



**Ana Paula Gaspar
Mondego**

**Pesquisa e caracterização de integrões em bactérias
isoladas de ambientes naturais e hospitalares**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Mendo, Professora Auxiliar, e do Doutor António Correia, Professor Associado, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Trabalho realizado com o apoio da
Fundação Calouste Gulbenkian
(E-193322)

UA-SD



253528

À minha mãe, ao meu marido e aos meus filhos

o júri

presidente

Doutor António Carlos Matias Correia
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Doutora Maria José Félix Saavedra
Professora Associada da Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro

Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À minha mãe e ao meu marido, sem o enorme esforço dos quais não me teria sido possível realizar esta etapa da vida académica.

Aos meus filhos, os mais prejudicados pela minha longa ausência.

Aos meus orientadores, por todo o apoio que me deram, e que permitiu a elaboração desta Tese de Mestrado.

À minha irmã e aos meus sobrinhos em Maputo, que atenuaram a minha ausência junto dos meus filhos.

À minha irmã e aos meus sobrinhos em Braga por todo o apoio logístico e emocional que me deram.

À Andreia, a minha âncora em Aveiro, sem a qual teria andado muitas vezes à deriva.

Ao ISCTEM, pela oportunidade que me foi concedida.

Ao Professor Doutor António Saraiva de Sousa, por ter apostado em mim.

À Fundação Calouste Gulbenkian pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu fazer este Mestrado

A todo o grupo do laboratório, por tudo o que me ensinaram, por toda a ajuda que me prestaram e pela paciência e carinho que demonstraram nos meus momentos mais complicados.

A todos aqueles que não mencionei, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

palavras-chave

resistência a antimicrobianos, integrões, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*.

resumo

A resistência bacteriana a antibióticos constitui um motivo de preocupação crescente e está frequentemente associada a elementos genómicos móveis, em que se incluem os integrões, podendo, por isso, ser transmitida entre estirpes.

Neste trabalho pesquisaram-se integrões em estirpes bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Brevibacterium* spp. resistentes a antibióticos isoladas de diferentes fontes e procedeu-se à caracterização molecular de alguns dos integrões encontrados.

Do trabalho realizado foi possível concluir que os integrões se encontram disseminados na comunidade, que nem sempre conferem vantagem selectiva às estirpes que os possuem, que a sua região variável é idêntica em estirpes diferentes que apresentam integrões de tamanho semelhante. Os resultados sugerem ainda que para além dos integrões existem outros mecanismos responsáveis pelos fenótipos de resistência observados nas estirpes estudadas.

keywords

antimicrobial resistance, integrons, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*

abstract

The emergence of antibiotic resistance among pathogenic and commensal bacteria has become a serious problem worldwide. Mobile elements such as integrons are able to facilitate the spread of resistance genes between bacterial species.

In this work, several strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacterium* spp. have been screened for the presence of integrons. Some of these integrons have been characterized.

The results obtained suggest that integrons are widespread in the community, not always conferring selective advantage to the strains harbouring them. It can also be concluded that integrons of the same size contain identical gene cassettes arrays. Additionally, the results obtained suggest that mechanisms other than integrons could be involved in the antimicrobial resistance profile observed in these strains.

Objectivos	1
Introdução	5
1. Integrões.....	7
1.1. Integrões de resistência (IR).....	9
1.1.1. Classificação dos integrões de resistência.....	11
1.1.1.1. Integrões de classe 1.....	12
1.1.1.2. Integrões de classe 2.....	13
1.1.1.3. Integrões de classe 3.....	14
1.2. Superintegrões.....	15
1.3. Utilidade dos integrões para estudos epidemiológicos.....	16
2. O género <i>Pseudomonas</i>	18
2.1. A espécie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
3. O género <i>Brevibacterium</i>	22
3.1. As espécies do género <i>Brevibacterium</i>	23
3.2. Resistência aos antibióticos por <i>Brevibacterium</i>	25
Materiais e Métodos	27
1. Estirpes bacterianas.....	29
2. Preparação de DNA total em solução.....	30

3. Amplificação de DNA por PCR (reacção em cadeia da polimerase).....	31
4. Electroforese.....	32
5. Purificação de produtos de PCR das regiões variáveis.....	33
6. Determinação das sequências nucleotídicas dos produtos de PCR das regiões variáveis.....	34
6.1. Análise das sequências nucleotídicas dos produtos de PCR.....	34
Resultados e discussão.....	35
1. Integrases.....	37
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
1.2. <i>Brevibacterium</i> spp.....	40
2. Regiões variáveis dos integrões de classe 1.....	42
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
2.2. <i>Brevibacterium</i> spp.....	51
3. Regiões variáveis dos integrões de classe 2.....	54
3.1 <i>Brevibacterium</i> spp.....	54
Conclusões.....	55
Bibliografia.....	59

OBJECTIVOS

A disseminação da resistência a antibióticos, em ambientes hospitalares naturais, constitui motivo de grande preocupação do ponto de vista da saúde pública e exige uma permanente monitorização.

A resistência a antibióticos encontra-se frequentemente associada a elementos genéticos móveis, podendo por isso ser transmitida horizontalmente entre estirpes e, por vezes, ultrapassa mesmo a barreira da espécie. Diversos elementos genéticos, como por exemplo plasmídeos, integrões e transposões, contribuem para esta disseminação.

Os integrões actuam como efectores de rearranjos de genes, usando cassetes de recombinação em locais específicos dos genomas bacterianos. São detectados frequentemente em estirpes de procariotas, principalmente em bactérias Gram negativas, de origem ambiental e hospitalar.

A pesquisa de integrões por PCR (reação em cadeia da polimerase) e a caracterização das suas cassetes de genes podem ser usadas para análise do perfil de resistência e identificação dos determinantes genéticos da resistência de isolados bacterianos.

O presente trabalho tem por objectivo geral estudar a presença de integrões em representantes de dois grupos bacterianos distintos e de convivência corrente com o ser humano:

- a) Uma espécie Gram negativa, de elevada dispersão ambiental e causadora, por vezes, de infecções graves;
- b) Um género Gram positivo, contendo organismos frequentemente associados a produtos alimentares e também alguns patogénicos oportunistas.

Os objectivos específicos deste trabalho foram:

1. Pesquisar integrões em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Pesquisar integrões em estirpes de *Brevibacterium* de várias origens.
3. Caracterizar molecularmente alguns dos integrões encontrados.
4. Estudar a epidemiologia dos integrões caracterizados.

INTRODUÇÃO

A partilha de bactérias benignas e patogénicas entre humanos, animais e meio ambiente, associada ao facto de as bactérias poderem facilmente transferir genes entre si, através de elementos genéticos móveis como os integrões, leva a que possa haver disseminação de genes de resistência e/ou de bactérias resistentes entre ecossistemas (O'Brien, 2002; Smith *et al.*, 2002).

1. Integrões

O fenómeno da resistência a antibióticos talvez seja o exemplo mais recente do impacto da transferência horizontal de genes na adaptação microbiana. Este fenómeno refere-se ao rápido e amplo aparecimento de perfis semelhantes de resistência a antibióticos entre diferentes isolados clínicos de bactérias Gram negativas, durante a última metade do século passado. Na base da aquisição de genes de resistência a antibióticos encontra-se a actividade dos integrões.

Os integrões foram definidos por Hall e Collis (1995) como elementos que contêm os determinantes genéticos dos componentes de um sistema de recombinação sítio-específica que reconhece e captura cassetes de genes móveis. Estruturalmente, os integrões são constituídos por um gene *intl* (que codifica uma integrase), um local adjacente de recombinação *attI* (reconhecido pela integrase) e um promotor (P_C) correctamente orientado e responsável pela expressão dos genes contidos nas cassetes de genes que façam parte do integrão (Hall e Collis, 1995).

As integrases (IntI) são recombinases sítio-específicas pertencentes à superfamília de recombinases de tirosina e são responsáveis pela inserção de cassetes de genes no local de recombinação *attI*. As diferentes integrases apresentam os motivos conservados típicos das recombinases de tirosina e partilham um domínio adicional, localizado entre os motivos 1 e 2, que inclui um motivo conservado denominado IntI, inexistente nas restantes recombinases de tirosina (Collis *et al.*, 2002a; Messier e Roy, 2001; Nield *et al.*, 2001).

As cassetes de genes podem existir como moléculas circulares livres (Collis e Hall, 1992a) e só são transcritas quando capturadas e inseridas num integrão, normalmente no local *attI*, localizado a montante do gene *intl* (Hall e Collis, 1995). Normalmente incluem apenas um gene completo e um local de recombinação específico da integrase (Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Vaisvila *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2000; Heidelberg *et al.*, 2000). A sequência e o comprimento deste local de recombinação podem variar consideravelmente, mas todos possuem algumas características em comum. São limitados pelo motivo invertido RYYAAC (R= purina, Y= pirimidina), localizado junto à extremidade 3' do gene, e pelo motivo GTTRRY, na outra extremidade. Os locais de recombinação das cassetes de genes estão relacionados com uma sequência consenso que abrange aproximadamente as primeiras e as últimas 20 bases. Os locais de recombinação das cassetes de genes são geralmente espécie-específicos, muito embora tenham sido registadas trocas directas ou indirectas entre algumas espécies (Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Vaisvila *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2000; Heidelberg *et al.*, 2000).

A maior parte das cassetes de genes dos integrões não possuem um promotor (Hall, 1997), sendo o seu nível de expressão, e, conseqüentemente, o nível de resistência observado, determinado pela sua posição em relação ao P_C (Collis e Hall, 1995).

Uma vez que os promotores P_C asseguram que os integrões actuem como vectores naturais de expressão para qualquer cassete de gene inserida na orientação correcta (Stokes e Hall, 1989), o papel dos integrões no transporte e disseminação dos genes de resistência a antimicrobianos é evidente (Sundstrom, 1998; Hall, 1997; Jones *et al.*, 1997).

A potência de um sistema de integrão reside na sua versatilidade, que é a capacidade de reconhecer sequências alvo de recombinação altamente variáveis e a sua capacidade aparentemente ilimitada de trocar e acumular cassetes de genes. Tal flexibilidade permite a rápida adaptação ao imprevisível fluxo de nichos ambientais (Rowe-Magnus *et al.*, 1999).

O uso de antibióticos em ambientes clínicos e não clínicos desempenha um papel importante no desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos em

todo o mundo. O uso de antibióticos como profiláticos ou como estimuladores de crescimento em animais para alimentação e o seu efeito no desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos é um tema muito discutido nos últimos tempos. De particular preocupação é a entrada destas bactérias resistentes a antibióticos, ou dos seus genes de resistência, na cadeia alimentar (Barlow *et al.*, 2004; Nandi *et al.*, 2004).

Os integrões encontram-se divididos em dois grandes grupos: i) integrões de resistência; ii) superintegrões (Fluit e Schmitz, 2004).

1.1. Integrões de resistência (IR)

Os IR transportam principalmente cassetes de genes que codificam para a resistência a antibióticos e desinfetantes e podem ser encontrados tanto nos cromossomas como em plasmídeos, estando frequentemente incluídos em transposições (Morabito *et al.*, 2002; Partridge *et al.*, 2002a; Partridge *et al.*, 2002b; Sundin, 2002; Villa *et al.*, 2002).

Os integrões são ubíquos em isolados clínicos de bactérias Gram negativas resistentes a antibióticos e podem apresentar cassetes de genes com distribuição geográfica localizada, como é o caso das cassetes de genes que codificam para β -lactamases do tipo TEM-4 ou GES-2, ou apresentar cassetes de genes idênticas em regiões geograficamente afastadas, como acontece por exemplo com as cassetes de genes que codificam para β -lactamases do tipo VEB-1 que já foram encontradas em França, na Tailândia, na Índia e na China (Weldhagen *et al.*, 2003; Girlich *et al.*, 2001).

Ainda não está claro se a ordem das cassetes de genes nos IR é estável. A análise de tipos predominantes de integrões em 10 hospitais europeus sugeriu que a ordem das cassetes de genes era estável (Martinez-Freijo *et al.*, 1999), mas estudos *in vitro* demonstraram que podem facilmente ocorrer trocas nessa ordem (Collis e Hall, 1992b). A excisão de cassetes de genes pode ser mediada pela integrase, e cada cassette forma um intermediário circular. A subsequente

reintegração das cassetes de genes no local *attI* pode levar a um rearranjo na ordem das cassetes de genes (Collis e Hall, 1992b).

Nos IR, o local de recombinação específico da integrase nas cassetes de genes é denominado elemento 59-be (elemento de 59 pares de bases) ou *attC* (Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Vaisvila *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2000; Heidelberg *et al.*, 2000). O elemento 59-be permite o reconhecimento e a mobilização de cassetes de genes por uma integrase codificada pelo integrão (Collis e Hall, 1992a, Collis e Hall, 1992b).

A disseminação de cassetes de genes de resistência pelos IR parece ser favorecida pela pressão selectiva dos regimes de terapêutica antimicrobiana, que levam à captura específica de cassetes de genes de resistência. Aparentemente, qualquer ORF (Open Reading Frame) pode ser estruturada como cassete de gene (Rowe-Magnus *et al.*, 1999), pelo que os integrões desempenham um papel muito importante na evolução bacteriana (Fluit e Schmitz, 2004).

A via mais simples que leva à incorporação de uma cassete de gene num integrão envolve a recombinação entre o elemento 59-be da cassete circularizada e um local no integrão, mediada pela integrase *IntI*. As cassetes circularizadas são presumivelmente geradas pela reacção inversa, ou seja, pela excisão de um integrão (Collis *et al.*, 2001). Se o integrão receptor não possuir nenhuma cassete de gene, a reacção de integração ocorre obrigatoriamente entre o *attI* e o elemento 59-be. Contudo, se, como na maioria dos casos, já existirem uma ou mais cassetes de genes no integrão, pode ocorrer recombinação entre dois elementos 59-be e a nova cassete pode, teoricamente, ser incorporada em várias posições. No entanto, a reacção entre o elemento 59-be e o *attI* é mais eficiente do que a que ocorre entre dois elementos 59-be, pelo que a cassete a ser inserida normalmente toma a primeira posição na cadeia. (Collis *et al.*, 2001).

Quase todos os IR caracterizados até à data contêm cassetes de genes que codificam para a resistência a antimicrobianos, mas também foram descritas cassetes de genes, denominadas ORF, que codificam para funções desconhecidas (Rosser e Young, 1999; Recchia e Hall, 1995; Hall *et al.*, 1991; Sundstrom e Skold, 1990).

Frequentemente os integrões contêm cassetes de genes com o gene *aadA* (que confere resistência à espectinomicina e estreptomicina) (Martinez-Freijo *et al.*, 1999; Chiew *et al.*, 1998). Embora o uso hospitalar destes antibióticos tenha diminuído nos últimos anos, continuam a ser muito usados na criação de animais podendo os humanos ser colonizados por bactérias resistentes a estes antibióticos devido ao contacto directo com os animais ou através da cadeia alimentar (Barlow *et al.*, 2004; Nandi *et al.*, 2004).

Mais de 70 genes diferentes de resistência a antibióticos, abrangendo a maior parte das classes de antimicrobianos presentemente em uso, encontram-se na forma de cassetes de genes (Nemergut *et al.*, 2004). A maior parte dos genes identificados em cassetes de genes conferem resistência a antibióticos mais antigos, embora também tenham sido descritos genes de resistência a antibióticos mais recentemente introduzidos (White *et al.*, 2001). Algumas das novas cassetes de genes descritas possuem as suas próprias sequências promotoras, ao contrário do que acontece na maioria das cassetes de genes (Naas *et al.*, 2001).

A acumulação de cassetes de genes para formar integrões de multi-resistência contribuiu substancialmente para o actual problema no tratamento das doenças infecciosas, uma vez que já foram encontrados isolados clínicos multi-resistentes contendo até oito cassetes de genes (Naas *et al.*, 2001).

1.1.1. Classificação dos integrões de resistência

As integrases (*IntI*) definem as classes de integrões, que englobam todos os integrões com o mesmo gene *intI*, independentemente dos arranjos de cassetes de genes que possuam (Recchia e Hall, 1995).

Até à data foram descritos trinta e dois genes diferentes de integrases (Nemergut *et al.*, 2004), mas a escassa informação sobre a maioria deles levanta dúvidas sobre as classes que determinariam (Barlow *et al.*, 2004; Nemergut *et al.*, 2004).

As integrases dos integrões das classes 1 a 3 são designadas Intl1-3, mas a designação das integrases a partir da classe 4 é confusa (Nield *et al.*, 2001; Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2000; Rowe-Magnus *et al.*, 1999).

Em *Pseudomonas* estão descritos IR de classe 1 (Quinteira *et al.*, 2005b; Yatsuyanagi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002; Severino e Magalhães, 2002) e de classe 3 (Shibata *et al.*, 2003).

Em *Brevibacterium* não foram ainda descritos integrões.

1.1.1.1. Integrões de classe 1

A Intl1 reconhece três tipos de local de recombinação: *attI1*, *attC* e locais secundários. Os seus domínios de ligação e sequências consenso já foram determinados (Francia *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 1999; Segal *et al.*, 1999).

Os integrões de classe 1 encontram-se frequentemente em plasmídeos, que podem ser transferidos por conjugação (Girlich *et al.*, 2001). A facilidade da conjugação e o facto de os integrões de classe 1 serem encontrados tanto em plasmídeos conjugativos como em transposões explica a sua ampla distribuição (Fluit e Schmitz, 2004).

A estrutura dos integrões de classe 1 (fig.1) inclui um segmento conservado na posição 5' (5'-CS) e outro na posição 3' (3'-CS), relativamente à região variável. A região 5'-CS consiste no gene *intl1* (integrase), num local específico de recombinação (*attI1*) localizado junto ao gene *intl1* e numa região promotora (P_C) para expressão dos genes inseridos e que se encontra dentro do gene *intl1*. A região 3'-CS contém o gene defectivo para resistência a compostos de amónio quaternário (*qacE Δ 1*) e o gene *sul1*, que codifica para a resistência às sulfonamidas. A região variável, localizada entre os dois segmentos conservados, é o local para a inserção de cassetes de genes de resistência a antibióticos com os respectivos elementos 59-be (Collis *et al.*, 2002a; Goldstein *et al.*, 2001; Maguire *et al.*, 2001).

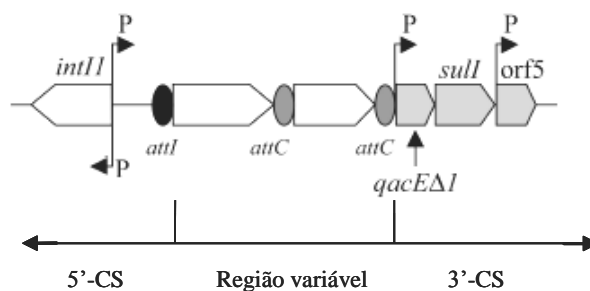


Figura 1. Estrutura de um integrão de classe 1 (Drouin *et al.*, 2002).

Os integrões de classe 1 estão associados a várias cassetes de genes de resistência. Quase todos contêm um gene *aadA*, que codifica para resistência a estreptomicina e espectinomicina, e muitos possuem também determinantes de resistência ao trimetopim. Os integrões de classe 1 isolados de bactérias envolvidas em infecções humanas também possuem frequentemente um gene para resistência a β -lactâmicos (Fluit e Schmitz, 2004).

1.1.1.2. Integrões de classe 2

Pouco se sabe sobre a epidemiologia dos integrões de classe 2.

Esta classe foi reportada em isolados de *Acinetobacter* de todo o mundo (Oh *et al.*, 2002; Seward e Towner, 2002; Ploy *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 1998). Foram também descritos integrões de classe 2 em *Shigella sonnei* (McIver *et al.*, 2002) e em *Enterobacteriaceae* (White *et al.*, 2001).

Nenhuma das *IntI2* cuja sequência nucleotídica foi determinada é funcional, devido a um codão de terminação interno. A razão para a existência deste codão é desconhecida, mas pode ser que o gene *intI2* seja um pseudogene, sendo então a integração e a excisão de cassetes de genes dependente da presença de outro tipo de integrase. A *IntI2* não funcional pode explicar o facto de os integrões de classe 2 terem muito menos cassetes de genes que os de classe 1 (Hansson *et al.*, 2002).

Os integrões de classe 2 (fig.2) normalmente possuem integradas cassetes com os genes *aadA1*, que codifica para a resistência a estreptomicina e espectinomicina, *dfrA1*, que codifica para a resistência a trimetoprim, e *sat*, que codifica para a resistência a estreptotricina (White *et al.*, 2001; Ploy *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 1998).

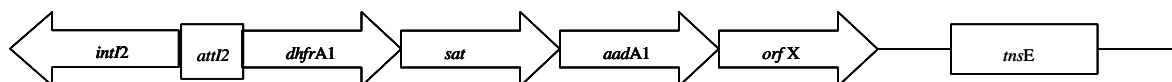


Figura 2. Estrutura do integrão de classe 2 do Tn7 (Biskri e Mazel, 2003).

Já foram encontrados isolados bacterianos, por exemplo de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp., que possuem simultaneamente integrões de classe 1 e de classe 2 (McIver *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2002; Seward e Towner, 2002; Goldstein *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001).

1.1.1.3. Integrões de classe 3

As propriedades da IntI3 são idênticas às da IntI1. A IntI3 é capaz de reconhecer diferentes elementos 59-be e integrar as cassetes de genes nos locais *attI3*. É ainda capaz de excisar cassetes de genes integradas (Collis *et al.*, 2002b).

Os primeiros integrões de classe 3 foram caracterizados em *Serratia marcescens*, isolada no Japão, pela identificação do gene *bla_{IMP}*, que codifica resistência aos antibióticos β-lactâmicos de espectro alargado. O gene *bla_{IMP}* é flanqueado por um elemento 59-be e por um gene semelhante ao da integrase e pelo gene *aac(6')-Ib* que codifica para resistência a aminoglicosídeos (Arakawa *et al.*, 1995).

A análise do integrão de classe 3 de *S. marcescens* revelou que o módulo *intI3*, *attI3* e P_C se encontra estruturalmente organizado da mesma forma que o dos integrões de classe 1 (Collis *et al.*, 2002b).

Foram posteriormente encontrados integrões de classe 3 em *Klebsiella pneumoniae* (fig.3) (Correia *et al.*, 2003) e em *Pseudomonas* (Shibata *et al.*, 2003) mas o conhecimento sobre esta classe continua a ser escasso.

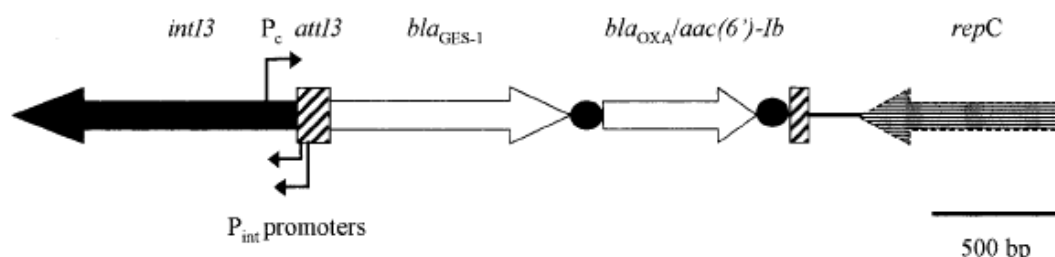


Figura 3. Representação esquemática do integrão de classe 3 In3-p22K9 de *Klebsiella pneumoniae* (Correia *et al.*, 2003).

1.2. Superintegrões (SI)

Os SI (fig.4), por vezes também denominados integrões de classe 4, são de grande tamanho, encontram-se nos cromossomas e contêm cassetes de genes com várias funções (Fluit e Schmitz, 2004).

O primeiro SI descrito foi o do cromossoma pequeno de *Vibrio cholerae* (Mazel *et al.*, 1998; Recchia e Hall, 1997). Possui várias ORFs, algumas sem promotor e com função desconhecida e outras com funções muito diversas (Heidelberg *et al.*, 2000). Algumas destas ORFs têm orientação oposta à da maior parte das cassetes de genes (Clark *et al.*, 2000). Esta classe contém o gene *intl4*, que codifica para uma integrase que faz arranjos em *tandem* das sequências repetidas de *V. cholerae*, semelhantes aos arranjos das cassetes de genes de resistência a antibióticos encontradas nos integrões de classe 1 (Mazel *et al.*, 1998).

Foram posteriormente encontrados SI noutras *Vibrionaceae* e também em *Pseudomonas*, com estrutura idêntica à descrita para *V. cholerae* (Vaisvila *et al.*, 2001; Rowe-Magnus *et al.*, 2001).

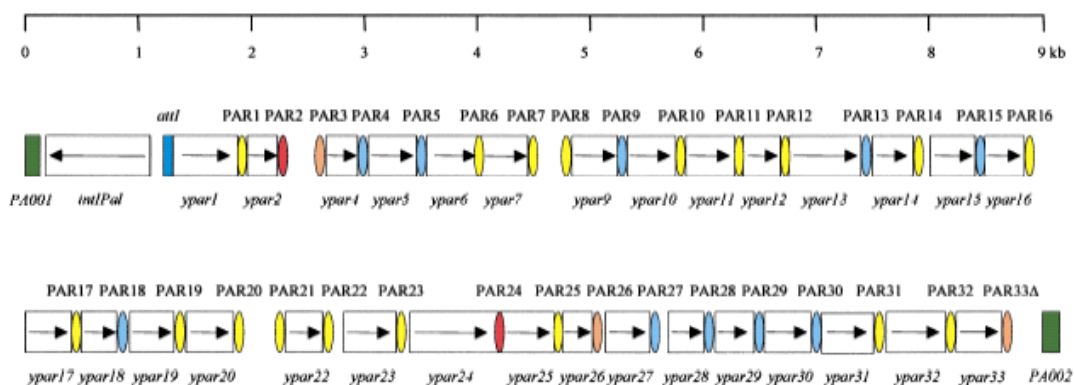


Figura 4. Estrutura do superintegrão In55044 de *Pseudomonas alcaligenes* (Vaisvila *et al.*, 2001).

O local de recombinação específico da integrase nas cassetes de genes dos SI é designado consoante a espécie em que se encontra o SI (Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Vaisvila *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2000; Heidelberg *et al.*, 2000).

Nos SI a ordem das cassetes de genes pode ser alterada (Rowe-Magnus e Mazel, 2001; Clark *et al.*, 2000; Heidelberg *et al.*, 2000), mas até ao momento não há evidências de que os SI possam ser transferidos entre estirpes ou espécies bacterianas diferentes (Fluit e Schmitz, 2004).

1.3. Utilidade dos integrões para estudos epidemiológicos

Clones bem estabelecidos melhoram o seu fenótipo de resistência pela aquisição de novos genes de resistência através de unidades genéticas de captura (plasmídeos, transposões ou integrões) facilitando assim o processo co-selectivo sob diferentes pressões selectivas e, conseqüentemente, a persistência a longo prazo desses organismos em ambientes selectivos (Canton *et al.*, 2003).

A identificação de estirpes persistentes pode reduzir significativamente a incidência de infecções nosocomiais (Tsukayama *et al.*, 2004).

Um estudo efectuado por Severino e Magalhães (2004) sugere que a análise dos integrões pode ser considerada uma ferramenta útil, quando em

associação com outras técnicas moleculares, para monitorizar infecções cruzadas ou identificar fontes de contaminação no ambiente clínico.

Estudos sobre a prevalência de integrões e caracterização de cassetes de genes em isolados clínicos fornecem informações sobre a evolução de estirpes multiresistentes, prevalência de genes de resistência a antibióticos e mecanismos moleculares da resistência a antibióticos, o que é importante para a definição de estratégias efectivas de tratamento de infecções bacterianas com antibióticos (Jones *et al.*, 2003).

Têm sido realizados vários estudos em que são utilizadas técnicas de PCR para determinar a presença de integrões e a natureza de qualquer gene inserido. Contudo, a natureza imprevisível dos produtos de amplificação, tanto em tamanho como em sequência de DNA, tornam difícil a optimização das condições de PCR (Maguire *et al.*, 2001).

Desenvolvimentos no campo do PCR em tempo real para detecção de integrões de classe 1, utilizando oligonucleótidos para as regiões conservadas, podem revolucionar este campo particular de investigação. Uma vez detectado o integrão, pode realizar-se PCR em condições padronizadas e com oligonucleótidos específicos para detectar a presença de determinados genes (Weldhagen, 2004).

Num trabalho efectuado por Leverstein-van Hall e colaboradores (2002) todas as estirpes com integrões eram resistentes a sulfametoxazol e todas as estirpes sem integrões eram sensíveis a esse composto, pelo que o cultivo em McC agar com sulfametoxazol pode ser uma forma de selecção de estirpes com integrões em laboratórios clínicos.

Uma futura aplicação mais alargada dos integrões para estudos epidemiológicos e auxílio ao diagnóstico passa pelo desenvolvimento de métodos moleculares mais simples, rápidos e baratos, que possam ser executados rotineiramente em qualquer laboratório.

2. O Género *Pseudomonas*

A identidade biológica do género *Pseudomonas* mudou muito com a transição da classificação baseada em características fenotípicas para a classificação assente em propriedades genotípicas (filogenéticas). Actualmente, o género *Pseudomonas* está incluído na família *Pseudomonadaceae*, que pertence ao grupo das γ -*Proteobacteria* do domínio *Bacteria* (Madigan *et al.*, 2003; Palleroni, 1984).

A utilização de técnicas moleculares demonstrou que o grupo das pseudomonas aeróbias, em particular aquelas que tinham sido incluídas no género *Pseudomonas*, era muito heterogéneo, pelo que foi subdividido em cinco grupos de homologia do RNAr, os grupos I a V (Prescott *et al.*, 2005; Sá-Correia, 2000; Palleroni, 1984).

O grupo I de homologia do RNAr é o característico do género *Pseudomonas*. Inclui espécies pigmentadas e não pigmentadas. As espécies pigmentadas são as chamadas pseudomonas fluorescentes, pois produzem um pigmento solúvel em água que é fluorescente sob radiação UV. Entre estas salienta-se a espécie tipo do género, *Pseudomonas aeruginosa*, uma espécie muito homogénea, que se distingue das outras pseudomonas fluorescentes pelo seu elevado conteúdo GC (67 %). Produz piocianina (pigmento fluorescente azul), pioverdina (verde), piorrubina (vermelho) e piomelanina (castanho) e cresce até 42 °C (Brooks *et al.*, 2001; Holt *et al.*, 1994).

Os membros do género *Pseudomonas* são bastonetes direitos ou ligeiramente curvos, Gram negativos, aeróbios, não formadores de endósporos, com flagelos lofótricos. Apresentam, tipicamente, exigências nutricionais muito simples e crescem quimiorganoheterotróficamente a pH neutro e a temperaturas mesofílicas. São extremamente adaptáveis no que respeita às condições de nutrição e podem utilizar vários substratos orgânicos como fontes de carbono e azoto. O seu metabolismo é tipicamente respiratório, sendo o oxigénio o aceitador final de electrões. Contudo, as espécies desnitrificantes podem usar o nitrato como um aceitador alternativo, permitindo que o crescimento ocorra em

condições de anaerobiose (Prescott *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2003; Holt *et al.*, 1994).

As espécies do género *Pseudomonas* são saprófitas e encontram-se amplamente distribuídas na natureza, particularmente no solo e na água, mas algumas são também patogénicas oportunistas para animais e para plantas (Brooks *et al.*, 2001; Sá-Correia, 2000).

2.1. A espécie *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma espécie ubíqua, podendo ser isolada de águas, solos, plantas, esgotos e de amostras clínicas. A maior parte das estirpes é completamente inócua; contudo, algumas estirpes podem provocar infecções graves em humanos (Madigan *et al.*, 2003; Tomofusa *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2001). A patogenicidade de *P. aeruginosa* encontra-se limitada ao oportunismo, em resultado das suas características biológicas, que dificultam o acesso aos tecidos do hospedeiro e a um nicho específico onde possa proliferar e evitar os mecanismos de defesa deste. Contudo, uma vez estabelecida, é uma das espécies oportunistas mais virulentas, para o que contribuem várias estruturas e compostos extracelulares como toxinas, proteases e hemolisinas (fig.5) que *P. aeruginosa* excreta para o meio circundante e que são capazes de danificar os tecidos e destruir as defesas do hospedeiro (Prescott *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2003). Um outro factor importante parece ser o polissacárido extracelular, que algumas estirpes sintetizam abundantemente, o qual parece favorecer a persistência das estirpes produtoras nos pulmões de doentes com fibrose quística (Manno *et al.*, 2005; Prescott *et al.*, 2005; Livermore, 2003).

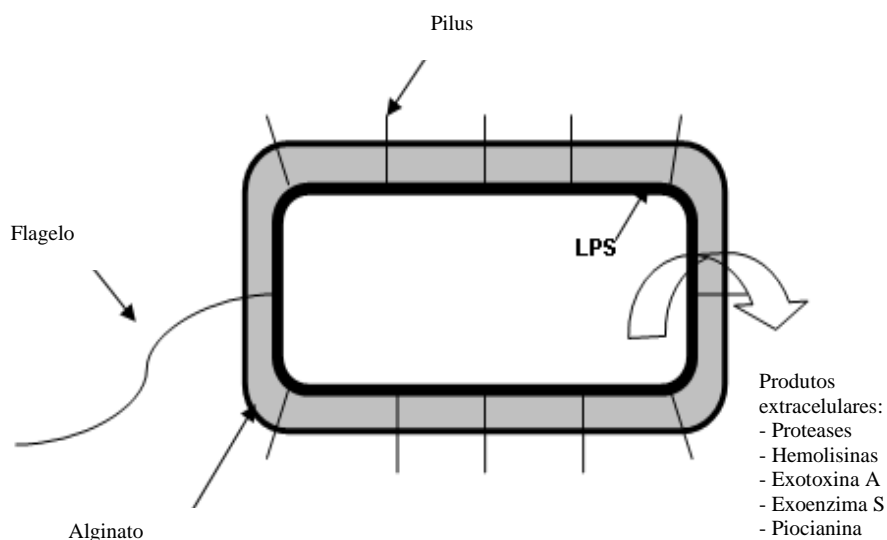


Figura 5. Factores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* (adaptado de <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>).

Muitas infecções por *P. aeruginosa* são nosocomiais, ou seja, são adquiridas pelos doentes enquanto internados no hospital ou mesmo por outras pessoas em contacto com o meio hospitalar (Tsukayama *et al.*, 2004; Severino e Magalhães, 2002). Os doentes imunodeprimidos constituem um grupo particularmente susceptível a este tipo de infecções (Sá-Correia, 2000; <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>).

2.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é notável pela sua resistência a antibióticos (Lagatolla *et al.*, 2004; Tsukayama *et al.*, 2004). É naturalmente resistente a muitos antibióticos, devido à barreira de permeabilidade fornecida pelo lipopolissacárido da membrana exterior (Livermore, 2002). Por outro lado, a sua tendência para colonizar superfícies na forma de biofilme protege as células de serem afectadas pelas concentrações terapêuticas dos antibióticos (Delissalde e Cuevas, 2004;

Madigan *et al.*, 2003). Outro problema que surge em relação a *P. aeruginosa*, reside em que muitas estirpes não respondem clinicamente, embora, *in vitro*, se revelem aparentemente sensíveis aos antibióticos (Govan, 1993).

Uma vez que o seu habitat natural é o solo, onde vive em associação com bacilos, actinomicetes e bolores, *P. aeruginosa* desenvolveu resistência a vários dos antibióticos produzidos naturalmente por essas espécies (Sá-Correia, 2000; <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>).

P. aeruginosa é frequentemente resistente aos antibióticos mais utilizados, tais como β -lactâmicos, macrólidos, cloranfenicol, sulfonamidas e trimetoprim. Existem ainda estirpes que desenvolveram resistência a antibióticos como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Jo *et al.*, 2003; Tomofusa *et al.*, 2003; Livermore, 2002).

As bactérias possuem vários mecanismos para resistir a antimicrobianos. Podem sofrer mutações cromossômicas, expressar um gene cromossômico latente ou adquirir novo material genético de resistência por conjugação, transdução ou transformação. A informação codificada por este material genético possibilita à bactéria o desenvolvimento de resistência por três mecanismos principais: produzindo uma enzima que inactive ou destrua o antibiótico; alterando o local alvo do antibiótico de forma a impedir a sua acção; impedindo o acesso do antibiótico ao alvo. É frequente encontrarem-se estirpes hospitalares que possuam simultaneamente vários destes mecanismos (Shlaes *et al.*, 1997).

O aparecimento de resistência múltipla associada a elementos móveis é menos previsível do que a resistência mutacional uma vez que depende da captura aleatória de genes por esses elementos. Contudo, uma vez adquirida essa resistência, tanto pode disseminar-se a estirpe hospedeira entre pacientes como disseminar-se a resistência entre estirpes e, por vezes, ultrapassando mesmo a barreira da espécie (Nemergut *et al.*, 2004; Livermore, 2003; Madigan *et al.*, 2003; Leverstein-van Hall *et al.*, 2002).

A propagação de cassetes de genes de resistência a antimicrobianos pelos IR, parece ser favorecida pela pressão selectiva dos regimes de terapêutica antimicrobiana, que levam à captura específica de determinadas cassetes de genes (Rowe-Magnus *et al.*, 2001).

A diminuição do uso de antibacterianos nem sempre leva à diminuição da resistência, o que possivelmente se deve à boa adaptação das bactérias para o transporte dessa resistência (Livermore, 2003).

3. O género *Brevibacterium*

O género *Brevibacterium* é o único da família *Brevibacteriaceae* (Subclasse *Actinobacteridae*, Classe *Actinobacteria*, Filo *Firmicutes* e Domínio *Bacteria*). Este género foi proposto por Breed (1953), com *Brevibacterium linens* como espécie tipo, para um número de bactérias Gram positivas, com a forma de bastonetes curtos e não ramificados, não formadoras de esporos, outrora classificadas no género *Bacterium*. Dada a fraca delimitação do género, rapidamente se tornou um repositório para várias espécies com características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas muito diversas. A descrição do género foi subsequentemente corrigida para englobar apenas as espécies com grande semelhança à espécie tipo, *B. linens* (Collins *et al.*, 1980).

Os membros do género *Brevibacterium* podem ser encontrados em vários nichos ecológicos, incluindo a flora comensal do homem e de outros animais, assim como em alimentos e no ambiente (Funke *et al.*, 1997; Reinert *et al.*, 1995; Gruner *et al.*, 1994; Funke e Carlotti, 1994; Gruner *et al.*, 1993; Neumeister *et al.*, 1993).

Os organismos do género *Brevibacterium* apresentam um conteúdo em GC compreendido entre 60 e 67 % e são caracterizados por exibirem um ciclo de vida marcadamente pleomórfico durante o crescimento em meios complexos; na fase exponencial as células apresentam-se morfológicamente como bastonetes, mas, ao entrarem na fase estacionária de crescimento, adquirem a forma de cocos. Ambas as formas morfológicas são Gram positivas, mas algumas estirpes e colónias envelhecidas descoloram rapidamente. Outras importantes propriedades bioquímico-morfológicas de *Brevibacterium* spp. incluem: a não formação de endósporos; a ausência de mobilidade; a temperatura óptima de crescimento entre 20 e 30 °C (ou 37 °C dependendo da espécie e estirpe); serem aeróbicos

obrigatórios; possuem metabolismo oxidativo; não produzem ácido a partir de hidratos de carbono em meio de peptona; produzem proteinases extracelulares e catalase; não possuem urease; serem halotolerantes; o peptidoglicano que forma a parede celular possuir ácido *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP) como diaminoácido; ausência de arabinose e de ácidos micólicos na parede celular; possuem grandes quantidades de menaquinonas desidrogenadas (Funke *et al.*, 1997; Cai e Collins, 1994; Jones e Keddie, 1986).

As *Brevibacterium* são passíveis de ser confundidas com membros dos géneros *Arthrobacter* e *Rhodococcus*, uma vez que todos são estritamente aeróbicos e apresentam um ciclo de vida pleomórfico (Jones e Keddie, 1986). Contudo, enquanto as *Brevibacterium* contêm *meso*-DAP como constituinte da parede celular, as *Arthrobacterium* contêm lisina. Relativamente aos membros do género *Rhodococcus*, apesar de também possuírem *meso*-DAP na parede celular, tal como os géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Mycobacterium*, os membros de todos esses géneros contêm arabinose como açúcar característico da parede celular, o que não acontece com as bactérias do género *Brevibacterium*. Uma outra característica que permite distinguir as *Brevibacterium* das bactérias pertencentes aos géneros acima mencionados e que contêm *meso*-DAP é o facto de não possuírem ácidos micólicos mas sim ácidos teicóicos nas suas paredes celulares (Ratray e Fox, 1999).

3.1. As espécies do género *Brevibacterium*

Um grande número de questões permanece ainda por esclarecer em relação ao género *Brevibacterium* em diversas áreas incluindo a fisiologia, metabolismo e taxonomia (Ratray e Fox, 1999).

A identificação a nível do género é baseada principalmente em aspectos quimiotaxonómicos (Jones e Collins, 1986). A diferenciação a nível das espécies é essencialmente baseada nos pigmentos e no habitat, mas a diferenciação das espécies não pigmentadas depende grandemente de técnicas moleculares de tipagem (Alves *et al.*, 2002; Lima e Correia, 2000).

Um estudo realizado com várias técnicas moleculares revelou um alto grau de variabilidade genética no grupo *B. linens*/*B. casei* e no grupo *B. iodinum*/*B. epidermidis*. As duas últimas espécies parecem estar mais próximas de espécies do género *Corynebacterium* do que do género *Brevibacterium*. Estes resultados, em conjunto com a grande diversidade genotípica encontrada, realçam a necessidade de desenvolver a taxonomia do género *Brevibacterium*, para o que são necessários mais estudos com outras estirpes e espécies recentemente descritas (Alves *et al.*, 2002).

Para além de *B. linens* são actualmente reconhecidas no género outras catorze espécies: *B. iodinum*, *B. casei*, *B. epidermidis*, *B. mcbrellneri*, *B. otitidis*, *B. avium*, *B. paucivorans*, *B. luteolum*, *B. celere*, *B. picturae*, *B. sanguinis*, *B. antiquum*, *B. aurantiacum* e *B. permense*. As espécies *B. halotolerans*, *B. frigoritolerans* e *B. stationis* não foram ainda sujeitas a estudos genéticos pelo que a sua posição taxonómica permanece incerta (<http://www.bacterio.cict.fr/b/brevibacterium.html>).

Antes de 1991 as brevibactérias não eram associadas a doenças em humanos. Em 1991, McCaughey isolou *B. epidermidis* de uma infecção associada a um catéter venoso (McCaughey e Damani, 1991). Em 1993, Gruner e colaboradores isolaram 9 estirpes de *B. casei* e *B. epidermidis* a partir de amostras clínicas. A partir dessa data as bactérias corineformes pertencentes ao género *Brevibacterium* têm vindo a ser progressivamente reconhecidas como patógenos oportunistas em vários ambientes clínicos, especialmente nosocomiais (Antoniou *et al.*, 1997; Funke *et al.*, 1997).

B. casei é a principal estirpe de *Brevibacterium* isolada de amostras clínicas (Funke e Carlotti, 1994), tendo sido isolada de sangue, líquido cerebroespinal e pleural (Gruner *et al.*, 1994). Foram descritos casos de septicemia (Castagnola *et al.*, 1997; Reinert *et al.*, 1995) e outras doenças em humanos (Reinert *et al.*, 1995).

Os técnicos dos laboratórios de Microbiologia clínica devem ser alertados para o facto de organismos ambientais, como as brevibactérias, apesar de serem pouco comuns, poderem causar infecções oportunistas, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (Janda *et al.*, 2002). É ainda de salientar que a

microbiota ambiental pode constituir um reservatório importante de determinantes genéticos de resistência a antibióticos (Saavedra *et al.*, 2003).

3.2. Resistência aos antibióticos por *Brevibacterium*

A resistência a antibióticos por parte das brevibactérias não se encontra muito estudada.

Num dos poucos estudos, *B. linens* foi testada conjuntamente com vários outros microrganismos isolados de queijo e outros produtos lácteos, a 30 antibióticos diferentes tendo-se mostrado resistente a meticilina, nafcilina, cloxacilina, oxacilina, furadantina e ácido nalidíxico (Reinbold e Reddy, 1974).

Troxler e colaboradores (2001) testaram a susceptibilidade natural a antibióticos de *B. casei*, verificando que esta espécie era resistente à maior parte dos antibióticos testados, sendo apenas susceptível a tetraciclina, aminoglicosídeos, carbapenemos, macrólidos, lincosamidas, glicopeptídeos e rifampina.

A aquisição de genes de resistência por transferência horizontal está muitas vezes associada a plasmídeos. Em *B. linens* estão descritos quatro plasmídeos, não havendo registo da presença de plasmídeos nas outras espécies de *Brevibacterium* (Moore *et al.*, 2003; Leret *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1989). Quatro estirpes de *B. linens* identificadas como portadoras de plasmídeos foram testadas para a resistência a antibióticos e produção de proteases, lipases e bacteriocinas, não tendo sido associada qualquer dessas características aos plasmídeos (Moore *et al.*, 2003).

Nandi e colaboradores (2004) descreveram pela primeira vez a ocorrência do gene *intl1* em estafilococos, aerococos e brevibactérias, afirmando ainda que os dois últimos grupos apresentavam amplicões 5'CS-3'CS com a estrutura dos integrões de classe 1, mas não mencionando quais as cassetes de genes neles inseridas. No entanto, a espécie de *Brevibacterium* identificada nesse estudo como *B. thiogenitalis* é, na realidade, *Corynebacterium glutamicum* (<http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1718&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock).

No GenBank encontram-se algumas sequências de integrase de *B. linens* BL2 depositadas recentemente, não havendo nenhuma referência à restante estrutura do integrão.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Estirpes bacterianas

Na tabela 1 encontram-se listadas as estirpes utilizadas neste trabalho.

Tabela 1. Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo

Espécie	Estirpes	Origem
<i>Brevibacterium casei</i>	DSM 20658 DSM 20657 ^T	Leite e queijo Cheddar
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	DSM 20660 ^T	Pele humana
<i>Brevibacterium iodinum</i>	LMG 2201 DSM 20626 ^T	Leite
<i>Brevibacterium linens</i>	CCUG 12168 CCUG 23846 CCUG 23896 ATCC 19391	Detritos de aves, queijo
<i>Escherichia coli</i> transformada com pTRC99A com parte do Tn7 inserido		Plasmídeo com inserto gentilmente cedido por Prof. P. Roy (ULaval)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FFUL22K	Gentilmente cedida por Prof. A. Duarte (FFUL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pa1, Pa4, Pa5, Pa9, Pa14, Pa20, Pa21, Pa22, Pa24, Pa30, Pa31, Pa32, Pa34, Pa35	Expectoração
	Pa2, Pa3, Pa18, Pa19	Secreção brônquica
	Pa7, Pa25, Pa33	Urina
	Pa10, Pa11, Pa12, Pa13, Pa15, Pa23, Pa29	Pús
	Pa6, Pa8, Pa16, Pa17, Pa26, Pa27, Pa28	Produto biológico não especificado
<i>Salmonella typhimurium</i>	DT 104 (9616368)	Gentilmente cedida por Dr ^a . A. Schmidt (KVL)

ATCC : American Type Culture Collection, Rockville, USA; **CCUG** : Culture Collection University of Göteborg, Sweden; **DSM**: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany; **DT**: fagotipo; **FFUL**: Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa; **KVL**: The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark; **LMG**: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent, Belgium; **Pa**: estirpes de *P. aeruginosa* obtidas de amostras clínicas de pacientes do Hospital Infante D.Pedro, Aveiro; **ULaval**: Université Laval, Canadá.

Em laboratório, após incubação à temperatura óptima (30 °C para *Brevibacterium* e 37 °C para as restantes) durante 18 horas, as estirpes foram mantidas em placas de Petri com Tryptic Soy Agar, TSA, (Merck), a 4 °C.

2. Preparação de DNA total em solução

O DNA total das estirpes de *P. aeruginosa* foi preparado utilizando o Genomic Purification Kit (Fermentas) e conservado a -20 °C para posterior utilização.

Protocolo para preparação de DNA total em solução (Genomic Purification Kit – Fermentas)

1. Inocular tubos contendo Tryptic Soy Broth, TSB, (Merck). Incubar durante 18 horas a 37 °C e 200 r.p.m., num incubador orbital Sanyo Orbi-Safe TS Netwise.
 2. Transferir 2 mL de cada cultura para um microtubo e centrifugar durante 5 minutos a 14000 r.p.m. numa centrífuga Eppendorff miniSpin Plus.
 3. Descartar o sobrenadante e ressuspender em 200 µL de TE.
 4. Adicionar 400 µL de solução de lise e incubar a 65 °C durante 5 minutos.
 5. Adicionar 600 µL de clorofórmio, agitar suavemente durante 5 minutos, centrifugar durante 5 minutos a 14000 r.p.m.
 6. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo, adicionar 800 µL de solução de precipitação e agitar suavemente até se formar um novelo de DNA. Centrifugar 5 minutos a 14000 r.p.m.
 7. Descartar o sobrenadante e ressuspender em 100 µL de NaCl. Adicionar 10 µL de RNase 10 mg/mL (Roche) e incubar a 37 °C durante 10 minutos.
 8. Lavar com 300 µL de etanol absoluto frio e colocar 1 hora a -20 °C.
 9. Centrifugar a 4 °C durante 15 minutos a 14000 r.p.m. e descartar o etanol.
 10. Lavar o precipitado com 300 µL de etanol 70 %.
 11. Centrifugar durante 5 minutos a 14000 r.p.m. e descartar o etanol.
 12. Centrifugar durante 2 minutos a 14000 r.p.m., retirar o etanol excedente e ressuspender em 100 µL de TE.
-

TE: Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 8,0

Para as estirpes de *Brevibacterium* não foi preparado DNA total, tendo sido utilizadas suspensões de células em 100 µL de água destilada estéril como substrato para as reacções de PCR (Rademaker e de Bruijn, 1997).

3. Amplificação de DNA por PCR (reacção em cadeia da polimerase)

O DNA foi amplificado por PCR utilizando um termociclador Thermo Hybaid PxE 0.2 (Thermo Electron Corporation).

As reacções foram feitas em volumes de 50 µL, para a amplificação do gene *intl3*, e em volumes de 25 µL, para as restantes amplificações. As reacções com volume final de 25 µL continham 80 µM de dNTP mix (Fermentas), 1 µM de cada oligonucleótido, 1 X tampão de PCR sem MgCl₂ (Fermentas), 3 mM de MgCl₂ (Fermentas), 1 µL de DNA e 1 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas). As reacções com volume final de 50 µL continham 4,9 % de DMSO, 0,2 mM de dNTP mix (Fermentas), 0,3 µM de cada oligonucleótido, 1X de tampão de PCR sem MgCl₂ (Fermentas), 3 mM de MgCl₂ (Fermentas), 1 µL de DNA e 1 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas).

Foram pesquisados os genes *intl1*, *intl2* e *intl3* e as regiões variáveis dos integrões de classe 1 das estirpes *intl1* positivas e dos integrões de classe dois para as estirpes *intl2* positivas (tabela 2).

Tabela 2. Oligonucleótidos e estirpes de controlo utilizados nas reacções de amplificação de DNA por PCR

Região a amplificar	Oligonucleótidos	Ta (°C)	Controle positivo
<i>intl1</i>	HS463a: 5'-CTG GAT TTC GAT CAC GGC ACG-3' Hs464: 5'-ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC G-3' (Barlow <i>et al.</i> , 2004)	65	<i>Salmonella typhimurium</i> (gentilmente cedida por Prof. A. Schmidt)
<i>intl2</i>	RB201: 5'-GCA AAC GCA AGC ATT CAT TA-3' RB202: 5'-ACG GAT ATG CGA CAA AAA GG-3' (Barlow <i>et al.</i> , 2004)	62	<i>E. coli</i> transformada com pTRC99A com parte do Tn7 inserido (gentilmente cedido por Prof. P. Roy)
<i>intl3</i>	Intl3F: 5'-AGT GGG TGG CGA ATG AGT G-3' Intl3R: 5'-TGT TCT TGT ATC GGC AGG TG-3' (Goldstein <i>et al.</i> , 2001)	57	<i>Klebsiella pneumoniae</i> p22K9 (gentilmente cedida por Prof. A. Duarte)
Zona variável (classe 1)	RB317: 5'-GAA CCT TGA CCG AAC GCA G-3' RB320: 5'-AGC TTA GTA AAG CCC TCG CTA G-3' (Barlow <i>et al.</i> , 2004)	59	<i>Salmonella typhimurium</i> (gentilmente cedida por Prof. A. Schmidt)
Zona variável (classe 2)	Hep74: 5'-CGG GAT CCC GGA CGG CAT GCA CGA TTT GTA- 3' Hep51: 5'-GAT GCC ATC GCA AGT ACG AG- 3' (White <i>et al.</i> , 2001)		<i>E. coli</i> transformada com pTRC99A com parte do Tn7 inserido (gentilmente cedido por Prof. P.Roy)

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C durante 1 minuto, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos à temperatura de hibridação (Ta) e 45 segundos ou 4 minutos (para a região variável dos integrões de classe 2) a 72 °C e extensão final de 10 minutos a 72 °C.

4. Electroforese

A electroforese foi feita em gel de agarose preparado com tampão TAE 1X. Foi utilizada agarose a 0,8 % para o DNA total isolado e a 1 % para os produtos de PCR.

As amostras, adicionadas de tampão de carga 6X na proporção adequada, foram aplicadas no gel e a migração decorreu a 80 V em tampão de corrida TAE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio e a sua imagem foi digitalizada utilizando o aparelho High Performance UV transilluminator (UVP- Ultra-Violet

Products) associado a uma câmara Olympus e ao programa informático Doc-It (UVP- Ultra-Violet Products).

O tamanho e a concentração dos fragmentos do DNA foi determinado por comparação com padrões de DNA de concentração conhecida, nomeadamente os marcadores Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker e GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas)

TAE 1 X: 0,8 mM Tris, 0,4 mM ácido acético, 0,02 mM EDTA; pH 8,0

Tampão de carga 6 X: 10 mM Tris-HCl, 0,03 % azul de bromofenol, 0,03 % xileno cianol I/I, 60 % glicerol, 60 mM EDTA

5. Purificação de produtos de PCR das regiões variáveis

Os produtos de amplificação foram purificados com o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences), sendo a eluição final feita com 50 µL de água miliQ estéril.

Protocolo para purificação de DNA (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit - Amersham Biosciences)

1. Colocar uma coluna GFX num tubo colector e adicionar 500 µL de tampão de captura à coluna.
 2. Transferir a solução de DNA para a coluna e misturar bem.
 3. Centrifugar durante 30 segundos a 14000 r.p.m. numa centrífuga Eppendorff miniSpin Plus.
 4. Descartar o líquido recolhido no tubo.
 5. Adicionar 500 µL de tampão de lavagem à coluna e centrifugar a 14000 r.p.m. durante 30 segundos.
 6. Descartar o tubo colector e transferir a coluna para um microtubo.
 7. Adicionar 50 µL de água miliQ estéril directamente no topo da matriz da coluna e incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto.
 8. Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 1 minuto.
-

6. Determinação das sequências nucleotídicas dos produtos de PCR das regiões variáveis

Os produtos de amplificação purificados foram sequenciados nas empresas Macrogen (Seoul, Coreia) e STAB VIDA (Oeiras, Portugal)

No caso dos produtos de maior tamanho, foi necessário utilizar a metodologia de “primer walking”, com oligonucleótidos desenhados especificamente para o efeito.

6.1. Análise das sequências nucleotídicas dos produtos de PCR

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas e comparadas com outras depositadas no GenBank utilizando os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (Versão 7.0.1.1), ClustalW Multiple Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Integrases

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Das 35 estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* submetidas à pesquisa do gene da integrase 1 (*intl1*), apenas 9 (Pa4, Pa5, Pa24, Pa25, Pa29, Pa32, Pa33, Pa34 e Pa35) se revelaram positivas (fig.6), o que indica que apenas estas possuem um ou mais integrões de classe 1.

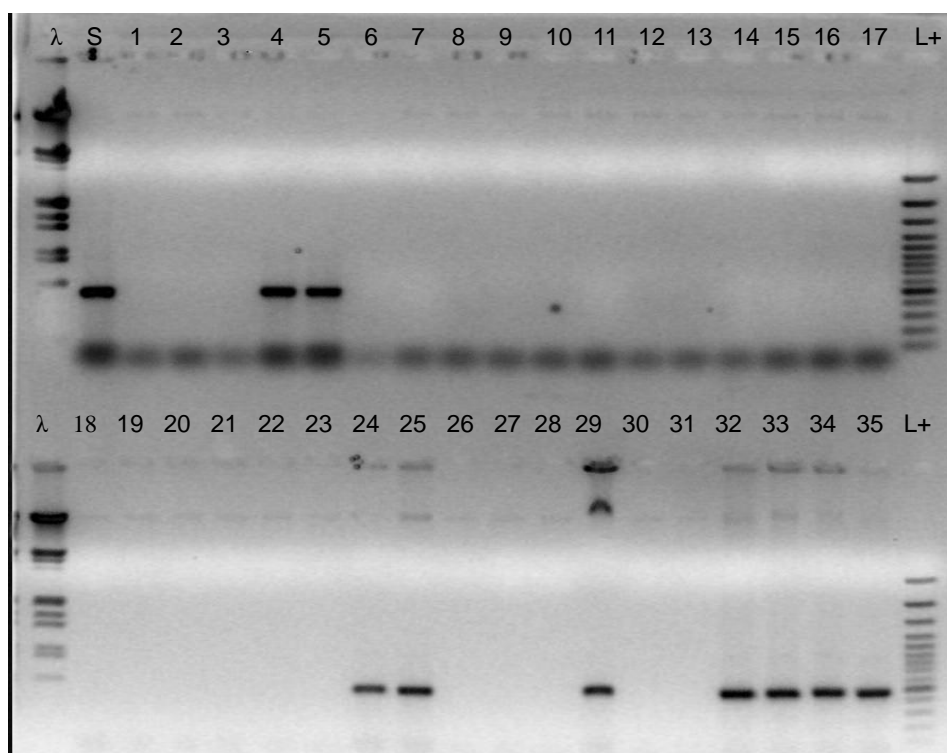


Figura 6. Imagem do gel de electroforese dos produtos de PCR do gene *intl1* nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. λ: marcador Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker; L+: marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus, S: *Salmonella typhimurium* DT 104 (9616368); 1-35: estirpes Pa1-Pa35 de *P. aeruginosa* submetidas a PCR.

Nenhuma das estirpes de *P. aeruginosa* amplificou os genes *intl2* (fig.7) e *intl3* (fig.8), o que indica que não possuem integrões de classe 2 nem de classe 3.

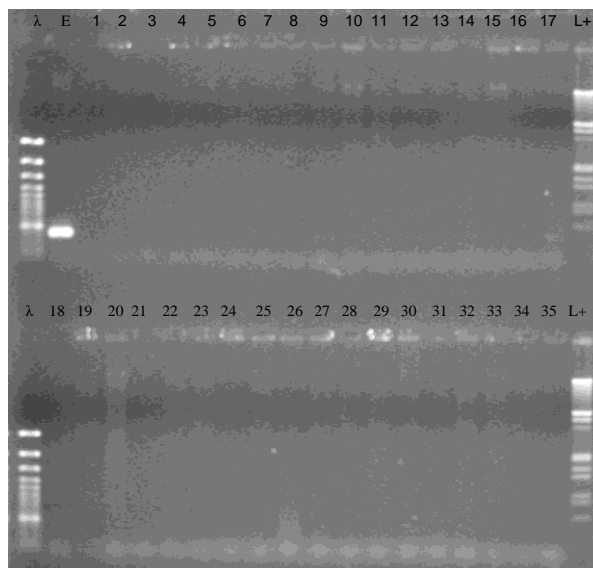


Figura 7. Imagem do gel de electroforese dos produtos de PCR do gene *intI2* nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. λ: marcador Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker; L+: marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus, E: *E. coli* transformada; 1-35: estirpes Pa1-Pa35 de *P. aeruginosa* submetidas a PCR.

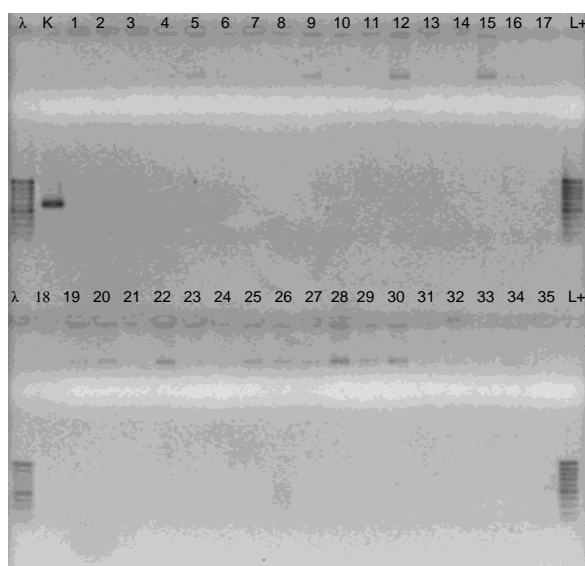


Figura 8. Imagem do gel de electroforese dos produtos de PCR do gene *intI3* nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. λ: marcador Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker; L+: marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus, K: *K. pneumoniae* FFUL22K; 1-35: estirpes Pa1-Pa35 de *P. aeruginosa* submetidas a PCR.

Todas as estirpes de *P. aeruginosa* usadas neste estudo apresentam resistência a múltiplos antibióticos, pelo que a ausência de integrões na maioria delas indica que essa resistência se deve a outros mecanismos, tais como a impermeabilidade celular, mutações ou bombas de efluxo. Efectivamente, num estudo anterior realizado com as mesmas estirpes, Ferreira (2005) verificou que as estirpes Pa1, Pa3, Pa5, Pa24 e Pa30 possuem bombas de efluxo activas e que as estirpes Pa1, Pa4, Pa5, Pa6, Pa9, Pa11, Pa17, Pa24, Pa29, Pa30, Pa31, Pa33, Pa34 e Pa35 possuem mutações que lhes conferem resistência às quinolonas. Possivelmente possuem também outros mecanismos de resistência codificados por genes não associados a elementos móveis do tipo dos integrões que lhes conferem resistência a outros grupos de antibióticos.

Barlow e colaboradores (2004) também verificaram que muitos isolados podem apresentar resistência a antibióticos não possuindo as correspondentes cassetes de genes nos integrões caracterizados, sugerindo que essas resistências seriam codificadas por outros elementos que não integrões.

A presença de integrões em isolados clínicos é motivo de preocupação, dada a sua capacidade de capturar mais cassetes de genes, conferindo ao seu hospedeiro o potencial de adquirir resistência a uma ampla gama de antibióticos, já que existem cassetes de genes para praticamente todas as classes de antibióticos (Jones *et al.*, 2003). Contudo, nas estirpes em estudo, e ao contrário do afirmado por Leverstein van-Hall e colaboradores (2003) e por Severino e Magalhães (2002), a presença de integrões não parece estar directamente relacionada com o fenótipo de resistência que as estirpes apresentam. Por exemplo, a estirpe Pa18 é resistente a vinte e um antibióticos diferentes e não apresenta qualquer integrão, enquanto a estirpe Pa34, que é resistente a apenas oito antibióticos, apresenta um integrão de classe 1.

Livermore (2003) defende que a importância dos integrões não deve ser sobreposta relativamente à dos outros veículos de resistência, uma vez que muitos genes de resistência não são encontrados em integrões e que a composição dos integrões é mais estável ao longo do tempo do que o que seria de esperar. Os resultados obtidos neste trabalho vão de encontro ao sugerido por este autor.

1.2. *Brevibacterium* spp.

Das nove estirpes de *Brevibacterium* submetidas à pesquisa dos genes das integrases, apenas a estirpe DSM 20660^T (*B. epidermidis*) se revelou positiva para o gene *intl1* (fig.9). Para o gene *intl2* (fig.10) revelaram-se positivas as estirpes DSM 20660^T (*B. epidermidis*), CCUG 23846 (*B. linens*), CCUG 23896 (*B. linens*), DSM 20657^T (*B. casei*) e DSM 20626^T (*B. iodinum*).

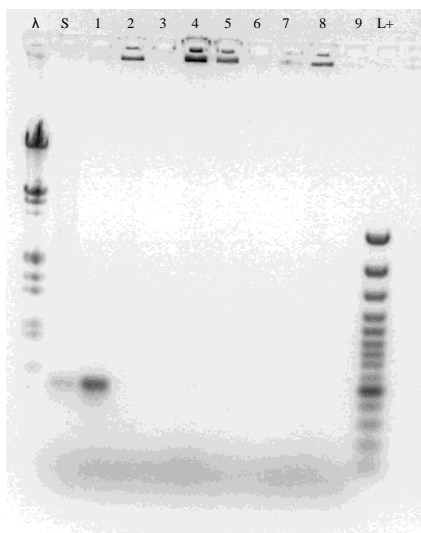


Figura 9. Imagem do gel de electroforese dos produtos de PCR do gene *intl1* dos isolados de *Brevibacterium*. λ: marcador Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker; L+: marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus, S: *S. typhimurium* DT 104 (9616368); 1-9: estirpes DSM 20660^T, CCUG 12168, ATCC 19391, LMG 2201, DSM 20658, CCUG 23846, DSM 20657^T, DSM 20626^T e CCUG 23896, respectivamente.

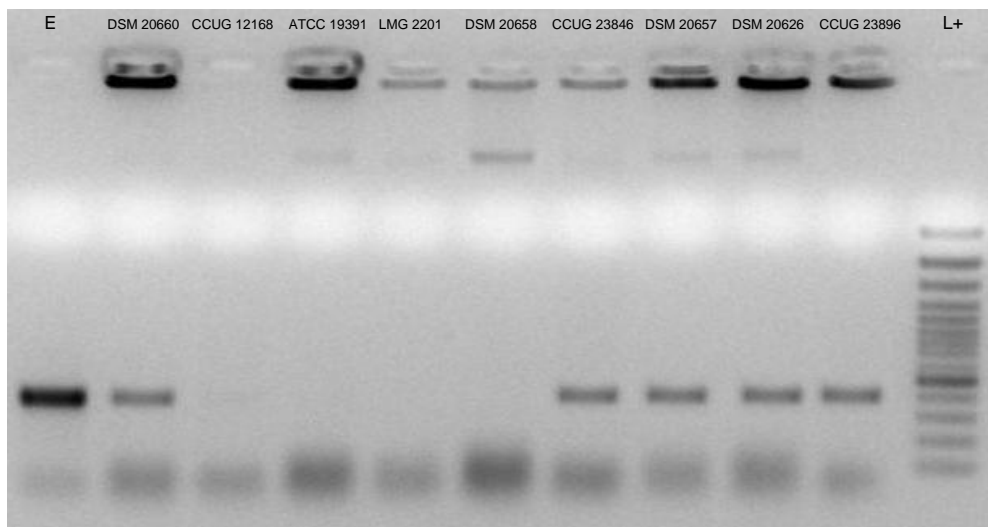


Figura 10. Imagem do gel de electroforese dos produtos de PCR do gene *intI2* dos isolados de *Brevibacterium*. E: *E. coli* transformada; DSM 20660^T, CCUG 12168, ATCC 19391, LMG 2201, DSM 20658, CCUG 23846, DSM 20657^T, DSM 20626^T e CCUG 23896: estirpes de *Brevibacterium*; L+: marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus.

Das estirpes de *Brevibacterium* em estudo, apenas a estirpe DSM 20660^T foi isolada a partir de humanos. A estirpe CCUG 23846 foi isolada de detritos de aves e as restantes foram isoladas de lacticíneos. Este facto está de acordo com o que já foi descrito para outros géneros de bactérias, em que foram encontrados integrões tanto em isolados ambientais como em isolados clínicos (Quinteira *et al.*, 2005a; Holmes *et al.*, 2003).

Este é o primeiro registo de um integrão de classe 1 em *B. epidermidis* e de integrões de classe 2 em *B. epidermidis*, *B. linens*, *B. casei* e *B. iodinum*. No GenBank encontram-se apenas depositadas algumas sequências de integrase de *B. linens* BL2 (número de acesso: ZP_00380988, ZP_00380410, ZP_00380235, ZP_00378391, ZP_00378134, ZP_00377833 e ZP_00377825), não havendo qualquer referência à restante estrutura do integrão.

A existência de poucos estudos com integrões em *Brevibacterium* pode dever-se ao facto de os membros deste género só recentemente terem começado a ser associados a doença em humanos e não representarem motivo de preocupação a nível hospitalar.

Num estudo anterior com estas estirpes de *Brevibacterium* (Santos, 2001) foi testada a sua susceptibilidade a antimicrobianos e verificou-se que todas apresentavam resistência a vários dos antimicrobianos testados. Todas as estirpes eram resistentes a ácido nalidíxico, aztreonamo, fosfomicina, furazolidona e sulfametoxazol+trimetoprim. Assim, também nestas estirpes é de admitir a existência de mecanismos de resistência não associados a elementos móveis do tipo dos integrões, dados os fenótipos de resistência observados quando comparados com a presença de integrases.

2. Regiões variáveis dos integrões de classe 1

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Os isolados de *P. aeruginosa* positivos para o gene da integrase 1, quando submetidos a PCR para amplificação das suas regiões variáveis, revelaram duas classes de tamanhos. Os isolados Pa4, Pa5, Pa24, Pa25 e Pa29 apresentaram um produto de amplificação de cerca de 3 kb e os isolados Pa32, Pa33, Pa34 e Pa35 apresentaram um produto de cerca de 2 kb (fig.11).

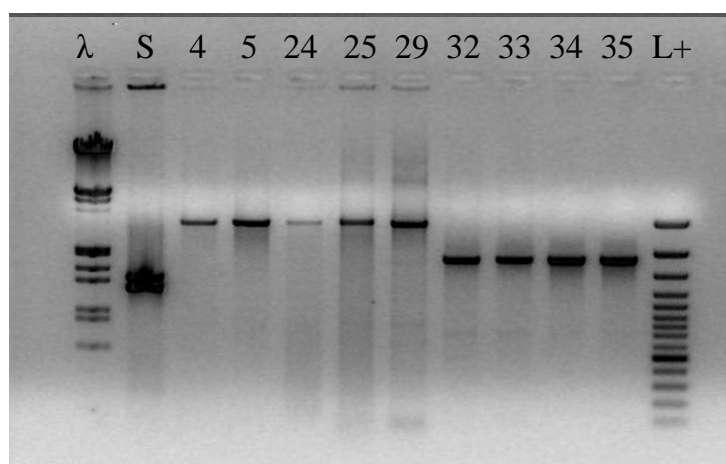


Figura 11. Imagem do gel de electroforese dos produtos de PCR das regiões variáveis dos integrões de classe 1 nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. λ : marcador Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker; L+: marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus, S: *S. typhimurium* DT 104 (9616368); 4, 5, 24, 25, 29, 32, 33, 34 e 35: estirpes Pa de *P. aeruginosa* submetidas a PCR.

Resultados anteriores (Ferreira, 2005) de tipagem molecular destes isolados por electroforese em campo pulsado (PFGE) indicaram que as estirpes Pa4 e Pa5 são clones, o mesmo acontecendo com as estirpes Pa32, Pa33, Pa34 e Pa35. A tipagem por Box indicou que as estirpes Pa24 e Pa25 e as estirpes Pa32 e Pa33 são clones. O dendrograma combinado construído com base nos padrões de bandas obtidos nestes dois métodos de tipagem revelou que apenas as estirpes Pa32 e Pa33 são consideradas clones.

As estirpes Pa4 e Pa5 foram obtidas do mesmo paciente. As estirpes Pa30, Pa31, Pa34 e Pa35 foram isoladas do mesmo produto biológico, do mesmo paciente, na data de admissão. O mesmo aconteceu para as estirpes Pa1 e Pa3 e para as estirpes Pa10, Pa11 e Pa12. Isto sugere que os pacientes estavam colonizados por mais de um genótipo na altura da admissão. Este facto indica a ampla disseminação de *P. aeruginosa* fora do ambiente hospitalar (Ferreira, 2005).

As estirpes Pa32 e Pa33 foram isoladas de pacientes diferentes admitidos no mesmo dia em serviços diferentes, o que sugere a ocorrência de contaminação cruzada (Ferreira, 2005).

A ocorrência de integrões de tamanho idêntico em estirpes genotípicamente diversas já foi anteriormente registada por outros autores (Gombac *et al.*, 2002; Martinez-Freijo *et al.*, 1999)

Foram determinadas as sequências nucleotídicas dos produtos de amplificação das regiões variáveis dos integrões de classe 1 das estirpes Pa5 e Pa24 (fig.12) e das estirpes Pa32 e Pa35 (fig.13) de *P. aeruginosa*.

```

1 GGCAGGCGGT TTCATGGCTT GTTTGACTGT TTTTTGTAC AGTCTATGCC TCGGGCATCC
      intl1←
61 AAGCAGCAAG CGCGTTACGC CGTGGGTCGA TGTTTGATGT TATGGAGCAG CAACGATGTT
      attI1
121 ACGCAGCAGG GCAGTCGCCC TAAAACAAAG TTAGGCATCA CAAAGTACAG CAGCATCATA
      59-be
181 TAGTAATTTA GCGCAAGCTA TTGTTTTAAA ATGACTTGTT AACGGGAAGC GCTGATTGCC
      → aacA4
241 ATTGTAATCC CAATATTCTC CATTTTGAGT ATCAAGAACG GAAACACCTA TACGAGCAGA

```

301 AAGAGAACT TCAATTGCCT TAACGTCTTG TTCAACTTGC TGAAACTTTG AACTACTTGC

361 AAAAACCACG GATGGTATTA AAAGCGAAAA TGCCAATAAA AACTTCATGT AAGTAACCCC

421 ATAATTTTGA TTGTCACACA TTTTATATAA AAGCATGAGG CTCCATAATA TGGCTAACGT

481 TTGACATGAG GGGCGGCCAA GGGCGCCAGC CTTGGACGT CCCCCTCGAT GGAAGGGTTA

541 GGCAACACTG CGTGTTCGCT CGAATGCCTG GCGTGTTTGA ACCATGTACA CGGCTGGACC

601 ATCTGGGGTG GTTACGGTAC CTTGCCTCTC AAACCCCGCT TTCTCGTAGC ATCGGATCGC

661 TCGCAAGTTG CTCGGCGACG GGTCCGTTTG GATCTTGGTG ACCTCGGGAT CATTGAACAG
59-be

721 CAACTCAACC AGAGCTCGAA CCAGCTTGGT TCCCAAGCCT TTGCCAGTT GTGATGCATT

781 CGCCAGTGAC TGGTCTATTC CGCGTACTCC TGGATCGTT TCTTCTTCCC ACCATCCGTC
→ **blaP1b**

841 CCCGCTTCCA AGAGCAACGT ACGACTGGGC ATACCCAATC GGCTCTCCAT TCAGCATTGC

901 AATGTATGGA GTGACGGACT CTTGCGCTAA AACGCTTGGC AAGTACTGTT CCTGTACGTC

961 AGCAAGTGTC GGGCGTGCTT CTTCTCCGCC CCACCACTCG ACGATATGAG ATCGATTTAG

1021 CCACTCATAG AGCATCGCAA GGTCATGCTC AGTCATGAGG CGCAGTGTGA CGGAATCGTT

1081 GCTGTTGGTC ACGATGTCTT CTCCTTTTCT TTAAATCCGC CGTGAAGTTC TAATGCCTAA

1141 CGCCGAAGTT CAGCCGCCAG AACGGAGCGC AGCGGAGTGA TGGTCGGCTG CAACTTCATG

1201 TTATGCCGCA TCTGCCTGCT ACTCAACGAC TGAGCGATTT GTGTGCGCTT TTACAACATT

1261 CGTTGTGTGC TTGAGCAAGT CTAGACCGCC CGGCAGGCCG TGCCCCGGAA TGACGAACTG

1321 TGCTTCCGGG TAGTGTTGTT GAATCCGCTC AATGGAGGTG GGCCATTCAG CCAGATCGGC

1381 ATCGGCCACG TTCCCCGCAG ACGTGCGTGA CAACTCATAA ATCGCACAAAC CACCATAGAG

1441 CAACTCGCA GACGGGACGT ACACAATAA GTTGTGCGTC GAATGCGCAG CACCAGGATA

1501 GAAGAGTTCT ACTGGACCGA AGCGCACTGC GTCCCCGCTC GATGAGAGTC CTTCTAGAGA

1561 GTGCGTGGGA ATCTCGTTCC CCTCTACCTC GGCTAGCCGG CGTGTGACG GTGATGCGTA

1621 CGTTGCCACC CCAGCCGCC GAAGGACATC AACGCCGCC ACGCGGTCGT CATGAAGTG
59-be

1681 CGTGGAGACT GCACGCGTTA CAGGAAGTCC AATTGCTTC TCAATCTCCG CGAGAAGTGC

1741 CGCTGTGTTT TTCGCACCCC ACGCTGTATC AATCAAAGC AACTCATCAC CATCACGGAC

1801 AATGAGACCA TTGGACGGGT AGACTGCGCC ATCAAACGAC TGC GTTGCGA TATGCGACCA
→aadA2

1861 AACACCATCG GCAATCTGGT AAAGCCGGAC CTCCCCGACC GGAATTCGC TGACTGTCGG

1921 ATACTACCG CTAGAATCTA CGGAAAAGC GAGCGGACTC GCAATAGCCA TGATAGACGC

1981 GGTCAAATAG ACCAATAACT TACTCAAAG TTTGAACATC AAAACTCCAT GGGGGTGAGT

2041 GCGGCATAAC TTTGTTTTAG GGCGACTGCC CTGCTGCGTA ACATCGTTGC TGCTCCATAA

2101 CATCAAACAT CGACCCACGG CGTAACGCGC TTGCTGCTTG GATGCCCGAG GCATAGACTG

2161 TACAAAAAA CAGTCATAAC AAGCCATGAA AACCGCCACT GCGCCGTTAC CACCGCTGCG

2221 TTCGGTCAAG GTTCTGGACC AGTTGCGTGA GCGCATACGC TACTTGCATT ACAGCTTACC

2281 AACCGAACAG GCTTATGTCC ACTGGGTTTCG TGCCTTCATC CGTTTCCACG GTGTGCGTCA

2341 CCCGGCAACC TTGGGCAGCA GCGAAGTCGA GGCATTTCTG TCCTGGCTGG CGAACGAGCG

2401 CAAGGTTTCG GTCTCCACGC ATCGTCAGGC ATTGGCGGCC TTGCTGTTCT TCTACGGCAA

2461 GTGCTGTGC ACGGATCTGC CCTGGCTTCA GGAGATCGGA AGACCTCGGC CGTCGCGGCG

2521 CTTGCCGGTG GTGCTGACCC CGGATAGAAG ATCACTTGGC CTCACGCGCA GATCACTTGG

2581 AAGAATTTAT TCGCTTTGTG AAAGGCGAGA TCATCAAGTC AGTTGGTAAA TGATGTCTAA

2641 CAATTCGTTT AAGCCGACCG CGCTACGCGC GCGCGCTTAA CTCCGGCGTT AGATGCACTA
59-be → qacEΔ1

2701 AGCACATAAT TGCTCACAGC CAAACTATCA GGTCAAGTCT GCTTTTATTA TTTTAAAGCG

2761 TGCATAATAA GCCCTACACA AATTGGGAGA TATATCATGA AAGGCTGGCT TTTTCTTGTT

2821 ATCGCAATAG TTGGCGAAGT ATCGCACTCC C

Figura 12. Sequência nucleotídica dos integrões das estirpes Pa5 e Pa24. Os códons de iniciação e de terminação estão assinalados a verde e a vermelho, respectivamente. As setas indicam a orientação da tradução dos genes assinalados. Os locais de recombinação estão sublinhados.

1 ACGGCGCAGT GGCGGTTTT**C AT**GGCTTGTT ATGACTGTTT TTTTGTACAG TCTATGCCTC
intl1 ←

61 GGGCATCCAA GCAGCAAGCG CGTTACGCCG TGGTTCGATG TTTGATGTTA TGGAGCAGCA
attI1

121 ACGATGTTAC GCAGCAGGGC AGTCGCCCTA AAACAAAGTT AACCCCTAAG GAAGTATCGT
59-be

181 GAAACTATCA CTA**ATG**GCAG CAATTTGAA GAATGGAGTT ATCGGAAATG GCCCAGATAT
 → *dhfrI*

241 TCCATGGAGT GCCAAAGGGG AACAACTACT CTTCAAAGCG ATTACCTATA ATCAGTGGCT

301 TTTGGTAGGC CGAAAGACTT TCGAGTCAAT GGGGGCTTTA CCCAACCGAA AATATGCCGT

361 TGTAECTCGT TCAAGCTTCA CTTCCAGTGA TGAGAATGTA TTGGTATTTT CATCTATCGA

421 TGAAGCGCTA AATCATCTGA AGACGATAAC GGATCATGTG ATTGTGTCTG GTGGTGGTGA

481 AATATACAAA AGCCTGATCG ATAAAGTTGA TACTTTACAT ATTTCAACAA TCGACATTGA

541 GCCAGAAGGT GATGTCTATT TTCCAGAAAT CCCAGTAGT TTTAGGCCAG TTTTATGCCA

601 AGACTTCGTG TCTAACATAA ATTATAGTTA CCAAATCTGG CAAAAGGGT **AA**CAAGTGGC
59-be

661 AGCAACTGAC CGCCAAAAGT GTCACTTGTT TTGCCAAAAA GCCGGCAAAA CAAGCGCCAA

721 TTTTGTGCGC AGCTGTGCCA GGCGTTAAAC ATC**ATG**AGGG AAGCGGTGAT CGCCGAAGTA
 → *aadA2*

781 TCGACTCAAC TATCAGAGGT AGTTGGCGTC ATCGAGCGCC ATCATCTCGA ACCGACGTTG

841 CTGGCCGTAC ATTTGTACGG CTCCGCAGTG GATGGCGGCC TGAAGCCACA CAGTGATATT

901 GATTTGCTGG TTACGGTGAC CGTAAGGCTT GATGAAACAA CGCGGCGAGC TTTGATCAAC

961 GACCTTTTGG AACTTCGGC TTCCCCTGGA GAGAGCGAGA TTCTCCGCGC TGTAGAAGTC
1021 ACCATTGTTG TGCACGACGA CATCATTCCG TGGCGTTATC CAGCTAAGCG CGAACTGCAA
1081 TTTGGAGAAT GGCAGCGCAA TGACATTCTT GCAGGTATCT TCGAGCCAGC CACGATCGAC
1141 ATTGATCTGG CTATCTTGCT GACAAAAGCA AGAGAACATA GCGTTGCCTT GGTAGGTCCA
1201 GCGGCGGAGG AACTCTTTGA TCCGGTTCCT GAACAGGATC TATTTGAGGC GCTAAATGAA
1261 ACCTTAACGC TATGGAAGCT GCCGCCGAC TGGGCTGGCG ATGAGCGAAA TG TAGTGCTT
1321 ACGTTGTCCC GCATTTGGTA CAGCGCAGTA ACCGGCAAAA TCGCGCCGAA GGATGTCGCT
1381 GCCGACTGGG CAATGGAGCG CCTGCCGGCC CAGTATCAGC CCGTCATACT TGAAGCTAGA
1441 CAGGCTTATC TTGGACAAGA AGAAGATCGC TTGGCCTCCC GCGCAGATCA GTTGAAGAA
1501 TTTGTTCACT ACGTGAAAGG CGAGATCACC AAGGTAGTCG GCAAAT**TA**TG TCTAACAATT
59-be
1561 CGTTCAAGCC GACGCCGCTT CGCGGCGCGG CTTAACTCAA GCGTTAGATG CACTAAGCAC
1621 ATAATTGCTC ACAGCCAAAC TATCAGGTCA AGTCTGCTTT TATTATTTTT AAGCGTGCAT
1681 AATAAGCCCT ACACAAATTG GGAGATATAT CATGAAAGGC TGGCTTTTTTC TTGTTATCGC
→ *qacEΔ1*
1741 AATAGTGGCG AAGNATCGCA CTC

Figura 13. Sequência nucleotídica dos integrões das estirpes Pa32 e Pa35. Os códons de iniciação e de terminação estão assinalados a verde e a vermelho, respectivamente. As setas indicam a orientação da tradução dos genes assinalados. Os locais de recombinação estão sublinhados.

A análise das sequências obtidas permite afirmar que nas regiões variáveis dos integrões das estirpes Pa5 e Pa24, esquematizados na figura 14, se encontram os genes *aacA4* (que confere resistência a aminoglicosídeos), *blaP1b* (que confere resistência a β -lactâmicos) e *aadA2* (que confere resistência a estreptomicina e espectinomicina).

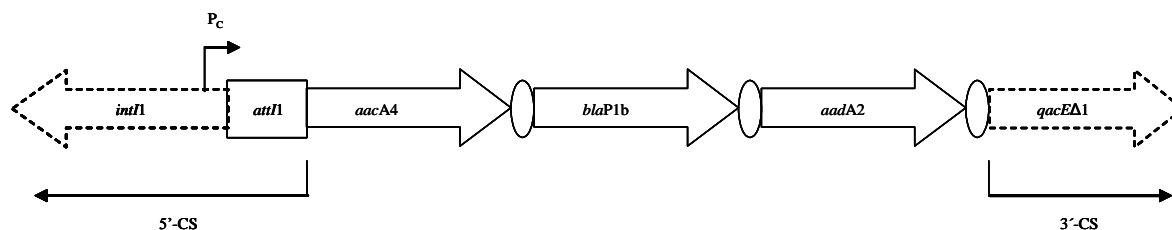


Figura 14. Representação esquemática da estrutura dos integrões de classe 1 das estirpes Pa5 e Pa24.

Estes resultados mostram que nas estirpes Pa5 e Pa24, diferenças no fenótipo de resistência não são acompanhadas de diferenças a nível dos genes contidos no integrão, o que comprova a existência de outros mecanismos de resistência para além dos integrões. Os genes contidos na região variável destes integrões conferem vantagem selectiva a estas estirpes no ambiente hospitalar, que é aumentada pelas mutações e bombas de efluxo já descritas para estas estirpes.

Nos integrões, os genes para β -lactamases normalmente são adjacentes de determinantes de resistência a aminoglicosídeos, sendo mais frequentes os genes dos tipos *aac* e *aad* (Weldhagen, 2004; Livermore, 2002), o que de facto se observa nos integrões das estirpes Pa5 e Pa24.

O uso frequente de β -lactâmicos e aminoglicosídeos em humanos pode ter contribuído para a presença simultânea de cassetes de genes que codificam para β -lactamases e para enzimas modificadoras de aminoglicosídeos no mesmo integrão (Toleman *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2000). Contudo, outros nichos ecológicos onde os antibióticos são usados em larga escala, nomeadamente em animais para produção de alimentos, podem também contribuir como fonte e/ ou reservatório de integrões portadores de genes de resistência (Maynard *et al.*, 2003)

A sequência das cassetes de genes encontrada nestes integrões reflecte a integração de cassetes acompanhando a evolução da pressão selectiva da utilização de antibióticos no ambiente hospitalar, uma vez que a cassette mais próxima do *attI1* confere resistência para um grupo de antibióticos mais recente e

a cassette mais afastada confere resistência a um antibiótico que já foi muito utilizado mas cuja utilização tem vindo a diminuir a nível hospitalar.

O facto de existirem estirpes diferentes com a mesma sequência de cassetes de genes inseridas na região variável dos seus integrões é indicativo da aquisição por estas estirpes do integrão completo, tal como se apresenta, a partir de estirpes que tenham vindo a acumular resistência ao longo do tempo por pressão selectiva dos regimes de terapêutica antimicrobiana, como defendem vários autores (Gombac *et al.*, 2002; Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Martinez-Freijo *et al.*, 1999). Pode também ter ocorrido a diferenciação das estirpes após a aquisição do integrão (Gombac *et al.*, 2002).

A estabilidade do arranjo das cassetes de genes dos integrões durante ou após a exposição do organismo a antibióticos continua por determinar e pode revelar-se útil para a compreensão do papel desempenhado pelos antibióticos na evolução e possível futuro controlo destas estruturas genéticas no ambiente nosocomial (Weldhagen, 2004).

Embora por várias vezes tenha sido demonstrada a mobilização de cassetes de genes, a estabilidade da estrutura dos integrões é apoiada pelo facto de se encontrarem combinações de cassetes de genes conservadas em isolados de diferentes origens, ou pela sua permanência em bactérias sujeitas por longos períodos de tempo à pressão de antibióticos (Maguire *et al.*, 2001; Martinez-Freijo *et al.*, 1999).

No caso dos integrões das estirpes Pa32 e Pa35, esquematizados na figura 15, a determinação da sequência nucleotídica revelou igualmente que as suas regiões variáveis eram idênticas, contendo os genes *dhfrI* (que confere resistência a trimetoprim) e *aadA1* (que confere resistência a estreptomicina e espectinomicina). A estrutura do integrão vem apoiar o facto de estas estirpes serem consideradas clones por PFGE.

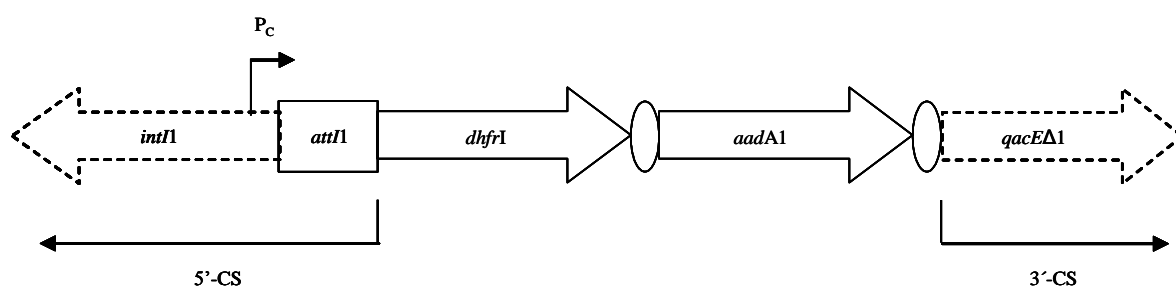


Figura 15. Representação esquemática da estrutura dos integrões de classe 1 das estirpes Pa32 e Pa35.

As estirpes Pa32 e Pa35 são resistentes a vários antibióticos e o seu integrão possui apenas os genes para a resistência ao trimetoprim, para os quais as bactérias do género *Pseudomonas* apresentam resistência inata, e para a resistência à espectinomicina/estreptomicina, cujo uso hospitalar tem diminuído ao longo do tempo. Assim, é de supor que a resistência destas estirpes se deva principalmente a qualquer outro mecanismo.

O facto de os genes contidos neste integrão não conferirem qualquer vantagem selectiva a estas estirpes no ambiente hospitalar sugere a sua aquisição através da cadeia alimentar (Barlow *et al.*, 2004).

Contudo, ao adquirirem este integrão, as estirpes passam a dispor de um elemento genético que lhes dá a possibilidade de capturarem outras cassetes de genes que existam livres na natureza e que as favoreçam do ponto de vista da resistência aos antibióticos, o que representa uma vantagem adicional.

O facto de os integrões de cada classe de tamanhos, descritos neste estudo, apresentarem as mesmas sequências promotoras e os mesmos genes inseridos, está de acordo com o anteriormente verificado por Martinez-Freijo e colaboradores (1999) num estudo efectuado com estirpes de espécies diferentes e diferentes origens geográficas, sugerindo que a transferência do integrão completo ocorre mais frequentemente do que a simples mobilização de uma cassete de gene pela integrase. Contudo, Severino e Magalhães (2002), analisando os padrões de restrição de alguns integrões de tamanho semelhante, verificaram que os genes contidos nestes integrões não eram idênticos.

Todos os integrões descritos neste estudo apresentam um gene *aad*, o que está de acordo com o descrito por Fluit e Schmitz (2004) para os integrões de classe 1 presentes em isolados bacterianos causadores de infecções em humanos.

2.2. *Brevibacterium* spp.

O isolado de *B. epidermidis* positivo para o gene da integrase 1, quando submetido a PCR para amplificação da sua região variável, revelou um produto de amplificação de cerca de 1.2 kb (fig.16), cuja sequência nucleotídica foi determinada (fig.17).

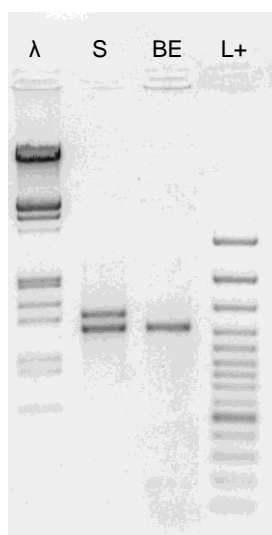


Figura 16. Imagem do gel de electroforese para o produto de PCR da região variável do integrão de classe 1 de *B. epidermidis*. λ: marcador Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker; L+: marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder Plus, S: *S. typhimurium* DT 104 (9616368); BE: *B. epidermidis* DSM 20660^T.

```

1 GGTGGTAAC GCGCAGTGG CGGTTTTCAT GGCTTGTTAT GACTGTTTTT TTGTACAGTC
                                intI1←
61 TATGCCTCGG GCATCCAAGC AGCAAGCGCG TTACGCCGTG GGTCGATGTT TGATGTTATG
                                                attI1

```

121 GAGCAGCAAC GATGTTACGC AGCAGGGCAG TCGCCCTAAA ACAAAGTTAG ACATC**ATG**AG
59-be → *aadA2*

181 GGTAGCGGTG ACCATCGAAA TTTCGAACCA ACTATCAGAG GTGCTAAGCG TCATTGAGCG

241 CCATCTGGAA TCAACGTTGC TGGCCGTGCA TTTGTACGGC TCCGCAGTGG ATGGCGGCCT

301 GAAGCCATAC AGCGATATTG ATTTGTTGGT TACTGTGGCC GTAAAGCTTG ATGAAACGAC

361 GGC GGCGAGC ATTGCTCAAT GACCTTATGG AGGCTTCGGC TTTCCCTGGC GAGAGCGAGA

421 CGCTCCGCGC TATAGAAGTC ACCCTTGTGC TGCATGACGA CATCATCCCG TGGCGTTATC

481 CGGCTAAGCG CGAGCTGCAA TTTGGAGAAT GGCAGCGCAA TGACATTCTT GCGGGTATCT

541 TCGAGCCAGC CATGATCGAC ATTGATCTAG CTATCCTGCT TACAAAAGCA AGAGAACATA

601 GCGTTGCCTT GGTAGGTCCG GCAGCGGAGG AATTCTTTGA CCCGGTTCCT GAACAGGATC

661 TATTCGAGGC GCTGAGGGAA ACCTTGAAGC TATGGAAGTC GCAGCCCGAC TGGGCCGGCG

721 ATGAGCGAAA TGTAGTGCTT ACGTTGTCCC GCATTTGGTA CAGCGCAATA ACCGGCAAAA

781 TCGCGCCGAA GGATGTCGCT GCCGACTGGG CAATAAACG CCTACCTGCC CAGTATCAGC

841 CCGTCTTACT TGAAGCTAAG CAAGCTTATC TGGGACAAAA AGAAGATCAC TTGGCCTCAC

901 GCGCAGATCA CTTGGAAGAA TTTATTCGCT TTGTGAAAGG CGAGATCATC AAGTCAGTTG

961 GTAA**TGA**TG TCTAACAATT CGTTCAAGCC GACCGCGCTA CGCGCGGCGG CTTAACTCCG
59-be

1021 GCGTTAGATG CACTAAGCAC ATAATTGCTC ACAGCCAAAC TATCAGGTCA AGTCTGCTTT

1081 TATTATTTTT AAGCGTGCAT AATAAGCCCT ACACAAATTG GGAGATATAT C**ATG**AAAGGC
→qacEA1

1141 TGGCTTTTTT TTGTTATCGC AATAGTTGGC GAAGTAATCG CAACATGCCG CATTAAAAT

Figura 17. Sequência nucleotídica do integrão de classe 1 de *B. epidermidis* DSM 20660^T. Os codões de iniciação e de terminação estão assinalados a verde e a vermelho, respectivamente. As setas indicam a orientação da tradução dos genes assinalados. Os locais de recombinação estão sublinhados.

A análise da sequência revelou que na região variável desse integrão, esquematizado na figura 18, se encontra inserida apenas uma cassete com o gene *aadA2* (que confere resistência a estreptomicina e espectinomicina).

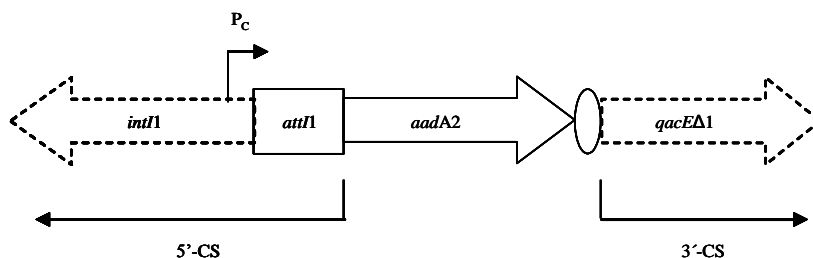


Figura 18. Representação esquemática da estrutura do integrão de classe 1 encontrado na estirpe *B. epidermidis* DSM 20660^T.

Este integrão deve ser muito primitivo, uma vez que apenas possui uma cassete de gene inserida e que codifica para antibióticos não muito utilizados em humanos, não lhes conferindo por isso qualquer vantagem selectiva no ambiente hospitalar, mas que continuam a ser utilizados na agricultura, o que sugere a sua possível aquisição através de contacto directo com animais ou através da cadeia alimentar como foi sugerido, entre outros autores, por Barlow e colaboradores (2004), que detectaram integrões em estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de bovinos e também por Nandi e colaboradores (2004) com várias espécies isoladas de detritos de aves.

Sendo *B. epidermidis* um habitante normal da flora microbiana da pele humana e não havendo nenhum registo de doença humana causada por esta espécie, a mesma não está sujeita à pressão selectiva de antibióticos, pelo que não é de estranhar que não possua no integrão qualquer cassete que confira resistência a antibióticos de utilização mais recente, a nível hospitalar. Possivelmente este integrão foi adquirido conjuntamente com outro elemento genético móvel que possa conferir alguma vantagem selectiva à estirpe, como por exemplo o integrão de classe 2 que esta estirpe aparentemente também possui. Situação semelhante já foi observada, por exemplo, em *E. coli* e *Proteus* spp. (Barlow *et al.*, 2004; Goldstein *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001)

Num estudo anterior (Santos, 2001) foi verificado que esta estirpe apresentava resistência a sete dos vinte e dois antibióticos testados, pelo que é de admitir que possui mecanismos de resistência que não foram identificados.

3. Regiões variáveis dos integrões de classe 2

3.1. *Brevibacterium* spp.

Apesar de terem sido testadas várias condições, não foi possível amplificar a região variável dos integrões de classe 2 das estirpes de *Brevibacterium* que se revelaram positivas para o gene *intl2*. Barlow e colaboradores (2004) relataram uma situação idêntica, em que não foi possível amplificar por PCR as regiões variáveis em organismos que possuíam integrões de classes 1 e 2.

Isto pode dever-se ao facto de essas regiões serem grandes demais para serem amplificadas pelas técnicas convencionais de PCR, ou ainda ao facto de estes integrões não possuírem a *orfX* geralmente associada a esta classe, o que impossibilitaria o emparelhamento do oligonucleótido hep51.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e aqui apresentados permitem tirar algumas conclusões relativamente aos integrões encontrados em isolados clínicos e ambientais:

1. A resistência de bactérias a antibióticos não é exclusivamente devida à presença de integrões.
2. Integrões da mesma classe com tamanho semelhante possuem os mesmos genes inseridos na sua região variável, independentemente da origem da estirpe portadora.
3. Os integrões encontram-se disseminados na comunidade e podem ser transferidos horizontalmente, não tendo sido possível determinar a sua origem.
4. A presença de integrões em isolados hospitalares e ambientais nem sempre confere vantagem selectiva às estirpes que os possuem.

BIBLIOGRAFIA

Alves, A., O. Santos, I. Henriques e A. Correia. 2002. Evaluation of methods for molecular typing and identification of members of the genus *Brevibacterium* and other related species. *FEMS Microbiology Letters*. **213**: 205-211.

Antoniou, S., A. Dimitriadis, F. Polydorou, e E. Malaka. 1997. *Brevibacterium iodinum* peritonitis associated with acute urticaria in a CAPD patient. *Perit. Dial. Int.* **17**:614–615.

Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato e M. Ohta. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **39**: 1612-1615.

Barlow, R. S., J. M. Pemberton, P. M. Desmarchelier e K. S. Gobius. 2004. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **48**: 838-842.

Biskri, L. e D. Mazel. 2003. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **47**: 3326-3331.

Breed, R.S. 1953. The families developed from *Bacteriaceae* Cohn with a description of the family *Brevibacteriaceae*. *Riass Commun VI Int. Congr. Microbiol. Roma.* **1**: 10-15.

Brooks, G. F., J. S. Butel e S.A. Morse. 2001. *Medical Microbiology*, 22nd Edition, McGraw-Hill of Portugal, pp. 229-231.

Cai, J. e M. D. Collins. 1994. Phylogenetic analysis of species of the meso-diaminopimelic acid-containing genera *Brevibacterium* and *Dermabacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 583-585.

Canton R., T. M. Coque e F. Baquero. 2003. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**: 315-325.

Castagnola, E., M. Conte, P. Venzano, A. Garaventa, C. Viscoli, M. A. Barretta, L. Pescetto, L. Tasso, M. Nantron, C. Milanaccio, and R. Giacchino. 1997. Broviac catheter-related bacteraemias due to unusual pathogens in children with cancer: case reports with literature review. *J. Infect.* **34**: 215–218.

Chiew, Y. F., S. F. Yeo, L. M. Hall e D. M. Livermore. 1998. Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemoter.* **41**: 247-251.

Clark, C. A., L. Purins, P. Kaewrakon, T. Focareta e P. A. Manning. 2000. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology.* **146**: 2605-2612.

Collins, M. D., D. Jones, R. M. Keddie e P. H. A. Sneath. 1980. Reclassification of *Chromobacterium iodinum* (Davis) in a redefined genus *Brevibacterium* (Breed) as *Brevibacterium iodinum* nom. rev., comb. nov. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 1-10.

Collis, C. M. e R. M. Hall. 1992a. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* **6**: 2875-2885.

Collis, C. M. e R. M. Hall. 1992b. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* **174**: 1574-1585.

Collis, C. M. e R. M. Hall. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **39**: 155-162.

Collis, C. M., G. D. Recchia, M. J. Kim, H. W. Stokes, and R. M. Hall. 2001. Efficiency of recombination reactions catalyzed by the class 1 integron integrase. *Int. J. Bacteriol.* **183**: 2535-2542.

Collis, C. M., M.-J. Kim, H. W. Stokes e R. M. Hall. 2002a. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Mol. Microbiol.* **46**: 1415-1427.

Collis, C. M., M.-J. Kim, S. R. Partridge, H. W. Stokes e R. M. Hall. 2002b. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. Bacteriol.* **184**: 3017-3026.

Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M. J. Salgado, L. M. Lito, J. M. Cristino, S. Mendo e A. Duarte. 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **47**: 2838-2843.

Delissalde, F. e C. F. Amábile-Cuevas. 2004. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **24**: 405-408.

Drouin, F., J. Mélançon e P. H. Roy. 2002. The intl-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* is active as as integron integrase. *J. Bacteriol.* **184**: 1811-1815.

Ferreira, S.C.N. 2005. Caracterização genotípica e molecular de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a quinolonas. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.

Fluit, A. C. e F.-J. Schmitz. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**: 272-288.

Francia, M. V., J. C. Zabala, F. de la Cruz e J. M. Garcia Lobo. 1999. The Intl1 integron integrase preferentially binds single-stranded DNA of the *attC* site. *J. Bacteriol.* **181**: 6844-6849.

Funke, G. e A. Carlotti. 1994. Differentiation of *Brevibacterium* spp. encountered in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1729–1732.

Funke, G., A. von Graevenitz, J. E. Clarridge III e K. A. Bernard. 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:125–159.

Girlich, D., L. Poirel, A. Leelaporn, A. Karim, C. Tribuddharat, M. Fennewald e P. Nordmann. 2001. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 175-182.

Goldstein, C., M. D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A. O. Summers, D. G. White e J. J. Maurer. 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals and exotics. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **45**: 723-726.

Gombac, F., M. L. Riccio, G. M. Rossolini, C. Lagatolla, E. Tonin, C. Monti-Bragadin, A. Lavenia e L. Dolzani. 2002. Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*

from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **46**: 3665-3668.

Gonzalez, G., K. Sossa, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella e R. Zemelman. 1998. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean Hospitals. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 125-128.

Govan, J. R. W. 1993. *Pseudomonas*. In: *Microbiologia Médica*, 6ª Ed. (Collee, J. G., J. P. Duguid, A.G. Fraser e B. P. Marmion, Eds), Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp.727-746.

Gruner, E., A. G. Steigerwalt, D. G. Hollis, R. S. Weyant, R. E. Weaver, C. W. Moss, M. Daneshvar, J. M. Brown e D. J. Brenner. 1994. Human infections caused by *Brevibacterium casei*, formerly CDC groups B-1 and B-3. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1511–1518.

Gruner, E., G. E. Pfyffer e A. von Graevenitz. 1993. Characterization of *Brevibacterium* spp. from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1408–1412.

Hall, R. M. 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found. Symp.* **207**: 192-202.

Hall, R. M. e C. M. Collis. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**: 593-600.

Hall, R. M., C. M. Collis, M. J. Kim, S. R. Partridge, G. D. Recchia e H. W. Stokes. 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **870**: 68-80.

Hall, R. M., D. E. Brookes e H. W. Stokes. 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* **5**: 1941-1959.

Hansson, K., L. Sundström, A. Pelletier e P. H. Roy. 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* **184**: 1712-1721.

Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, L. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T.

Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter e C. M. Fraser. 2000. Sequence of both chromossomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. **406**: 477-483

Holmes, A. J., M. P. Holley, A. Mahon, B. Nield, M. Gillings e H. W. Stokes. 2003. Recombination activity of a distinctive integron-gene cassette system associated with *Pseudomonas stutzeri* populations in soil. *J. Bacteriol.* **185**: 918-928.

Holt, J. G., N. R. Krieg e P. H. A. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 93–168.

<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>

<http://www.bacterio.cict.fr/b/brevibacterium.html>

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1718&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Janda W. M., P. Tipirneni, R. M. Novak. 2002. *Brevibacterium casei* bacteremia and line sepsis in a patient with AIDS. *J. Infect.* **46**: 61-64.

Jo, J. T. H., F. S. L. Brinkman e R. E. W. Hancock. 2003. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **47**: 1101-1111.

Jones, D. e M. D. Collins. 1986. Irregular non-sporing Gram-positive rods. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2 (Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe e J. G. Holt, Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1261–1434.

Jones, D. e R. M. Keddie. 1986. Genus *Brevibacterium*. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2 (Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe e J. G. Holt, Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, pp.1301-1313.

Jones, L. A., C. J. McIver, W. D. Rawlinson e P. A. White. 2003. Polymerase chain reaction screening for integrons can be used to complement resistance surveillance programs. *Commun. Dis. Intell.* **27**: S103-S110.

Jones, M., E. Peters, A. Weersink, A. Fluit e J. Verhoef. 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet.* **349**: 1742-1743.

Kato, F., N. Hara, K. Matsuyama, K. Hattori, M. Ishii e A. Murata. 1989. Isolation of plasmids from *Brevibacterium*. *Agri. Biol. Chem.* **53**: 879–882.

Lagatolla, C., E. A. Tonin, C. Monti-Bragadin, L. Dolzani, F. Gombac, C. Bearzi, E. Edalucci, F. Gionechetti e G. M. Rossolini. 2004. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- β -lactamase determinants in European hospital. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 535-538.

Lee, K., J. B. Lim, J. H. Yum, D. Yong, Y. Chong, J. M. Kim e D. M. Livermore. 2002. *bla* (VIM-2) cassette containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **46**: 1053-1058.

Leret, V., A. Trautwetter, A. Rince e C. Blanco. 1998. pBLA8, from *Brevibacterium linens*, belongs to a Gram-positive subfamily of ColE2-related plasmids. *Microbiology.* **144**: 2827–2836.

Leverstein-van Hall, M. A., A. Paauw, A. T. A. Box, H. E. M. Blok, J. Verhoef e A. C. Fluit. 2002. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3038-3040.

Leverstein-van Hall, M. A., H. E. M. Blok, R. T. Donders, A. Paauw, A. C. Fluit e J. Verhoef. 2003. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J. Infect. Dis.* **187**: 251-259.

Lima, P. T. e A. M. Correia. 2000. Genetic fingerprinting of *Brevibacterium linens* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *Curr Microbiol.* **41**: 50-55.

Livermore, D. M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **34**: 634-640.

Livermore, D. M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clin. Infect. Dis.* **36**: S11-S23.

Madigan, M. T., J. M. Martinko e J. Parker. 2003. Brock Biology of Microorganisms, 10th Edition, Pearson Education, New Jersey, pp.368-371, 707-715, 719-726, 860-861

Maguire, A. J., D. F. Brown, J. J. Gray e U. Desselberger. 2001. Rapid screening technique for class 1 integrons in Enterobacteriaceae and nonfermenting gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **45**: 1022-1029.

Manno, G., M. Cruciani, L. Romano, S. Scapolan, M. Mentasti, R. Lorini e L. Minicucci. 2005. Antimicrobial use and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **25**: 193-197.

Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, F. J. Schmitz, J. Verhoef e M. E. Jones. 1999. Many class 1 integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **43**: 686-689.

Maynard, C., J. M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrín, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière e J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxinogenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **47**: 3214-3221.

Mazel, D., B. Dychinko, V. A. Webb e J. Davies. 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* **280**: 605-608.

McCaughey, C. e N. N. Damani. 1991. Central venous line infection caused by *Brevibacterium epidermidis*. *J. Infect.* **23**: 211-212.

McIver, C. J., P. A. White, L. A. Jones, T. Karagiannis, J. Harkness, D. Marriott e W. D. Rawlinson. 2002. Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1538-1540.

Messier, N. e P. H. Roy. 2001. Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. *J. Bacteriol.* **183**: 6699-6706.

Moore, M., C. Svenson, D. Bowling e D. Glenn. 2003. Complete nucleotide sequence of a native plasmid from *Brevibacterium linens*. *Plasmid*. **49**: 160-168.

Morabito, S., R. Tozzoli, A. Caprioli, H. Karch e A. Carattoli. 2002. Detection and characterization of class 1 integrons in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* **8**: 85-91.

Naas, T., Y. Mikami, T. Imai, L. Poirel e P. Nordmann. 2001. Characterization of In53, a class1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of cassette de genes. *J. Bacteriol.* **183**: 235-249.

Nandi, S., J. J. Maurer, C. Hofacre e A. O. Summers. 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *PNAS*. **101**: 7118-7122.

Nemergut, D. R., A. P. Martin e S. K. Schmidt. 2004. Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1160-1168.

Neumeister, B., T. Mandel, E. Gruner e G. E. Pfyffer. 1993. *Brevibacterium* species as a cause of osteomyelitis in a neonate. *Infection*. **21**: 177-178.

Nield, B. S., A. J. Holmes, M. R. Gillings, G. D. Recchia, B. C. Mabbutt, K. M. H. Nevalainen e H. W. Stokes. 2001. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 59-65.

O'Brien, T. F. 2002. Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else. *Clin. Infect. Dis.* **34**: S78–S84.

Oh, J. Y., K. S. Kim, Y. M. Jeong, J. W. Cho, J. C. Park e J. C. Lee. 2002. Epidemiological typing and prevalence of integrons in multiresistant *Acinetobacter* strains. *APMIS*. **110**: 247-252.

Palleroni, N. J. 1984. Family *Pseudomonadaceae*. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1 (Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley e S. T. Williams, Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 141–199.

Partridge, S. R., C. M. Collis e R. M. Hall. 2002a. Class 1 integron containing a new gene cassette, *aadA10*, associated with Tn1404 from R151. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **46**: 2400-2408.

Partridge, S. R., H. J. Brown e R. M. Hall. 2002b. Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **46**: 1288-1294.

Ploy, M. C., F. Denis, P. Courvalin e T. Lambert. 2000. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **45**: 546-552.

Poirel, L., T. Lambert, S. Türkoglü, E. Ronco, J.-L. Gaillard e P. Nordmann. 2000. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla_{VIM-2}* carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **45**: 546-552.

Prescott, L. M., J. P. Harley e D. A. Klein. 2005. *Microbiology*, 6th international edition, McGraw-Hill, New York, pp.130, 131, 185, 489, 490, 788, 789, 792.

Quinteira, S., H. Ferreira e L. Peixe. 2005a. First isolation of *bla_{VIM-2}* in an environmental isolate of *Pseudomonas alcaligenes*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **49**: 2140-2141.

Quinteira, S., J. C. Sousa e L. Peixe. 2005b. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- β -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **49**: 451-453.

Rademaker, J. L. W. e F. J. de Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. *In: DNA Markers: protocols, applications and overviews* (Caetano-Anolles, G.e P.M. Gresshoff, eds), Wiley-Liss, New York, pp.151-171.

Ratray, F. P. e P. F. Fox. 1999. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* **82**: 891-909.

Recchia, G. D. e R. M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141**: 3015-3027.

Recchia, G. D. e R. M. Hall. 1997. Origin of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* **5**: 389-394.

Reinbold, G. W. e M. S. Reddy. 1974. Sensitivity or resistance of dairy starter and associated microorganisms to selected antibiotics. *J. Milk Food Technol.* **37**: 517-521.

Reinert, R.R., N. Schnitzler, G. Haase, R. Lutticken, U. Fabry, K.P. Schaal e G. Funke. 1995. Recurrent bacteremia due to *Brevibacterium casei* in an immunocompromised patient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 1082–1085.

Rosser, S. J. e H. K. Young. 1999. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J. Antimicrob. Chemoter.* **44**: 11-18.

Rowe-Magnus, D. A. e D. Mazel. 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 565-569.

Rowe-Magnus, D. A., A.-M. Guerout e D. Mazel. 1999. Super-integrons. *Res. Microbiol.* **150**: 641-651.

Rowe-Magnus, D. A., A.-M. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies e D. Mazel. 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 652-657.

Saavedra, M. J., L. Peixe, J. C. Sousa, I. Henriques, A. Alves e A. Correia. 2003. Sfh-I, a subclass B2 Metallo- β -Lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **47**: 2330-2333.

Sá-Correia, I. 2000. *Pseudomonadaceae. Pseudomonas.* In: *Microbiologia, Vol 2* (Canas Ferreira, W. F. e J. C. F. de Sousa, Coordenadores), Lidel-Edições Técnicas, Lda, Lisboa, pp.123-136

Santos, O. M. M. 2001. Caracterização genotípica e fenotípica de estirpes do género *Brevibacterium* e outras corinebactérias relacionadas. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.

Segal, H., M. V. Francia, J. M. Lobo e G. Elisha. 1999. Reconstruction of an active integron recombination site after integration of a gene cassette at a secondary site. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **43**: 2538-2541.

Severino, P. e V. D. Magalhães. 2002. The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Res. Microbiol.* **153**: 221-226.

Severino, P. e V. D. Magalhães. 2004. Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**: 156-162.

Seward, R. J. e K. J. Towner. 2002. Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**: 308-318.

Shibata, N., Y. Doi, K. Yamane, T. Yagi, H. Kurokawa, K. Shibayama, H. Kato, K. Kai e Y. Arakawa. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5407-5413.

Shlaes, D. M., D. N. Gerding, J. F. John jr., W. A. Craig, D. L. Bornstein, R. A. Duncan, M. R. Eckman, W. E. Farrer, W. H. Greene, V. Lorian, S. Levy, J. E. McGowan jr, S. M. Paul, J. Ruskin, F. C. Tenover e C. Watanakunakorn. 1997. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **18**: 275-291.

Smith, D. L., A.D. Harris, J.A. Johnson, E.K. Silbergeld e J.G. Morris Jr. 2002. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 6434–6439.

Stokes, H. W. e R. M. Hall. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* **3**: 1669-1683.

Sundin, G. W. 2002. Distinct recent lineages of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Curr. Microbiol.* **45**: 63-69.

Sundstrom, L. 1998. The potential of integrons and connected programmed rearrangements for mediating horizontal gene transfer. *APMIS Suppl.* **84**: 37-42.

Sundstrom, L. e O. Sköld. 1990. The dhfrI trimethoprim resistance gene of Tn7 can be found at specific sites in other genetic surroundings. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **34**: 642-650.

Toleman, M. A., D. Biedenbach, D. Bennett, R. N. Jones e T. R. Walsh. 2003. Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-13}, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance program. *J. Antimicrob. Chemoter.* **52**: 583-590.

Tomofusa, T., Y. Li, T. Mima, Y. Komori, Y. Morita, T. Kuroda and T. Mizushima. 2003. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemoter.* **52**: 572-575.

Troxler, R., G. Funke, A. von Graevenitz e I. Stock. 2001. Natural antibiotic susceptibility of recently established coryneform bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 315-323.

Tsukayama, D. T., H. J. van Loon, C. Cartwright, B. Chmielewski, A. C. Fluit, C. van der Werken e J. Verhoef. 2004. The evolution of *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic rotation in a medical intensive care unit: the RADAR-trial. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **24**: 339-345.

Vaisvila, R., R. D. Morgan, J. Posfai e E. A. Raleigh. 2001. Discovery and distribution of super-integrins among pseudomonads. *Mol. Microbiol.* **42**: 587-601.

Villa, L., P. Visca, F. Tosini, C. Pezzella e A. Carattoli. 2002. Composite integron array generated by insertion of an ORF341-type integron within a Tn21-like element. *Microb. Drug Resist.* **8**: 1-8.

Wauters, G., G. Haase, V. Avesani, J. Charlier, M. Janssens, J. van Broeck e M. Delmée. 2004. Identification of a novel *Brevibacterium* species isolated from humans and description of *Brevibacterium sanguinis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 2829-2832.

Wauters, G., J. Charlier, M. Janssens e M. Delmée. 2001. *Brevibacterium paucivorans* sp. nov., from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1703-1707.

Wauters, G., V. Avesani, K. Laffineur, J. Charlier, M. Janssens, B. van Bosterhaut e M. Delmée. 2003. *Brevibacterium lutescens* sp. nov., from human and environmental samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1321-1325.

Weldhagen, G. F. 2004. Integrons and β -lactamases—a novel perspective on resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **23**: 556-562.

White, P.A., C. J. McIver e W. D. Rawlinson. 2001. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **45**: 2658-2661.

Yatsuyanagi, J., S. Saito, S. Harata, N. Suzuki, Y. Ito, K.-I. Amano e K. Enomoto. 2004. Class 1 integron containing metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **48**: 626-628.