado com a sonda de rDNA 16S apresentou a formação de 10 ribótipos. Nestes, 41 cepas foram agrupadas em 4 “clusters” sendo que o maior agrupou 21 das 50 cepas (Figura 17c). Neste experimento, observamos um número de “clusters” inferior ao observado por Nociari *et al.*, (1996).

Os dados aqui apresentados suportam as conclusões apresentadas por Römmling *et al.*, (1994), de que os genótipos discordantes em *P. aeruginosa* desenvolvem um fenótipo comum durante a infecção na Fibrose Cística. E ainda, concordou-se com Mahenthiralingan *et al.*, 1996 quando conclui que a persistência de *P. aeruginosa* na fase crônica da Fibrose Cística envolve diferentes alterações fenotípicas que favorecem a capacidade de sobreviver no trato respiratório inferior (Pedersen *et al.*, 1986, Speert *et al.*, 1982).

Descrições anteriores sobre a infecção cruzada na população de pacientes com FC foram baseados em marcadores fenotípicos tais como sorotipo O e padrões de resistência a antibióticos pouco adequados para esta análise (Kelly *et al.*, 1982, Pedersen *et al.*, 1986, Speert *et al.*, 1982).

Evidência descrita da infecção cruzada esta limitada ao trabalho de Wolts *et al.*, 1989. Outros relatos baseados em marcadores genéticos mostraram que pacientes de FC epidemiologicamente relacionados podem ser colonizados pela mesma cepa (Fegan *et al.*, 1991, Grouthues *et al.*, 1988; Oyeniyi & Hoiby, 1991; Strulens *et al.*, 1993; Tümmler *et al.*, 1991)

Os nossos resultados não nos permitem concluir se houve infecção cruzada entretanto, investigações futuras são necessárias para melhor definir a extensão, a via, e o significado da transmissão de *P. aeruginosa* entre pacientes de FC e para auxiliar no tratamento dos mesmos.

CONCLUSÕES

A análise comparativa entre as diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, através dos métodos tradicionais e moleculares nos permite concluir que:

As cepas de morfotipo não mucóide isoladas de pacientes com fibrose cística expressam em maior frequência, as enzimas elastase e gelatinase, do que as cepas mucóides, enquanto que as mucóides expressaram em maior frequência hemolisina.

As famílias de antibióticos mais efetivos contra o grupo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudado mostraram ser da família das Carbapenemas, Aminoglicosídeos e Quinolonas de 3º Geração, enquanto que os menos efetivos foram das famílias de Penicilinas, Cefalosporinas de 3º Geração, Cloranfenicol, Sulfonamidas.

Encontramos uma única cepa resistente ao antibiótico Imipenema enquanto todas as demais mostraram-se sensíveis. Todas as cepas não mucóides mostraram-se sensíveis ao antibiótico Ciprofloxacina.

Entre os anos de 1996 e 1997, houve um aumento da resistência para os antibióticos Ceftriaxone, Cefotaxima, Ofloxacina.

Entre os testes utilizados para a análise genotípica, o mais discriminatório mostrou ser o teste de RAPD já que produziu o maior número de genótipos: OPR – 51 genótipos.

E entre os "primers" utilizados para esse teste os mais discriminatórios foram os "primers" OPR2 e OPR8.

Os ensaios de determinação do polimorfismo da região intergênica 16s-23s aqui utilizados não apresentaram resultados discriminatórios.

Nossos resultados nos testes de ribotipagem utilizando a enzima *PvuII* para a digestão do DNA cromossômico e hibridização com a sonda 16S resultaram na identificação de 10 ribotipos. O ribotipo 1 agrupou 21 cepas isoladas de 9 pacientes.

Pudemos concluir que existe uma grande diversidade fenotípica e genotípica entre as cepas de *P. aeruginosa* isolada de pacientes portadores de Fibrose Cística.

Este trabalho sugere que futuras investigações poderão ser realizadas utilizando maior número de cepas isoladas em um número menor de pacientes num período maior, levando-se em consideração, data de internação desses pacientes, data de fisioterapia e antibioticoterapia empregada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, D.H. (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathological study. *Am. J. Dis. Child*, **56**: 344-356.
- Anderson, D.H.; Hodges, R.G. (1945). Celiac Syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am. J. Dis. Child*, **72**: 62-70.
- Anwar, H.; Strap, J.L.; Costerton, J.W. (1992). Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob. Ag. Chemo.*, **36**: 1347-1351.
- Arbeit, R.A. (1995). Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: *Manual of Clinical Microbiology 6th ed.*, Ed. P.R. Murray, E.J. Byron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover. Washington, D.C.: A. S. M., pp 190-208.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D; Smith, J.A.; Seidman, J.G.; Strul, K. (1987) Eds: Current protocol ins molecular biology. **Wiley Interscience, N.Y.**
- Bandjee, M.C.J.; Lasdunski, A.; Bally, M.; Carrère, J.; Chazalotte, J.P.; Galabert, C. (1995). Production of elastase, exotoxina A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 924-929
- Bennekov, T.; Colding, H.; Ojeniyi, B.; Bentzon, M.W.; Høiby, N. (1996). Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.*, **34**: 202-204.
- Berka, R.M.; Gray, G.L.; Vasil, S. (1981). Studies of phospholipase C (Heat-Labile Hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **34**:1071-1074.

- Bijman, J.; Quinton, P. (1987). Permeability properties of cell membranes and tight junctions of normal and cystic fibrosis sweat ducts. *Pflügers Archiv.*, **408**: 505-510.
- Bingen, E.; Denamur, E.; Elion, J. (1994). Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin. Microbiol. Rev.*, **7**: 311-327.
- Boat, T. F.; Welsh, M. J.; Beaudet, A. L. (1989). The metabolic basis of inherited disease. New York. *McGraw-Hill*, **6**: 2649-2680.
- Collins, F.S. (1992). Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, **256**: 774-779.
- Collins, F.S.; Riordan, J.R.; Tsui, L.S. (1990). The cystic fibrosis gene: isolation and significance. *Hosp. Pract.*, **25**: 47-57.
- Deretic, V.; Schurr, M.J.; Boucher, J.C.; Martin, D.W. (1994). Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.*, **176**: 2773-2780.
- Deretic, V.; Schurr, M.J.; Yu, H. (1995). *Pseudomonas aeruginosa*, mucoid and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trend. Micr.*, **3 (9)**: 351-356.
- Di Sant'Agnes, P.A.; Darling, R.C.; Perera, G.A.; Shea, E. (1953). Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. *Pediatrics*, **12**: 549-555.
- Elaichouni, A.; Verschraegen, G.; Clayes, G.; Devleeschouwer, M.; Godard, C.; Vannechoutte, M. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 666-671.
- Evans, L.R.; Linker, A. (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **170**: 1054-1062.

- Farber, S. (1945). Some organic digestive disturbances in early life. *J. Michigan Med. Soc*, **44**: 587-596.
- Fauci, A.S.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; Wilson, J.D.; Martin, J.B.; Kasper, D.L.; Hauser, S. L.; Longo, S.L. (1998). Harrison Medicina Interna. *McGraw-Hill*, **14**: 1545-1548.
- Fegan, M.; Francis, P.; Hayward A.C.; Fuerst, J.A. (1991) Heterogeneity, persistence, and distribution of *Pseudomonas aeruginosa* ggenotypes in cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol*, **29**: 2151-2157
- FitzSimmons, S.C. (1993). The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J. Pediatr.*, **122**: 1-9
- Gibson, L.E., Cooke, RE. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, **23**: 545-553.
- Govan, J.R.W.; Nelson, J.W. (1992). Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. (1992). *Br. Med. Bullet.*, **48**: 912-930.
- Govan, J.R.W; Deretic, V. (1996). Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Review.*, **60**: 539-574.
- Gray, G.L.; Vasil, M.L. (1981). Mapping of a gene controlling the production of phospholipase C and alkaline phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Gent.*, **183**: 403-405.
- Grimont, F.; Grimont, P.A.D. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, **137**: 165-175.
- Grothues, D.; Koopmann, U.; Von Der Hardt, H.; Tümmler, B. (1988). Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 1973-1977.

- Grundmann, H.; Scheneider, C.; Hartung, D.; Daschner, F.D.; Pitt, T.L. (1995). Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 528-534.
- Hartmann, R.K.; Tochka, H.Y.; Ulbrich, N.; Erdmann, V.A. (1986). Genomic organization of DNA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.*, **195**: 187-193.
- Hla, S.W.; Hui, K.P.; Tan, C.W.; Ho, B. (1996). Genome macrorestriction analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bronchiectasis patients without cystic fibrosis.
- Hoiby, N. (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection in Cystic Fibrosis. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C*, **262**: 1-96.
- Johansen, h.K.; Espersen, F.; Cryz, S.J.; Hougen, H.P.; Fomsgaard, A.; Rygaard, J.; Hoiby, N. (1994). Immunization with *Pseudomonas aeruginosa* vaccines and adjuvant can modulate the type of inflammatory response subsequent to infection. *Infect. Immun.*, **62**: 3146-3155.
- Karlin, S.; Ladunga, I.; Blaisdell, B.E. (1994). Heterogeneity of genomes: measures and values. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **91**: 12837-12841.
- Kelly, N.M.; Fitzgerald, M.X.; Tempny, E.; O'Boyle, C.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. (1982). Does *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 115-123.
- Kerr, J.R.; Moore, J.E.; Curran, M.D. (1995). Investigation of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in an intensive care unit by random amplification of polymorphic DNA assay. *J. Hosp. Infect.*, **30**: 125-131.
- Kersulyte, D.; Strulens, M.J.; Deplano, A.; Berg, D.E. (1995). Comparison of Arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 2216-2219.

- Koch, C.; Hoiby, N. (1993). Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*, **341**: 1065-1069.
- Kostman, J.R.; Edlind, T.D.; Lipuma, J.J.; Stull, T.L. (1992). Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J. clin. Microbiol.*, **30**: 2084-2087.
- Kovacs, K.; Paterson, D.L.; Yu, Victor, L. (1998). Antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* therapeutic issues; resistance; pneumonia; endocarditis; and infections of the GI tract, bone and joint, and urinary tract. *Infect. Med*, **15(6)**: 385-394.
- Krawiec, S.; Riley, M. (1990). Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.*, **54**: 502-539.
- Kurioka, S.; Liu, P.V. (1967). Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and phospholipase C activity. *J. Bacteriol.*, **93**: 670-674.
- Lari, A.R.; Honar, B.H.; Alaghebandan, R. (1998). *Pseudomonas* infections in Tohid Burn Center, Iran. *Burns*, **24**: 637-641.
- Learn, D.B.; Brestel, E.P.; Seetharama, S. (1987). Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Infect. Immun.*, **55**: 1813-1818.
- Liu, P.V. (1979). Toxins of *Pseudomonas aeruginosa* p. 63-68. In R.G. Doggett (ed) *Pseudomonas aeruginosa*. *Academic Press, Inc. New York*.
- Liu, Y.; Davin-Regli A.; Bosi, C.; Charrel, R.N.; Bollet, C. (1996). Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial bacteraemia isolates by PCR-based DNA fingerprinting analysis. *J. Med. Microbiol.*, **45**: 359-365.
- Lory, S; Tai, T.C. (1985). Biochemical and genetic aspects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Curr. Top. Micro. Immun.*, **118**: 53-69.

- Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T.; De Bruijn, F.J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2286-2295.
- Mai, G.T.; Seow, W.K. Pier, G.B. McCormack, J.G.; Thong, Y.H. (1993). Suppression of lymphocyte and neutrophil function by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginate, and specific monoclonal antibody treatments. *Infect. Immun.*, **61**: 559-564.
- Majtán, V.; Hostacka, A.; Kosiárová, A.; Majtánová, L.; Kouhútová, S. (1991). On toxinogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Hygiene, Epidemiol., Microbiol. Immunol.*, **35**: 217-224.
- Maróstica, P. J.C.; Raskin, S.; Abreu-e-Silva, F.A. (1998). Analysis of the ΔF 508 mutation in a Brazilian cystic fibrosis population comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz. J. Med. Biol. Reser.*, **31**: 529-532.
- Martin, C.; Ichou, M.A.; Massicot, P.; Goundeaus, A.; Quentim, R. (1995). *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 1461.
- McLaughlin, G.I.; Howe, D.K.; Biggs, D.R.; Smith, A.R.; Ludwinski, P.; Fox, B.C.; Tripathy, D.N.; Frasch, C.E.; Wenger, J.D.; Carey, R.B.; Hassanking, M.; Vodkin, M.H. (1993). Amplification of rDNA loci to detect and type *Neisseria meningitidis* and other eubacteria. *Mol. Cell. Probes*, **7**: 7-17.
- Mereguetti, L.; Marquet-Van der Mee, N.; Loulergue, J.; Rolland, J.C.; Audurier, A. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients: studying using whole cell RAPD and antibiotic susceptibility. *Path. Biol.*, **46**: 319-324.

- Morales, M. M.; Capella, M.A.M.; Lopes, A.G. (1999). Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz. J. Med. Biol. Reser.*, **32**: 1021-1028.
- Morihara, K. (1964). Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **88**: 745-757
- Mull, J.D.; Callahan, W.S. (1963). Estimation of elastolytic activity of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **85**:1178-1179
- Nociari, M.M.; Catalano, M.; Torrero, M.; Sordelli, D.O. (1996). *Pseudomonas aeruginosa* ribotyping: stability and interpretation o ribossomal operons restriction patterns. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **25**: 27-33.
- Ogle, J.W.; Vasil, M.L. (1993). Molecular approaches to epidemiologic typing of *Pseudomonas aeruginosa*, p. 141-158. In R.B. Fick (ed.) *Pseudomonas aeruginosa*, the opportunist: pathogenesis and disease. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Ohman, D.E.; Chakrabarty, A.M. (1981). Genetic mapping of chormossomal determinats for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate. **33**:142-148.
- Ojeniyi, B., Hoiby, N. (1991). Comparision of different typing methods of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot. Chemother.*, **44**: 13-22.
- Ojeniyi, B.; Wolz, C.; Döring, G.; Lam. J.S.; Rosdal, V.T.; Hoiby, N. (1990). Typing of polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *APMIS*, **98**: 423-431.
- Ojeniyi, B.; Hoiby, N.; Rosdahi, V.T. (1991). Genome fingerprint as a typing method used on polyggglutinable *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *APMIS*, **99**: 492-498.

- Olivier, A.; Cantón, R.; Campo, P.; Baquero, F.; Blazquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, **288**: 1251-1253.
- Ørskov, F.; Ørskov, I. (1983). Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of Enterobacteriaceae and other bacteria. *J. Infect. Dis.*, **148**: 346-357.
- Pacheco, A.B.F.; Guth, B.E.C.; Soares, K.C.C.; Nishimura, L.; Almeida, D.F.; Ferreira, A.C.S. (1997). Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 1521-1525.
- Pedersen, S.S.; Koch, C.; Hoiby, N.; Rosendal, K. (1986). An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *J. Antimicrob. Chemother.*, **17**: 505-516.
- Pedersen, S. S. Hoiby, N.; Espersen, G., Koch, C. (1992). Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*, **47**: 6-13
- Pedersen, S.S.; Espersen, F.; Hoiby, N.; Jensen, T. (1990). Immunoglobulin A and immunoglobulin G antibody responses to alginates from *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 747-755
- Pfaller, M.A.; Wendt, C.; Hollis, R.J.; Wenzel, R.P.; Fristchel, S.J.; Neubauer, J.J.; Herwaldt, L.A. (1996). Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **25**: 1-8.

- Picard, B.; Denamur, E.; Barakat, A.; Elion, J.; Gouillet, P. (1994). Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphis of the ribosomal RNA gene region.
- Pier, G. B.; Small, G. J.; Warren, H.B. (1990). Protection against mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in rodent models of endobronchial infections. *Science*, **249**: 537-540.
- Pier, G.B.; Takeda, S.; Grout, M.; Markhan, R.B.(1993). Immune complexes from immunized mice and infected cystic fibrosis patients mediate murine and human T cell killing of hybridomas producing protective opsonic antibody to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Invest.*, **91**: 1079-1087.
- Pitt, T.L. (1988). Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol*, **27**: 2589-2593
- Poh, C.L.; Yeo, C.C. (1993). Recent advances in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp. Infect.*, **24**: 175-181.
- Poole, K.; Krebs, K.; McNally, C.; Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journ. Bacteriol.*, **175**: 7363-7372.
- Prince, A. (1986). Antibiotic resistance in *Pseudomonas* species. *J. Pediatr.*, **108**: 830-843
- Pugashetti, B.K.; Metzger, H.M.J.; Vadas, L.; Feingold, D.S. (1982). Phenotypic differences among a clinically isolated mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain. *J. Clin. Microbiol.*, **16**: 686-691.
- Pujana, I.; Gallego, L.; Canduela, M.J., Cisterna, R. (2000). Specific and rapid identification of multiple-antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones isolated in an intensive care unit. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **36**: 65-68.

- Ramphal, R.; & Pier, G. B. (1985). Role *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **61**: 559-564.
- Ramphal, R.; Guay, C.; Pier, G.B. (1987). *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **55**: 600-603.
- Renders, N.; Römling, U.; Verbruch, H.; Van Belkum, A. (1996). Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa*, by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J. Clin. Microbiol.*, **34** (12): 3190-3195.
- Römling, U.; Fiedler, B.; Boßhammer, J.; Grothues, D.; Greipel, J.; Von der Hardt, H.; Tümmler, B. (1994). Epidemiology of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.*, **170**: 1616-1621.
- Römling, U.; Grothues, D. Bautsch, W.; Tümmler, B. (1989). A physical genome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *EMBO J.*, **8**: 4081-4089.
- Roychoudhury, S.; Zielinski, N.A.; De Vault, J.D.; Kato, J.; Shinabarger, D.L.; May, T.B.; Maharaj, R.; Kimbara, K.; Misra, t.K.; Chakrabarty, A.M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: biosynthesis of alginate as a virulence factor. *Antibiot. Chemothe.*, **44**: 63-67.
- Rust, L.; Pesci, C.; Iglewski, B.H. (1996). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* elastase (las B) regulatory region. *J. Bacteriol.*, **178**: 1134-1140.
- Sader, H.S.; Pfaller, M.A.; Hollis, R.J. (1995). The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious disease. *Clin. Lab. Med.*, **15**: 407-431.
- Saiman, L. (1993). Treatment of infections in patients with cystic fibrosis. (1993). *Infect. Med.*, **10**(7): 37-43
- Salysers, A. A.; Whitt, D.D. (1994). Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. 269-270.

- Sambroock, J.; Fritschi, E.F.; Maniats, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2ed. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sauders, W.B.; Burrows, W; Moulder, J.W.; Murdoch, R. (1963). Textbook of Microbiology. 659-660.
- Sbarra, A.J.; Gilligan, R.F.; Bardawill, W.A. (1960). A plate assay for elastase. *Nature*, **188**: 322-323
- Schlictman, D.; Kavanaugh-Black, A.; Shankar, S., Chakrabarty, A.M. (1994). Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: functional analysis in a heterologous host and in the tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.*, **176**: 3375-3382.
- Sheehan, D.J.; Janda, J.M.; Bottone, E.J. (1982). *Pseudomonas aeruginosa*: Changes in antibiotic susceptibility, enzymatic, and antigenicity among colonial morphotypes. 15: 926-930.
- Southern, P.M; Mays, B.B.; Pierce, A.K.; Sanford, J.P. (1970). Pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Lab. Clin. Med.*, **76**:548-559.
- Speert, D.P.; Farmer, S.W.; Campbell, M.E.; Farmer, K.; Volpel, K.; Joffe, A.M.; Parachych, W. (1989). Use of a pilin gene to study molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* by cystic fibrosis patients. *J.Clin. Microbiol.*, **27**:1265-1267.
- Speert, D.P.; Farmer, S.W.; Campbell, M.E., Musser, J.M.; Duo, S. (1990). Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to the phenotype characteristic of strain from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 188-194.
- Strulens, M.J.; Schwam, V.; Deplano, A.; Baran, D. (1993). Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strain infecting cystic fibrosis patient. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 2320-2326.

- Taussig, L.M. (1984). Cystic fibrosis: an overview, in Taussig LM (ed): Cystic Fibrosis. New York. *Thieme-Stration*, 1-9.
- Toschka, H.O.; Höpfl, P.; Ludwig, W.; Scheleifer, K.H.; Ulbrich, N.; Erdman, V.A.E. (1988). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucl. Ac. Reser.*, **16**: 2348.
- Tsui, L.C.; Buchwald, M.; Barker, D.; Braman, J.C.; Knowlton, R.; Schrumm, J.W.; Eiberg, h.; Mohr, J.; Kennedy, D.; Plavic, N. (1985). Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*, **230**: 1054-1056.
- Tümmeler, B.; Doopman, U.; Grouthues, D.; Weissbrodt, H.; Steikamp, G.; von der Hardt, H (1991). Nosocomial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* by cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 1265-1267
- Tümmeler, B.; Kiewitz, C. (1999). Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol. Med. Today*, **5**: 351-358.
- Tyler, S.D.; Strathdee, C.A.; Rozee, K.R.; Johnson, W.M. (1995). Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of the genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2**: 448-453.
- Van Belkum, A. (1994). DNA fingerprint of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin. Microbiol. Rev.*, **7**: 174-184
- Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, **19**: 6823-6831
- Wainwright, B.J. (1991). The molecular pathology of cystic fibrosis. *Curr. Biol.* **1**: 80-82

- Wainwright, B.J.; Scambler, P.J.; Schimidtke, J.; Watson, E.A.; Hai-Yang Law, Farrall, M.; Cooke, H.J.; Eiberg, H.; Williamson, R. (1985). Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature*, **318**: 384-385.
- Walton, M.A.; Villarreal, C.; Herndon, D.N.; Heggers, J.P. (1997). The use of aztreonam as an alternate therapy for multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. (1997). *Burns*, **23**: 225-227.
- Welsh, J.; McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Aci. Reser.*, **18**: 7213-7218.
- Wheeler, W.B.; Colten, H.R. (1998). Cystic fibrosis: Currente approach to diagnosis and management. *Pediatr. Rev.*, **9**: 241-248.
- White, R.; Woodward, W.; Leppert, M.; O'Connell, P.O.; Hoff, M.; Herbst, F.; Lalouel, F.M.; Dean, M.; Vande Wonde, G. (1985). A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature*, **318**: 382-384.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucl. Aci. Reser.*, **18**: 6531-6535.
- Wilson, E.D. (1930). Studies in bacterial proteases I. The relation of proteases production to the culture medium. *J. Bacteriol.*, **20**: 41-59.
- Wolz, C.; Kioz, G.; Ogle, J.W.; Vasil, M.L.; Schaad, U.; Botzenhart, K.; Döring, G. (1989). *Pseudomonas aeruginosa* cross-colonization and persistence in patients with cystic fibrosis. Use of a DNA probel. *Epidemiol. Infect.*, **102**: 205-214.
- Woods, D.E.; Schaffer, M.S.; Rabin, H.R.; Campbel, G.D.; Sokol, P.A. (1986). Phenotypic comparasion of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J. Clin. Microbiol.*, **24**: 260-264.