

**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
**2007**

**Maria de Lourdes  
Batista**

**Estudo de uma mutação no gene  
*gyrB* de *Pseudomonas aeruginosa***

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



## **o júri**

presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia  
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva  
Professora Auxiliar da Universidade de Coimbra

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



## **agradecimentos**

À Professora Doutora Sónia Mendo, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro por sua paciência, dedicação e seu enorme contributo na elaboração deste trabalho.

À Sónia Ferreira pela paciência com que transmitiu seus conhecimentos sem os quais este trabalho não seria possível.

À Equipa do Laboratório de Biotecnologia Molecular do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Sónia, Tânia, Andréia, Cátia e Patrícia) por vossa ajuda, sempre necessária, na elaboração das técnicas.

Aos colegas e amigos do Serviço de Imunohematologia do Centro Hospitalar do Alto Ave, Unidade de Guimarães pelas constantes trocas e “baldrocas” que ajudaram, e muito, a encontrar tempo.

À Milena por estar sempre presente – mesmo quando eu estava ausente, pelo seu carinho, pelas palavras de ânimo, pelo seu enorme contributo e principalmente por fazer tudo parecer simples.

À Família por compreenderem as minhas constantes ausências.



Ao meu pai.  
Em memória.





**palavras-chave**

Técnicas moleculares, *Pseudomonas aeruginosa*, resistência, quinolonas, gene *gyrB*

**resumo**

Com o intuito de aprendizagem e aplicação de algumas técnicas de biologia molecular que possam representar uma mais valia no desempenho de funções no ambiente hospitalar, o trabalho prático realizado foi adaptado e enquadrado no contexto de um estudo já iniciado.

Num trabalho anterior (Ferreira S. 2005), foi encontrada uma nova mutação no codão 464 do gene *gyrB*, que conduzia à substituição de um amino ácido serina por uma tirosina numa estirpe hospitalar de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa30) resistente às quinolonas.

*P. aeruginosa* é um importante patógeno oportunista que está associado principalmente, a infecções nosocomiais. Duas das suas principais características são a sua elevada resistência intrínseca e a sua virulência. O aumento de estirpes de *P. aeruginosa* resistentes às quinolonas tem servido de base para vários estudos.

Neste contexto, pretendeu-se verificar se a mutação encontrada, estaria implicada na resistência às quinolonas na estirpe Pa30 . Esta mutação já tinha sido descrita em outras espécies bacterianas mas não em *P. aeruginosa*. O estudo consistiu na introdução do gene contendo a mutação descrita numa estirpe de *E. coli* sensível às quinolonas e posterior confirmação de aquisição de resistência pela célula sensível.

Os resultados obtidos mostraram que a mutação descrita por Ferreira S. (2005) não é por si só, responsável pela resistência da estirpe às quinolonas, sugerindo que outros mecanismos possam estar activos.



**keywords**

Molecular genetics techniques, *Pseudomonas aeruginosa*, resistance, quinolones, *gyrB* gene

**abstract**

With the aim of learning and get familiar with various molecular biology techniques the present work was adapted to that end. The techniques were adapted and applied to a study that was already initiated.

Previously (Ferreira S. 2005), found a new mutation in codon 464 of the *gyrB* gene, that leads to an aminoacid substitution (serine to tyrosin) in an quinolone resistant hospital isolate of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa30).

*P. aeruginosa* is an important pathogen that is associated with a various nosocomial infections. Two of its most important characteristics are the intrinsic resistance to antibiotics and also its virulence. The preocupant increasing number of quinolone resistant strains constitutes the basis for several studies.

In this context, the aim of the present work was to verify if the mutation found in the strain *P. aeruginosa* Pa30 has any implication in the resistance to quinolones. This mutation was found in other species, but not in *P. aeruginosa*.

The study consisted in the introduction of the *gyrB* gene in na *E. coli* strain sensitive to the quinolones. Finally, resistance profile to quinolones was evaluated in the receptor strain.

Results showed that the mutation previoully described is not, by itself, responsible for the resistance profile observed in *P. aeruginosa* Pa30 suggesting that other mechanisms might also be implied.



# ÍNDICE

---



**ÍNDICE.**

ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Antibióticos.....	3
1.1.1. Toxicidade selectiva.....	4
1.1.2. Acção dos compostos antimicrobianos.....	5
1.2. Resistência bacteriana.....	7
1.2.1. Mecanismos de resistência.....	10
1.2.2. Mutações.....	10
1.2.3. Transferência dos genes de resistência.....	11
1.2.4. Plasmídeos.....	11
1.2.5. Transposões.....	13
1.2.6. Integrões.....	15
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
1.3.1. Definição e características.....	16
1.3.2. Patogenicidade e virulência.....	18
1.3.3. Patogénese.....	20
1.4. Resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos antimicrobianos...	21
1.4.1. Resistência intrínseca.....	21
1.4.2. Resistência adquirida.....	24
1.4.3. Resistência às quinolonas.....	25
2. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVO DO ESTUDO.....	31

3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1.	Isolados bacterianos .....	35
3.2.	Conservação da amostra.....	35
3.3.	Amplificação do DNA por PCR .....	35
3.4.	Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	36
3.5.	Determinação da sequência .....	37
3.6.	Preparação de células competentes pelo método de cloreto de sódio.....	37
3.7.	Reacção de ligação.....	39
3.8.	Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> (DH5a).....	39
3.9.	Seleção dos transformantes (pela cor) .....	39
3.10.	Determinação do perfil de resistência às quinolonas .....	40
4.	RESULTADOS.....	45
4.1.	Amplificação do gene da DNA girase B.....	45
4.2.	Reacção de ligação.....	46
4.3.	Seleção de transformantes pela cor .....	47
4.4.	Verificação da inserção do gene da <i>gyrB</i> por PCR .....	47
4.5.	Sequenciação do fragmento de 242 pb .....	48
4.6.	Perfil de resistência às quinolonas .....	49
5.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	53
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
7.	BIBLIOGRAFIA .....	61



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Exemplos de mecanismos de resistência e genes implicados na resistência aos respectivos antibióticos .....	9
Tabela 2:	Classificação do género <i>Pseudomonas</i> de espécies clinicamente importantes.....	17

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Triângulo de Davis – Relação microrganismo, paciente e antimicrobiano .....	5
Figura 2:	Principais estruturas e etapas metabólicas afectadas pelos diferentes grupos de antibióticos .....	7
Figura 3:	Esquema representativo da presença de DNA plasmídico, contendo um gene de resistência a um antibiótico, numa célula bacteriana.....	12
Figura 4:	Esquema representativo do mecanismo de inserção de um transposição.....	14
Figura 5:	Estrutura de um Integrão da classe 1.....	16
Figura 6:	Factores de virulência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
Figura 7:	Diagrama esquemático do sistema de efluxo, do tipo RND, de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
Figura 8:	Estrutura química da molécula de Fluoroquilonona.....	25
Figura 9:	Diferentes fases do mecanismo de acção das fluoroquinolonas.....	28
Figura 10:	Gel de agarose após amplificação do gene <i>gyrB</i> da estirpe Pa30, contendo a mutação no codão 464 (serina-TCC → tirosina-TAC).....	46
Figura 11:	Gel de agarose após amplificação do gene <i>gyrB</i> nos clones seleccionados.....	48

- Figura 12: Sequenciação da DNA girase B de uma das colónias transformadas. O nucleótido alterado (C→A) está indicado a azul. .... 49
- Figura 13: Dedução da sequência de amino ácidos da *gyrB* da estirpe PAO1 e da colónia transformante. A alteração do amino ácido está devidamente assinalada. .... 49

## **ABREVIATURAS**

---



## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ATP	Adenina trifosfato
CMI	Concentração mínima inibitória
DNA	Ácido dextrorribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>gyrA</i>	DNA girase A
<i>gyrB</i>	DNA girase B
IS	Sequência de inserção
LB	Meio Luria Bertani
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MFS	Major facilitator superfamily
<i>parC</i>	Topoisomerase IV
<i>parE</i>	Topoisomerase IV
QRDR	Região determinante de resistência às quinolonas
RNA	Ácido ribonucléico
RND	Resistance nodulation division
SMR	Small multidrug resistance
TAE	Tampão tris-acetato EDTA
TBE	Tampão tris-borato EDTA



# INTRODUÇÃO

---





# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Antibióticos**

Compostos antimicrobianos são substâncias produzidas de forma sintética ou semi-sintética que, em pequenas quantidades, têm capacidade de inibir o crescimento de bactérias, fungos ou vírus (Anglada R. R., 1997).

De uma forma geral, os compostos antimicrobianos produzidos por bactérias ou fungos são denominados antibióticos. Assim, podemos definir antibiótico como uma substância produzida por um microrganismo capaz de inibir o crescimento de outro microrganismo (Tortora G. J., 2003). Na prática, muitas vezes não se consegue fazer a distinção entre composto antimicrobiano e antibiótico. Um exemplo disto é a sulfa – composto totalmente sintético, mas denominado antibiótico.

Já as civilizações antigas utilizavam os antibióticos de forma empírica, através da aplicação de certas substâncias obtidas a partir de plantas e animais como paliativo de doenças. Os conquistadores espanhóis utilizavam a quinina (extracto retirado de uma árvore sul-americana) no tratamento da malária.

A eficácia científica destes tratamentos só foi constatada no século XIX com a descoberta da origem infecciosa destas doenças (Anglada R.R., 1997).

O aparecimento da quimioterapia moderna é atribuído a Paul Ehrlich (1854 - 1915) que desenvolveu o conceito de toxicidade selectiva, indicando que determinado agente exibia acção sobre os microrganismos sem afectar as células do hospedeiro. Tal conceito tem importante reflexo prático, pois indica se um agente pode, teoricamente, ser útil no tratamento de doenças infecciosas.

Em 1909 Paul Ehrlich descobriu um medicamento obtido a partir de uma série de mais de mil combinações de arsénico e utilizado no tratamento da sífilis. De facto, o número 606 da sua série de compostos, o "Salvarsan", apesar de ter efeitos modestos e de provocar reacções secundárias relativamente graves, era eficaz no tratamento da sífilis. O "Salvarsan" foi utilizado como tratamento de escolha da sífilis até 1940 quando foi substituído pela penicilina.

Em 1928 Alexander Fleming desenvolvia pesquisas sobre estafilococos quando descobriu a penicilina. Esta descoberta representou um grande avanço do Homem contra a doença. Só por volta de 1940 Howard Florey e Ernst Chain, responsáveis por um grupo de investigadores da Universidade de Oxford, obtiveram o primeiro sucesso clínico com a penicilina (Tortora G. J., 2003).

Nos 25 anos seguintes, as pesquisas de quimioterapêuticos centraram-se, na sua maior parte, em torno das substâncias de origem microbiana chamadas antibióticos. À purificação, isolamento e concentração em massa da penicilina seguiram-se o desenvolvimento da estreptomicina, tetraciclina, cloramfenicol e muitos outros compostos antimicrobianos (Brooks G. F., 2001).

### **1.1.1. Toxicidade selectiva**

O tratamento antimicrobiano de um processo infeccioso tem por objectivo impedir ou inibir o crescimento dos microrganismos, sem produzir efeitos indesejáveis ou afectar as funções metabólicas do indivíduo ao qual são administrados estes fármacos (Anglada R.R., 1997). Ver figura 1.

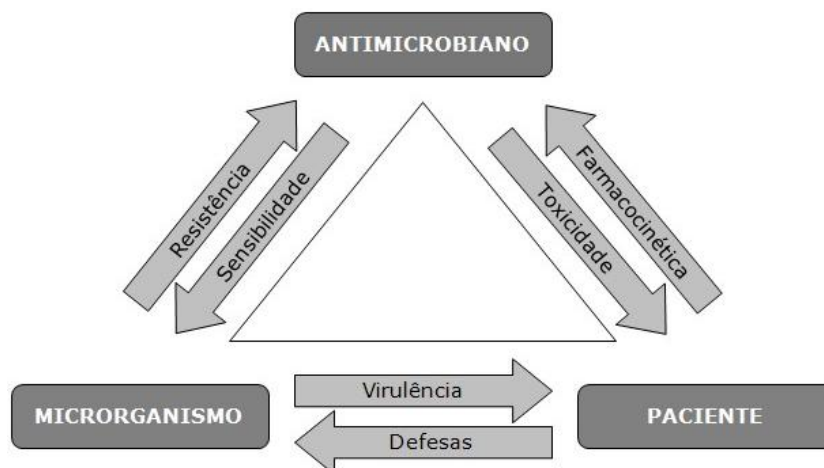


Figura 1: Triângulo de Davis – Relação microrganismo, paciente e antimicrobiano (Adaptação - Anglada R.R., 1997)

O composto antimicrobiano ideal deverá possuir toxicidade selectiva, ou seja, possuir a capacidade de actuar selectivamente sobre o microrganismo, sem provocar danos ao paciente. Como a célula eucariótica e procariótica diferem substancialmente em diversos aspectos (na presença ou ausência de parede celular, na estrutura fina dos ribossomas, em alguns detalhes de seus metabolismos, etc.) a toxicidade selectiva terá inúmeros alvos.

Alguns compostos possuem estreito espectro de actividade, ou seja, afectam um número restrito de microrganismos diferentes. Outros, afectam um grande número de bactérias sendo denominados antibióticos de largo espectro (Tortora G. J., 2003).

### 1.1.2. Acção dos compostos antimicrobianos

A eficácia e o êxito terapêutico do tratamento com um antimicrobiano determinam-se, em termos clínicos, pela melhoria do paciente e desaparecimento do processo infeccioso. Do ponto de vista do laboratório de microbiologia, a eficácia clínica tem um valor meramente predictivo, que pode ser medido, em princípio, em função dos valores de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração eficaz de antimicrobiano no local da infecção (Anglada R. R., 1997).

Os compostos antimicrobianos podem ser bactericidas – matam o microrganismo directamente, ou podem ser bacteriostáticos – impedem o crescimento do microrganismo.

O mecanismo pelo qual muitos compostos antimicrobianos actuam não é totalmente conhecido. Contudo, os principais mecanismos de acção destes compostos estão resumidos na figura 2 e podem ser:

- Inibição da síntese da parede celular: O antibiótico impede a síntese completa do peptidoglicano tornando a parede frágil e levando à lise da célula.
- Lesão da membrana celular: O antibiótico promove alterações na permeabilidade da membrana plasmática. Estas alterações resultam da perda de metabólitos importantes da célula bacteriana.
- Inibição da síntese proteica: O mecanismo de acção para este tipo de compostos ainda não está completamente estudado. As células eucariotas possuem ribossomas 80s e a células procariotas possuem ribossomas 70s. A diferença na estrutura dos ribossomas é responsável pela toxicidade selectiva dos antibióticos que afectam a síntese proteica da bactéria.
- Inibição da síntese de ácidos nucleicos: O antibiótico interfere com os processos de replicação e transcrição do DNA das bactérias.
- Inibição da síntese de metabolitos essenciais: Geralmente ocorre por um mecanismo de inibição competitiva. A actividade de determinada enzima de um microrganismo pode ser inibida por uma substância que se assemelha muito ao substrato natural da enzima. Ver figura 2.

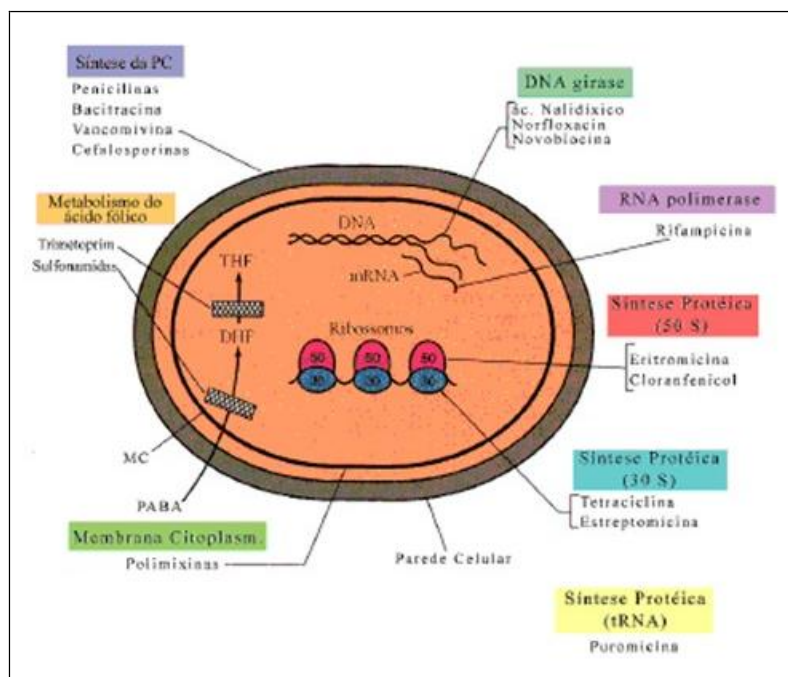


Figura 2: Principais estruturas e etapas metabólicas afetadas pelos diferentes grupos de antibióticos

(<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/antibioticos/antibioticos.html>)

## 1.2. Resistência bacteriana

Um dos factores que limita a utilização dos antimicrobianos é a presença de mecanismos de resistência no microrganismo. Esta resistência surge como um processo de adaptação natural dos microrganismos à acção inibitória ou letal dos antimicrobianos (Anglada R. R., 1997).

Um microrganismo é resistente quando não é inibido pelas concentrações de antibiótico que normalmente inibem a população bacteriana. Este fenómeno de resistência produz-se sempre que o microrganismo apresente determinantes genéticos responsáveis pela produção dos mecanismos de resistência e estes se expressem adequadamente (Anglada R. R., 1997).

Assim, a resistência aos antibióticos poderá ser de dois tipos:

1. Resistência intrínseca: resistência inerente ou natural da própria bactéria e, que não foi adquirida por um processo de mutação ou a partir de material genético de outra bactéria (Cánton R., 2002). No caso da resistência intrínseca todas as bactérias de uma mesma espécie são resistentes a algumas famílias de antibióticos e isto permite-lhes ter vantagens competitivas em relação a outras estirpes (Riveron F. F., 2003).

Entre os principais mecanismos de resistência intrínseca pode-se referir:

- Impermeabilidade ao antimicrobiano: muitas bactérias de Gram negativo são resistentes à penicilina G por serem impermeáveis ao composto, ou por apresentarem alterações em proteínas de ligação à penicilina. No caso das sulfonamidas, o microrganismo pode também apresentar uma menor permeabilidade ao composto.
  - Bombas de efluxo: transportam activamente o antibiótico para fora da célula - efluxo do composto de que é exemplo a resistência às tetraciclinas em bactérias entéricas.
2. A resistência adquirida implica no desenvolvimento ou aquisição de um mecanismo de resistência numa dada população (Anglada R. R., 1997). Este mecanismo pode ser adquirido por: conjugação, transformação, transdução ou ainda por elementos genéticos móveis tais como os transposões e os integrões.

Entre os principais mecanismos de resistência adquirida pode-se referir:

- Modificação da enzima ou estrutura alvo: como ocorre nas alterações da molécula do rRNA 23S (na resistência à eritromicina e cloramfenicol), nas alterações da enzima, em compostos que actuam no metabolismo, ou no uso de vias metabólicas alternativas.

- Produção de enzimas que destroem os antimicrobianos: ocorre inativação por enzimas codificadas pelos microrganismos. Por exemplo, a penicilinase ( $\beta$ -lactamase) é uma enzima que cliva o anel  $\beta$ -lactâmico inativando o composto. Outros compostos podem ser inativados em decorrência de modificações introduzidas pelo microrganismo, tais como a adição de grupos químicos. Assim, muitos microrganismos são capazes de promover a fosforilação ou acetilação de antibióticos.

Em resumo, a análise do mecanismo de resistência adquirida dependerá sempre de determinantes genéticos que o microrganismo adquiriu, quer por mutação quer por transferência de genes de resistência. Ver tabela 2.

Tabela 1: Exemplos de mecanismos de resistência e genes implicados na resistência aos respectivos antibióticos  
(Adaptação - Anglada R.R., 1997)

Processo de aquisição	Gene implicado	Mecanismo de resistência	Antibiótico afectado
Mutação de genes pré-existentes	<i>gyrA, gyrB</i>	DNA girase modificada	Fluoroquilononas
	<i>parC</i>	Topoisomerase IV modificada	Fluoroquilononas
	<i>rpsL</i>	Proteína S12 ribossômica modificada	Estreptomicina
	<i>rpoB</i>	RNA-polimerase modificada	$\beta$ -lactâmicos
	<i>ampD</i>	Sobre-expressão de $\beta$ -lactamase	Cloramfenicol, Fluoroquilononas e tetraciclina
Aquisição de material genético de outra bactéria	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	$\beta$ -lactamase TEM-1	Aminopenicilinas
	<i>aac, aph, ant</i>	Enzimas modificantes	Aminoglicosídeos
	<i>mecA</i>	PBP modificada (PBP2a)	$\beta$ -lactâmicos
	<i>pbp</i>	PBP modificada de <i>S. pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>tetM</i>	Protecção do ribossoma	Tetraciclina
	<i>vanA</i>	Ligasa anormal	Glicopeptídeos
Mutação de genes adquiridos	<i>bla<sub>TEM-3</sub></i>	$\beta$ -lactamase de espectro ampliado	Cefalosporina de 3ª geração
	<i>mecR</i>	Regulação da <i>mecA</i>	$\beta$ -lactâmicos

### **1.2.1. Mecanismos de resistência**

A aquisição de resistência aos antibióticos por parte das bactérias pode ser devido a alterações no DNA cromossômico causado por mutações ou, pela aquisição de material genético extracromossômico, mediante transferência genética.

### **1.2.2. Mutações**

Uma mutação, sob o ponto de vista molecular, é qualquer alteração na sequência de bases do DNA quer por eliminação ou substituição de um ou mais nucleotídeos (Videira A., 2001).

As mutações são fenômenos espontâneos com uma taxa de frequência de aproximadamente de  $10^{-6}$  (Woodford N., 2007). Isto quer dizer que a probabilidade de aparecer um determinado tipo de mutação é de um para um milhão. Contudo, devemos ter em consideração o tamanho das populações bacterianas que pode ser de muitos milhões.

As primeiras teorias consideravam que uma população bacteriana se tornava resistente a um determinado antibiótico como consequência de uma adaptação ao mesmo, mas a presença do antibiótico permite apenas seleccionar a população resistente. Mutações que conduzem à resistência a antibióticos ocorrem espontaneamente numa população mesmo na ausência do composto, ao invés de ocorrer uma adaptação fenotípica de algumas células em presença do agente inibidor. Vários são os trabalhos que demonstraram, em bactérias, mutação seguida de selecção e não adaptação fenotípica aos antibióticos. (<http://morpheus.fmrp.usp.br/td/aulas/GenResAntibiotico.php> – 28/07/2007)

Na maioria das vezes o resultado das mutações é específico, pois altera a sequência de bases num local determinado. Assim, uma mutação dá lugar a uma bactéria resistente a um antibiótico ou, a vários antibióticos da mesma família.



### 1.2.3. Transferência dos genes de resistência

A forma mais comum de surgir resistência numa população bacteriana é pela aquisição de genes procedentes de outras bactérias. Tal como já foi referido anteriormente a transferência de material genético entre bactérias pode ocorrer por diferentes processos, tais como a transformação, a transdução e conjugação (Anglada R.R., 1997).

- **Transformação:** consiste na captação e introdução dentro da célula de segmentos de DNA provenientes de outras células presentes no meio circundante. A transformação natural foi apenas observada em algumas espécies bacterianas, de Gram negativo e de Gram positivo nomeadamente, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Acinetibacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Thermoactinomyces* (Ferreira W. F. C., 2000).
- **Transdução:** o DNA bacteriano é transferido da célula dadora para uma célula receptora por um vírus que infecta bactérias, denominado bacteriófago ou fago (Tortora G. J., 2003).
- **Conjugação:** ocorre a formação de pontes citoplasmáticas entre duas bactérias, permitindo a transferência genética através do contacto directo entre elas. Esta transferência pode ocorrer mesmo entre bactérias que não pertencem ao mesmo género. A transferência é mediada por plasmídeos e o DNA que é transferido incorpora-se no cromossoma da bactéria receptora que se divide e origina uma população com novas características.

### 1.2.4. Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossómicas de tamanho variado, desde 3 kb a mais de 400 kb. São moléculas auto-replicativas geralmente circulares e com cerca de 1 a 5% do tamanho do cromossoma bacteriano (Ferreira W. F. C., 2000).

Embora os plasmídeos não possuam genes essenciais para a célula, pois esta pode viver e multiplicar-se na sua ausência, a existência de plasmídeos influencia grandemente as características e o comportamento fenotípico dos microrganismos (Ferreira W. F. C., 2000).

Os plasmídeos conjugativos transportam genes (*tra*) que codificam as funções para sua transferência e, não possuem nenhuma outra característica para além da capacidade de promoverem a transferência conjugativa de plasmídeos (Ferreira W. F. C., 2000).

No entanto, existem inúmeros exemplos de plasmídeos, particularmente plasmídeos de resistência, que não possuem funções de transferência. São denominados plasmídeos não-conjugativos e podem ser transferidos na presença de plasmídeos conjugativos. (Ferreira W. F. C., 2000, Anglada R. R. 1997).

Uma bactéria pode conter vários plasmídeos diferentes e, um mesmo plasmídeo pode possuir múltiplos genes de resistência o que confere à bactéria uma vantagem selectiva, em determinados ambientes, de resistência a vários antibióticos. Ver figura 3.

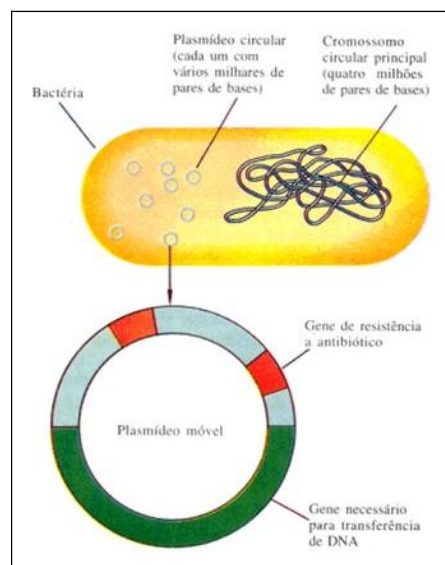


Figura 3: Esquema representativo da presença de DNA plasmídico, contendo um gene de resistência a um antibiótico, numa célula bacteriana.

([http://www.libertaria.pro.br/tdna\\_recombinante\\_intro.htm](http://www.libertaria.pro.br/tdna_recombinante_intro.htm) - 29/07/2007)

A bactéria pode adquirir estes genes de resistência por um mecanismo de recombinação, mediada por elementos genéticos móveis como, por exemplo, sequência de inserções (IS), transposões (Tn) e integrões. (Anglada R. R. 1997).

### **1.2.5. Transposões**

Tal como está esquematizado na Figura 4, os transposões são sequências de DNA que podem mover-se de uma determinada região da molécula de DNA para outra (Brooks G. F., 2001). Este processo não é dependente de reconhecimento do local de inserção e ocorre sem necessidade de uma sequência de DNA homóloga. Os estudos de identificação e caracterização molecular dos elementos transponíveis de bactérias tiveram início por volta do final dos anos 60, início dos anos 70 (Vizváryová M., 2004).

kleckner (1981), dividiu os transposões em três classes distintas, com base nas suas propriedades estruturais, mecanismo de transposição e na homologia do DNA:

- Classe I - sequência de inserção (IS). São elementos transponíveis mais simples. Estes elementos transportam apenas os genes necessários para a movimentação do elemento e respectiva inserção numa nova posição. Além do transposão simples não transportam qualquer informação genética adicional. Caracterizam-se pelo seu pequeno tamanho, normalmente 1 Kb de comprimento.
- Classe II - o transposão da família Tn, com mais de 5 KB, é ladeado por sequências repetidas invertidas de 38 a 40 pb e transporta informação genética que codifica resistência a determinados antibióticos. Estas sequências por sua vez possuem sequências directas ou invertidas a flanquear o transposão, o que permitem que o transposão composto possua também a capacidade de movimentação.

- Classe III: promovem a transposição de bacteriófagos, tais como Mu ou seus derivados. Estes possuem os genes implicados na transposição, bem como genes para a replicação do DNA, desenvolvimento do fago e lise celular (Simões A. B., 1999 e Vizváryová M., 2004).

Os transposões são elementos genéticos móveis que ocorrem em muitos genomas bacterianos. Não podemos compreender perfeitamente a evolução do genoma bacteriano se não compreendermos como a mobilidade do DNA celular é mantida e, como se dissemina entre os genomas bacterianos. Os elementos transponíveis também podem ser uma ameaça à saúde pública uma vez que, um transposão que transporta genes que conferem resistência a antibióticos é umas das fontes de disseminação de genes de resistência aos antibióticos. A compreensão deste mecanismo pode vir a clarificar sobre a epidemiologia de genes de resistência bem como de microrganismos patogênicos resistentes (Wagner A., 2007). Ver figura 4.

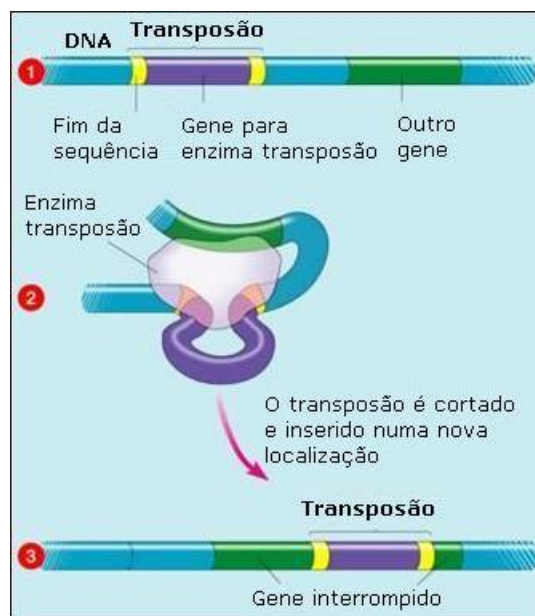


Figura 4: Esquema representativo do mecanismo de inserção de um transposão.  
(Adaptação - [www.uiduk.ac.kr/.../dnatech01/transposon.htm](http://www.uiduk.ac.kr/.../dnatech01/transposon.htm), 28/07/2007)

### 1.2.6. Integrões

Integrões são elementos genéticos que possuem um sistema de recombinação sítio-específico, capaz de capturar e mobilizar genes contidos em "gene cassettes". Os componentes essenciais de um integrão são o gene *intI* (que codifica uma integrase), o local adjacente de recombinação *attI* (reconhecido pela integrase) e um promotor *P<sub>c</sub>* correctamente orientado e responsável pela expressão dos genes presentes nas "gene cassettes". Os integrões não incluem necessariamente uma "gene cassette", mas quando estas estão incorporadas fazem parte do integrão (Bouvier M., 2005).

As "gene cassettes" são elementos móveis que normalmente incluem apenas um gene completo num local de recombinação específico da integrase denominado "elemento de 59 pares de base" (*attC*); cada "gene cassette" possui um *attC*, podendo existir como moléculas circulares livres ou integradas no *attI*, Figura 5 (Correia M.J.P., 2003).

Até agora foram descritas pelo menos oito classes de integrões. As diferenças entre as classes estão nas sequências dos genes da integrase.

Os integrões de classes 1 e 2 contêm "gene cassettes" que codificam para resistência a antibióticos.

Os integrões da classe 4 foram denominados superintegrões e são encontrados no pequeno cromossoma do *Vibrio cholerae*. Centenas de superintegrões contêm "gene cassettes" que codificam adaptações que se estendem para além da resistência antibiótica e patogenicidade.

As restantes classes dos integrões também podem conter "gene cassettes" que codificam para resistência de antibióticos, mas a sua prevalência é muito baixa.

Os integrões têm um papel predominante na captação e disseminação de genes que codificam para a resistência de antibióticos entre as bactérias de Gram negativo (Barlow R. S., 2004). Ver figura 5.

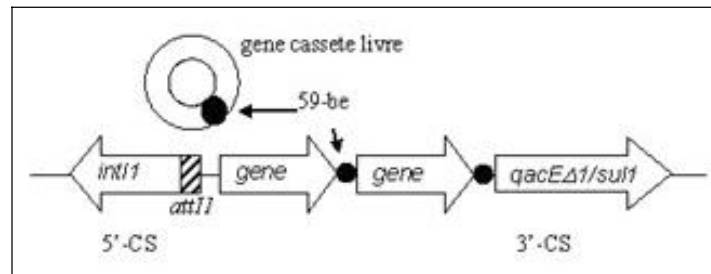


Figura 5: Estrutura de um Integrão da classe 1.  
([http://www.lemc.com.br/midia/1889\\_1\\_1.gif](http://www.lemc.com.br/midia/1889_1_1.gif) – 29/07/2007)

### 1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.3.1. Definição e características

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo de Gram negativo pertencente à família das *Pseudomonadaceae*. É aeróbio, não fermentador e possui mobilidade através de um ou mais flagelos polares. Por apresentar uma grande heterogeneidade interna, o género *Pseudomonas* foi subdividido em 5 grupos (tabela 2) com base na sequência do RNA ribossomal (RNAr) (Ferreira W. F. C., 2000).

Tabela 2: Classificação do género *Pseudomonas* de espécies clinicamente importantes.  
(Adaptação – G. F. Brooks *et al.*, 2001 e W. F. C. Ferreira, 2000)

rRNA Homologia Grupo e subgrupo	Género e espécie	
I – Grupo Fluorescente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Pseudomonas fluoresces</i>	
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
	<i>Pseudomonas putida</i>	
	Grupo não fluorescente	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
		<i>Pseudomonas syringae</i>
	II	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<i>Burkholderia mallei</i>		
<i>Burkholderia cepacia</i>		
<i>Ralstonia picettii</i>		
III	<i>Commamonas species</i>	
	<i>Acidovorax species</i>	
IV	<i>Brevundimonas species</i>	
V	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	

*Pseudomonas aeruginosa* é produtora de pigmentos fluorescentes, a piocianina (azul) e pioverdina (verde). Algumas estirpes produzem piorrubina (pigmento avermelhado) ou piomelanina (pigmento preto). Crescem entre os 37 e 42°, são oxidase-positiva e não são fermentadoras de hidratos de carbono (Brooks G. F., 2001).

Em de meio de cultura, *Pseudomonas aeruginosa* pode produzir três tipos de colónias. Isolados naturais de produtos do solo ou da água normalmente produzem colónias tipicamente pequenas e ásperas. Amostras clínicas em geral podem produzir dois tipos de colónia. Um tipo com aparência de “ovo estrelado”, grande, lisa, com bordas lisas e aparência ligeiramente elevada e um segundo tipo, provenientes normalmente de secreções respiratórias e trato urinário, são colónias lisas com aparência mucóide. Têm um papel importante na colonização e na virulência e, a sua aparência mucóide normalmente é atribuída à produção de alginato (<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>).

A identificação de *Pseudomonas aeruginosa* normalmente é baseada na morfologia das colónias, na característica dos pigmentos e no crescimento a 42°.

### **1.3.2. Patogenicidade e virulência**

*Pseudomonas aeruginosa* é praticamente ubiqüitária, podendo ser isolada de águas, do solo, de plantas, de esgoto e de amostras clínicas (Ferreira W. F. C., 2000). Nos seres humanos pode ser encontrada em pequeno número na pele e na flora intestinal e é o maior agente patogénico do seu grupo (Brooks G. F., 2001).

A patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* encontra-se limitada ao oportunismo, em resultado das suas características biológicas que dificultam o acesso aos tecidos do hospedeiro e um nicho específico onde possa proliferar e evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro (Ferreira W. F. C., 2000).

Considerando que *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria ubiqüitária e faz parte da microbiota humana, raramente se torna a causa de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis. Contudo, em ambientes hospitalares, esta bactéria torna-se um agente infeccioso importante, principalmente em pacientes predispostos, que apresentam quebra de barreiras físicas e imunossupressão (Paviani E. R., 2004).

*Pseudomonas aeruginosa* é considerada a espécie mais virulenta entre os bacilos de Gram negativo não fermentadores, como resultado da produção de uma grande variedade de factores de virulência celulares e extracelulares (figura 6) (Soares M. C. S. T., 2005), tais como:



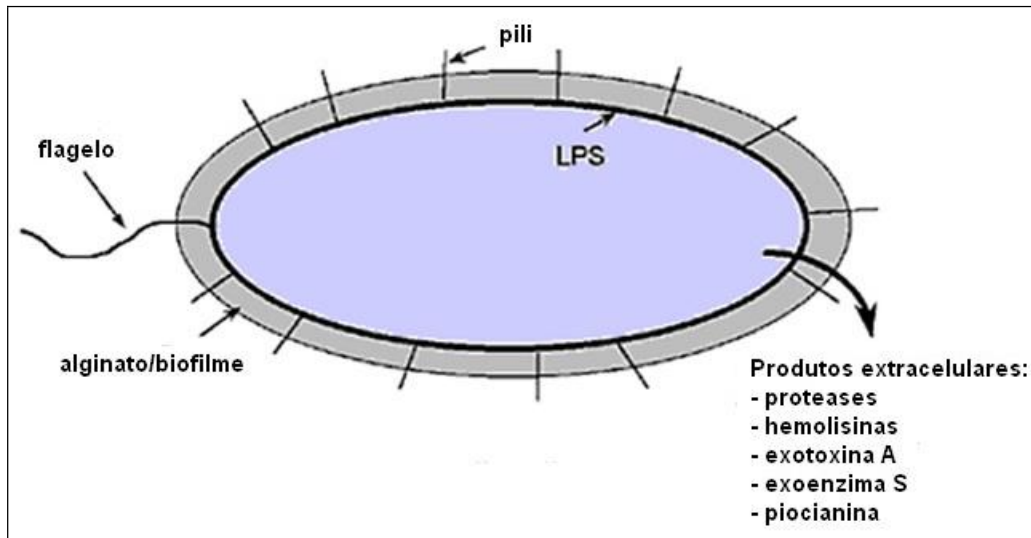


Figura 6: Factores de virulência da *Pseudomonas aeruginosa*.  
(Adaptação - [www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/vandelG.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/vandelG.htm), 25/09/2007))

- Polissacarídeo policapsular (alginato): polímero de polissacarídeo que confere ao microrganismo aparência mucóide (aderência à mucina e resistência parcial a mecanismos de defesa).
- Pili com adesina: apêndices superficiais que promovem a aderência do microrganismo.
- Exotoxina A: provoca necrose dos tecidos e tem acção idêntica ao da toxina diftérica (bloqueia a síntese de proteína).
- Exotoxina S: inibe síntese a proteica.
- Neuramidase: auxilia a adesão da bactéria, pois destrói o muco.
- Fosfolipase C: lise de membranas plasmáticas.
- Elastase: cliva inibidores de proteases leucocitárias e componentes do complemento.

- Leucocidina (toxina): leucotóxica
- Piocianina: inibidora dos movimentos ciliares e agente oxidante na produção de superóxidos. Presente no pus formado por estas bactérias.
- Resistência múltipla a antibióticos por possuir vários plasmídeos R.

### **1.3.3. Patogénese**

A bactéria ataca e coloniza a mucosa das membranas ou da pele. A invasão envolve três estágios: fixação e colonização, invasão local e doença sistémica disseminada. Este processo é promovido pelos pili, toxinas e enzimas descritas anteriormente.

(Resende C.-[http://www.radiobras.gov.br/ct/2002/materia\\_100502\\_5.htm](http://www.radiobras.gov.br/ct/2002/materia_100502_5.htm), 12/09/2007).

Muitas infecções por *Pseudomonas aeruginosa* são nosocomiais, ou seja, são adquiridas pelos doentes enquanto internados no hospital ou mesmo por outras pessoas em contacto com o meio hospitalar (Ferreira W. F. C., 2000).

Como *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria oportunista, os doentes imunossuprimidos são um grupo particularmente susceptível, podendo surgir infecções nas vias urinárias, no trato respiratório, em feridas, zonas queimadas, etc.

A importância clínica dos bacilos de Gram negativos não fermentadores, em particular *Pseudomonas aeruginosa*, tem aumentado significativamente dada a gravidade das infecções, das altas taxas de morbimortalidade em pacientes hospitalizados e do grande índice de resistência aos antibióticos (Torres J. C. N., 2006).

## 1.4. Resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos

*Pseudomonas aeruginosa* apresenta resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos, como por exemplo a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, as tetraciclina, o cloramfenicol e grande parte das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Dentre os mecanismos responsáveis pela resistência da bactéria destacam-se: a baixa permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas e produção de  $\beta$  - lactamases (Li X., 1994).

### 1.4.1. Resistência intrínseca

A resistência intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* resulta da sinergia entre o baixo nível de permeabilidade da membrana externa e dos sistemas de efluxo presentes nesta bactéria (Zhao Q., 1998).

- Baixa permeabilidade da membrana:

*P. aeruginosa* possui uma susceptibilidade muito baixa aos antibióticos hidrofóbicos, como os macrólidos. Estes antibióticos têm dificuldade em atravessar a membrana externa bacteriana. Do mesmo modo, os antibióticos hidrofílicos podem ser parcialmente bloqueados, precisando de utilizar os canais proteicos (porinas) na membrana externa para a atravessar e penetrarem na célula (Normark B. H., 2002).

As porinas da membrana externa (OMP) das bactérias de Gram negativo, são proteínas capazes de formar canais constituídos por água no seu interior que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana. A perda ou a diminuição da expressão dos genes que codificam as OMPs causam a redução da entrada de antibióticos na célula (Castanheira M. in Ferreira L. L., 2005).

A principal porina expressa por *P. aeruginosa* é a OprF, que é uma porina inespecífica, já que é utilizada por vários tipos de substratos que entram na bactéria incluindo, entre eles, os antibióticos. Uma característica marcante desta porina é a lenta difusão dos substratos através dela, o que explica a resistência intrínseca da bactéria a vários antimicrobianos. Dentre as porinas específicas expressas por *P. aeruginosa*, encontram-se aquelas utilizadas exclusivamente por determinados antibióticos. A mais relevante é a OprD, utilizada pelo Imipenemo, para atravessar a membrana externa. Durante o tratamento com este antibiótico podem surgir mutantes. A mutação não compromete a viabilidade bacteriana, uma vez que OprD não é essencial para promover a entrada da maioria dos nutrientes. A porina OprE (inicialmente denominada proteína E1) apresenta um elevado grau de homologia com a OprD, sendo específica para a entrada de cefalosporinas. A proteína E2 (inicialmente denominada proteína E) é utilizada para a penetração de cefalosporinas e quinolonas. Os mutantes deficientes destas porinas tornam-se resistentes aos antimicrobianos correspondentes (Yamano *et al* in Soares M. C. S. T., 2005).

- Mecanismo de efluxo:

As bombas de efluxo são proteínas de transporte, envolvidas na extrusão de substâncias tóxicas para fora da célula. Estas proteínas são encontradas em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, bem como em organismos eucariotas. As bombas de efluxo podem ser específicas para uma substância ou podem transportar compostos estruturalmente diferentes (incluindo antibióticos de várias classes) (Webber M. A., 2003).

A classificação dos sistemas de efluxo baseia-se em três critérios nomeadamente, a fonte de energia, a relação filogenética e a especificidade do substrato (Van Bambeke F., 2000). Sendo assim, existem cinco classes de famílias com diferentes sistemas de efluxo até agora identificadas: Small Multidrug Resistance (SMR), Resistance Nodulation Division (RND), a qual faz parte da superfamília das permeases RND, Major Facilitator Superfamily (MFS), a

superfamília de cassetes que ligam ATP e Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) (Schweizer H., 2003).

O sistema de efluxo de *Pseudomonas aeruginosa* pertence à classe RND. Este é composto por três proteínas principais: uma bomba dependente de energia, localizada na membrana citoplasmática, uma proteína da membrana externa que facilita a passagem do substrato e uma proteína de ligação entre estes dois componentes localizada no espaço periplasmático (Lambert P. A., 2002).

*Pseudomonas aeruginosa* codifica de um modo geral um número específico de sistemas de efluxo de resistência a múltiplos antibióticos (Multidrug Efflux – Mex), que inclui a MexAB-OprM (figura 7) e a MexXY-OprM. A acrescentar ainda a estes dois sistemas de resistência intrínseca, existem três sistemas adicionais, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexJk-OprM, todos eles adquiridos por mutação genética como consequência da sobre-expressão do sistema de efluxo. (Normak B.H., 2002, Schweizer H., 2003).

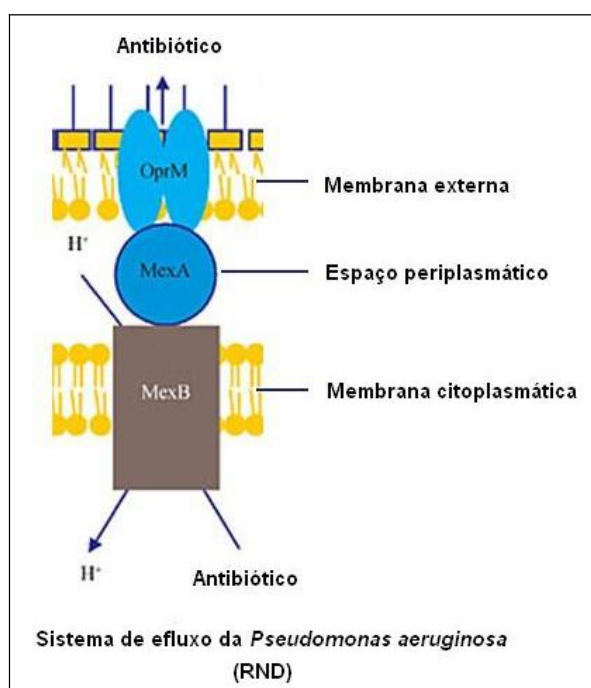


Figura 7: Diagrama esquemático do sistema de efluxo, do tipo RND, de *Pseudomonas aeruginosa*.

(Adaptação – Schweizer H. P., 2003)

MexAB-OprM é responsável pela extrusão de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e alguns desinfetantes. MexXY-OprM é responsável pela extrusão de aminoglicosídeos e MexEF-OprN pela a extrusão de carbapenemos e quinolonas (Lambert P.A., 2002).

#### **1.4.2. Resistência adquirida**

A resistência adquirida aos antibióticos ocorre por mutação na sequência que codifica um gene (mutações pontuais, deleções, inversões, etc. do material genômico) ou por transferência horizontal de genes. Para cada classe de antibióticos existe, normalmente, um número de mecanismos que causam resistência (Normark B. H., 2002).

Os mecanismos de resistência adquirida podem estar dentro de uma de cinco categorias, embora a bactéria possa utilizar mais do que um mecanismo ao mesmo tempo:

- Modificação enzimática ou destruição do antibiótico.
- Diminuição de entrada do antibiótico através da membrana externa.
- Sobre-expressão do sistema efluxo.
- Alteração ou produção de novos locais de alvo.
- Expressão aumentada do alvo do antibiótico (Barker K. F., 1999 e Cabrera C. E., 2007).

### 1.4.3. Resistência às quinolonas

As quinolonas (figura 8) são agentes antibacterianos de síntese, derivados do ácido nalidíxico (Ferreira W. F. C., 1998). Os derivados mais antigos, como a cinoxacina e os ácidos oxolínico, piromídico e pipemídico têm seu uso limitado nas infecções do tracto urinário e as gastroenterites causados por microrganismos de Gram negativo (Machado A., 1989). Actualmente, a maioria destes agentes usados na clínica são fluorados pois são consideravelmente mais eficazes e apresentam um maior espectro de acção, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphilococcus aureus*. A ciproflaxina e ofloxacina são activas contra *Mycobacterium tuberculosis* e micobatórias atípicas (Ferreira W. F. C., 1998). Os derivados mais recentes são bem absorvidos por via oral e alguns atingem níveis séricos e teciduais adequados ao tratamento de infecções sistémicas graves (Machado A., 1989).

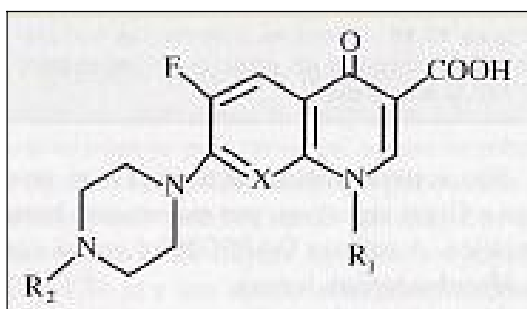


Figura 8: Estrutura química da molécula de Fluoroquinolona.  
(Adaptação – Ferreira W. F. C., 2000)

As fluoroquinolonas são compostos que têm como alvo duas enzimas homólogas, nomeadamente a DNA topoisomerase II (também referida por DNA girase) e topoisomerase IV que são essenciais no superenrolamento do DNA da bactéria. Ambas as enzimas são compostas por sub-unidades codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* (para DNA girase) e *parC* e *parE* (para a topoisomerase IV) (Woodford N., 2007).

Tanto a DNA girase como a topoisomerase IV actuam pela disrupção das duas cadeias do DNA. Estas enzimas são capazes de romper a cadeia de DNA,

passar a outra cadeia pelo local e reparar o local da ruptura. A DNA girase controla o superenrolamento do DNA, aliviando a tensão topológica que surge durante o processo de transcrição e replicação ao longo da cadeia do DNA. A topoisomerase IV é responsável pela separação das cadeias filha de DNA após a replicação do mesmo (decatenação) (Drlica,1997 e Rodriguez-Matrinez J. M., 2005).

- Mecanismo de acção:

As fluoroquinolonas inibem a síntese de DNA por interacção do antibiótico com o complexo formado pela união do DNA com os alvos da quinolona, a DNA girase e a topoisomerase IV (Rodriguez-Martinez J. M., 2005).

No caso da DNA girase, a reacção resulta na introdução (ou remoção) do superenrolamento do DNA, afectando assim o superenrolamento negativo do DNA necessário para iniciar a replicação do DNA e remover o superenrolamento positivo que se acumula na cadeia dupla atrás do garfo de replicação (Hooper D. C., 2001).

Para a topoisomerase IV, a reacção é resultado do bloqueio por parte do antibiótico da separação do DNA duplicado que se forma durante a replicação, isto facilita a segregação da molécula de DNA duplicada dentro da célula-filha (Hooper D. C., 2001).

- Mecanismo de resistência:

As quinolonas actuam inibindo a DNA girase e topoisomerase IV. A resistência às quinolonas é mediada por mutações na DNA girase, topoisomerase IV, bem como pelas mutações em genes que regulam os diferentes sistemas de efluxo. A DNA girase é o principal alvo das quinolonas em bactérias de Gram negativo. Na grande maioria das vezes a resistência observada deve-se a



mutações na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) dos genes da *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* (Kugelberg E., 2004).

As quinolonas mais antigas, como a ciprofloxacina e a ofloxacina, apresentam excelente actividade contra a DNA girase de bactérias de Gram negativo e contra as topoisomerase IV de bactérias de Gram positivo. A sua actividade contra a DNA girase de bactérias de Gram positivo e contra as topoisomerase IV de bactérias de Gram negativos é relativamente fraca. Dessa maneira, as bactérias podem tornar-se resistentes à ciprofloxacina através de mutações pontuais nos genes que codificam a enzima para a qual ela apresenta maior actividade, pois sua acção na outra enzima (Girase de Gram positivos ou Topoisomerasas IV de Gram negativos) não será suficiente para inibir adequadamente bactéria (Drlica e Zhao in Ito C. A. S., 2004).

*Pseudomonas aeruginosa* resistentes às quinolonas podem estar dentro de duas classes: resultantes de mutação nas enzimas-alvo (DNA girase) ou resultantes de mutações que ocorrem nos sistemas de efluxo (Hancock R. E. W., 1998).

As quinolonas actuam em quatro fases: passagem através das porinas presentes na parede bacteriana, atravessam a membrana e inibem a DNA girase (Gram negativos) ou topoisomerase IV (Gram positivos), induzindo o sistema de reparação SOS (Rodriguez-Martinez J. M., 2005). Ver figura 9.

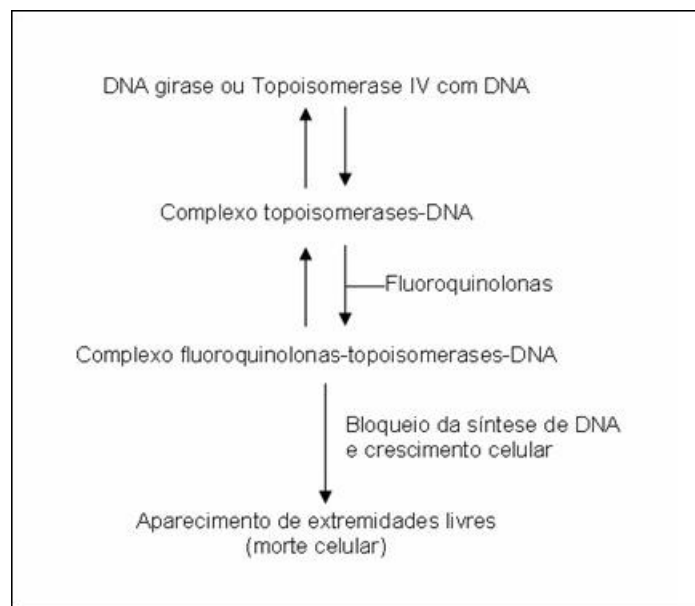


Figura 9: Diferentes fases do mecanismo de acção das fluoroquinolonas.  
(Adaptação – Rodriguez-Martinez J. M., 2005)

# **ENQUADRAMENTO E OBJECTIVO DO ESTUDO**

---



## 2. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVO DO ESTUDO

Objectivo prioritário do estudo efectuado consistiu na introdução e aprendizagem de algumas das técnicas que são rotineiramente realizadas num laboratório de biologia molecular. Assim, para além da simples execução de procedimentos, enquadrou-se o trabalho prático de forma a dar continuidade a um estudo anteriormente iniciado.

É já sabido que as quinolonas são os únicos antibióticos disponíveis para tratamento, via oral, de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. Contudo, *P. aeruginosa*, facilmente se torna resistente a este composto, o que limita a sua utilização. Um dos principais mecanismos de resistência a estes compostos deve-se ao aparecimento de mutações nos genes alvo *gyrA* e B, *parC* e E. Muito frequentemente, a resistência bacteriana a antibióticos deve-se à associação de múltiplos mecanismos que actuam em simultâneo, numa célula, conferindo resistência a um composto ou a grupos de compostos. Contudo, a ocorrência de mutações em alguns desses sistemas complementares pode levar a que apenas um dos mecanismos esteja activo.

Num trabalho anterior (Ferreira S. 2005) foi identificada uma nova mutação no codão 464 (serina - TCC → tirosina - TAC) do gene que codifica para a DNA girase B, numa estirpe clínica de *P. aeruginosa*, Pa30. Assim, o objectivo do presente trabalho foi verificar se esta nova mutação identificada estaria implicada na resistência às quinolonas, que se observou na estirpe Pa30. Para tal, a estratégia seleccionada consistiu na clonagem do gene contendo a mutação numa estirpe de *E. coli* sensível às quinolonas.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Isolados bacterianos

Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a quinolonas foram obtidos a partir de produtos biológicos de pacientes, de um hospital da região centro de Portugal (Hospital Infante D. Pedro, Aveiro). Estes isolados foram objecto de um estudo anterior (Caracterização genotípica e molecular de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a quinolona – S. Ferreira, 2005). Neste estudo, as estirpes bacterianas foram identificadas utilizando o Sistema Vitek (bioMérieux). Como estirpe de referência foi utilizada a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. De um total de trinta e cinco estirpes estudadas, em sete foram detectadas mutações no gene da *gyrB*.

No presente estudo foi seleccionada a estirpe Pa30, por possuir uma nova mutação no codão 464 que conduzia à alteração de um amino ácido (serina-TCC → tirosina-TAC).

#### 3.2. Conservação da amostra

A conservação dos isolados bacterianos foi realizada em glicerol à -20° C e por repicagens para meio fresco sempre que necessário.

#### 3.3. Amplificação do DNA por PCR

Para amplificação do gene da girase B da *Pseudomonas aeruginosa* (GenBank accession number AB00581) foram utilizados os seguintes "primers" – *gyrB\_FW* 5' – GCGCGTGAGATGACCCGCCGT-3' (nt 1162 a 1182) e *gyrB\_RV* 5' – CTGGCGGTAGAAGAAGGTCAG-3' (nt 1531 a 1551). Para amplificação desde a posição 1213 a 1455.

Os fragmentos foram ampliados num Perkin-Elmer 2400 Thermal Cycler, num volume de 50µl contendo: 0,3 µM de cada primer (MWG Bitech, Germany), 200 µM de cada nucleotídeo, 1X reacção tampão (buffer) com 10x (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 5% dimetilsufóxido, 1U de enzima Taq polimerase (MBI Fermentas) e 50 a 100 ng de DNA template purificado. Após um período inicial de desnaturação durante 3 minutos a 94°C seguiram-se 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), emparelhamento (30 segundos a 55°C) e alongação (1 minuto a 65°C ou 72°C) e um ciclo final de 65°C durante 16 minutos. A amplificação do DNA foi visualizada após eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio, para confirmação do tamanho do fragmento do gene *gyrB*.

### **3.4. Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose**

Os fragmentos de DNA separados em gel de agarose, foram purificados com QIAquick Gel Extraction Kit. Este protocolo é designado para extrair e purificar DNA de 70pb até 10kb de gel de agarose padrão ou "low-melt" em tampão TAE ou TEB. Podem ser processados até 400mg de agarose por coluna de centrifugação.

1. O fragmento de DNA é cortado do gel de agarose com um bisturi limpo e é colocado num *ependorf* de 1,5 ml previamente pesado.
2. O peso do pedaço de gel foi determinado. Foram adicionados 3 volumes de tampão QG por cada volume de gel.
3. Incubar o *ependorf* durante 10 minutos a 50°C (ou até a agarose estar totalmente dissolvida). Agitar o tubo no vórtex cada 2-3 minutos para ajudar a dissolver a agarose. Deixar a agarose dissolver totalmente.

4. Verificar se a cor da mistura após dissolução da agarose é amarela (igual à cor do tampão QG). O tampão QG tem um indicador de pH que é amarelo para  $\text{pH} \leq 7.5$ ; a adsorção do DNA à coluna é apenas eficiente nesta gama de pH's. Se a cor da mistura for amarela ou laranja, adicionar 10  $\mu\text{l}$  de acetato de sódio 3 M, pH 5,0 e misturar (a cor volta a amarelo).
5. Adicionar um volume de gel de isopropanol e misturar. Este passo aumenta o rendimento de fragmentos de DNA compreendidos entre 500 bp e 4 Kb.
6. Aplicar a amostra na coluna QIAquick e centrifugar por 1 min.
7. Descartar o líquido do tubo colector e colocar a coluna novamente no tubo colector.
8. Lavar adicionando 0,75mL do tampão PE na coluna QIAquick e centrifugar por 1 min.

### **3.5. Determinação da sequência**

A determinação da sequência nucleotídica do DNA amplificado foi efectuada pela empresa STAB Vida.

A análise das sequências nucleotídicas foi efectuada com o programa Bioedit 6.0.7 e a sequência resultante foi comparada com outras sequências depositadas na base de dados GenBank.

### **3.6. Preparação de células competentes pelo método de cloreto de sódio**

1. Crescer a estirpe de *E. coli* desejada em meio SOB sólido de 14 a 16 horas.

2. Inocular com duas ou três colónias 100 ml de meio SOB líquido. Incubar a 37 °C e a 250 r.p.m., até uma densidade óptica (DO600 nm) de 0,4 - 0,45.
3. Sedimentar as células por centrifugação a 3.000 r.p.m. durante 5 min. e a 4 °C.
4. Ressuspender o "pellet" em solução RF1 (1/3 do volume inicial) e manter as células em gelo durante 30 min.
5. Centrifugar como em 3., ressuspender as células em solução RF2 (1/12,5 do volume inicial) e manter em gelo durante 15 min. Repartir em alíquotas.

As células competentes podem ser usadas imediatamente ou podem ser conservadas a -70° C., sendo previamente congeladas em azoto líquido ou num banho de gelo seco e etanol.

Utilizar água tratada com carvão activo para preparar todas as soluções e meios de cultura, bem como lavar todo o material utilizado.

- Água tratada com carvão activo: misturar água com carvão activo (1 % p/v), agitar durante 48 horas e filtrar através de papel Whatman 3MM.
- Meio SOB sólido: Meio SOB contendo 2% de agar (Difco).
- Solução RF1: 100mM RbCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30mM acetato de potássio; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % (v/v) glicerol. Ajustar o pH a 5,8 com ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtração.
- Solução RF2: 10 mM MOPS, pH 7,0; 10 mM RbCl; 75mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % (v/v) glicerol. Ajustar o pH a 6,8 com NaOH e esterilizar por filtração.

### 3.7. Reacção de ligação

Para a reacção de ligação foram utilizados 5  $\mu$ L do produto de PCR purificado, 1  $\mu$ L do tampão 10x de ligação rápida, 1  $\mu$ L do vector pCR<sup>®</sup>2.1, 1  $\mu$ L da enzima T4 DNA ligase. Homogeneizar cuidadosamente e incubar a 14°C por no mínimo 4 horas (preferencialmente overnight). (TA Cloning<sup>®</sup> Kit – Invitrogen<sup>™</sup>).

### 3.8. Transformação de células competentes de *E. coli* (DH5a)

1. Descongelar as células competentes em gelo. Num "Eppendorf", misturar 5  $\mu$ l de da reacção de ligação com 100 $\mu$ l de células. Manter em gelo durante 20 min.
2. Submeter a mistura a um choque térmico de 42 °C durante 45 seg. Colocar as células novamente em gelo durante 2 min.
3. Adicionar 800  $\mu$ l de meio LB e incubar a 37 °C e 250 r.p.m. durante 1 hora para que se expresse a resistência ao antibiótico.

### 3.9. Selecção dos transformantes (pela cor)

Os plasmídeos pBluescript e pBC possuem um sistema de selecção pela cor das colónias quando se transformam numa estirpe de *E. coli* cujo gene *Z* do operão *lac* possui uma deleção na região próxima do operador (como é o caso da estirpe DH5a). Esta estirpe possui a enzima  $\beta$ -galactosidase inactiva devido à deficiência no gene *lacZ*.

Os plasmídeos pBluescript e pBC possuem um fragmento de DNA que compreende o promotor do gene *lacZ*, a sequência correspondente aos primeiros

146 amino ácidos do referido gene e, dentro da sequência codificante, um "polylinker" que não interrompe o início da leitura do gene incorporando alguns amino ácidos que não impedirão a actividade do péptido resultante da referida sequência.

As células de *E. coli*, transformadas com algum dos plasmídeos mencionados, recuperam a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase ao complementar a deficiência que possuem com o péptido codificado pelas sequências do plasmídeo. Este processo é denominado  $\alpha$ -complementação. Esta actividade da  $\beta$ -galactosidase confere cor azul às colónias quando são plaqueadas em meio suplementado com X-Gal e IPTG. Os clones que foram transformados por um plasmídeo no qual tenha sido introduzido um fragmento de DNA exógeno no seu "polylinker", não apresentarão cor azul na maioria dos casos. Este facto deve-se à introdução do fragmento que modificará o início da leitura, ou introduzirá codões de terminação que irão impedir a correcta expressão do péptido de 146 amino ácidos e conseqüentemente a complementação da deficiência da estirpe DH5 $\alpha$ . Desta forma, podem ser facilmente seleccionados pela sua cor branca os clones que incorporaram o fragmento que se tentou clonar.

O meio X-Gal contém, além dos componentes necessários para sustentar a multiplicação bacteriana normal, outros dois componentes essenciais. Um é o antibiótico ampicilina, que impede o crescimento de qualquer bactéria que não recebeu o gene de resistência.

### **3.10. Determinação do perfil de resistência às quinolonas**

O método utilizado consistiu numa modificação do método de Kirby Bauer.

As culturas a testar foram ajustadas para um valor de 0,5 na escala de Mac. Farland. Com uma zaragatoa inocularam-se as placas contendo meio Muller Hinton com cada uma das estirpes a testar. Sobre o meio foram colocados discos

impregnados de antibióticos (Ác. Nalidíxico – 30 µg/disco e Ciprofloxacina 5 - µg/disco). As placas foram incubadas numa estufa a 37 °C durante 24 horas. Findo este tempo foi realizada a leitura dos resultados por medição do diâmetro do halos de inibição produzidos.





## **RESULTADOS**

---



## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Amplificação do gene da DNA girase B**

A primeira etapa deste processo consistiu no isolamento do gene da DNA girase B mutado. Para tal, realizou-se o seguinte procedimento:

- Descongelamento e repicagem da estirpe Pa30.
- Amplificação por PCR do gene da DNA girase B contendo a mutação. Os "primers" utilizados para amplificação do gene *gyrB* incluem a região QRDR. O fragmento de 242 pb estende-se desde a posição dos nucleotídeos 1213 até 1455.
- Visualização da amplificação da DNA girase por eletroforese em gel de agarose.
- Confirmação do tamanho e localização do fragmento do gene da DNA girase.
- Após confirmação do tamanho e da localização da banda correspondente ao gene amplificado, a mesma foi extraída do gel e purificada utilizando o kit QIAquick gel extraction.

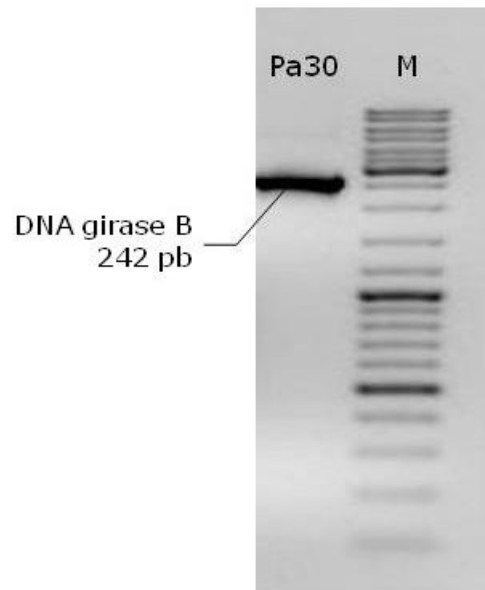


Figura 10: Gel de agarose após amplificação do gene *gyrB* da estirpe Pa30, contendo a mutação no codão 464 (serina-TCC → tirosina-TAC).

Após a verificação da sequência nucleotídica do gene em estudo, procedeu-se à clonagem do mesmo numa estirpe sensível de *E. coli* (DH5  $\alpha$ ).

#### 4.2. Reacção de ligação

A reacção de ligação é necessária para ligar o gene da DNA girase B a um vector que será incorporado em células competentes de *E. coli*. O vector utilizado para transformar células competentes foi o pCR<sup>®</sup>2.1. Este vector foi desenhado para a clonagem de produtos resultantes de amplificação por PCR. Uma característica da enzima *Taq* polimerase é a adição de desoxiadenosina (A) ao terminal 3' dos produtos de PCR, resultando em fragmentos específicos de DNA contendo terminais 3' protuberantes de A's. O vector pCR<sup>®</sup>2.1. foi construído de forma a ser um vector linear, com terminais protuberantes 3' contendo desoxitimina (T). Para além desta característica, o vector possui ainda outras características importantes normalmente presentes noutros vectores plasmídicos.

O vector contendo o fragmento de DNA que se pretendia clonar foi introduzido em células competente de *E. coli*. A estirpe escolhida para a transformação era sensível às quinolonas.

Terminado o processo de transformação iniciou-se a terceira etapa do estudo a selecção de transformantes que incorporaram o vector.

#### **4.3. Selecção de transformantes pela cor**

Foram seleccionadas várias colónias brancas, pois são estas as colónias que possuem o DNA exógeno. Neste fase do processo já se sabe que estas colónias contêm o vector mas, ainda não se sabe se o fragmento desejado ou seja o gene *gyrB* com a mutação que se pretende verificar e que confere resistência às quinolonas na estirpe Pa30, foi correctamente introduzido na estirpe sensível. No final deste processo foram obtidos 36 clones.

#### **4.4. Verificação da inserção do gene da *gyrB* por PCR**

Fez-se uma suspensão, de cada um dos clones seleccionados, em 25  $\mu$ l de água destilada; 1  $\mu$ l desta suspensão foi utilizado para efectuar uma nova reacção de PCR, com o objectivo de amplificar o gene *gyrB*; o produto desta amplificação foi visualizado, após electroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio, para confirmação do tamanho do fragmento.

Tal como se pode observar na figura 11, trinta e cinco dos clones possuíam um fragmento com o tamanho correcto.

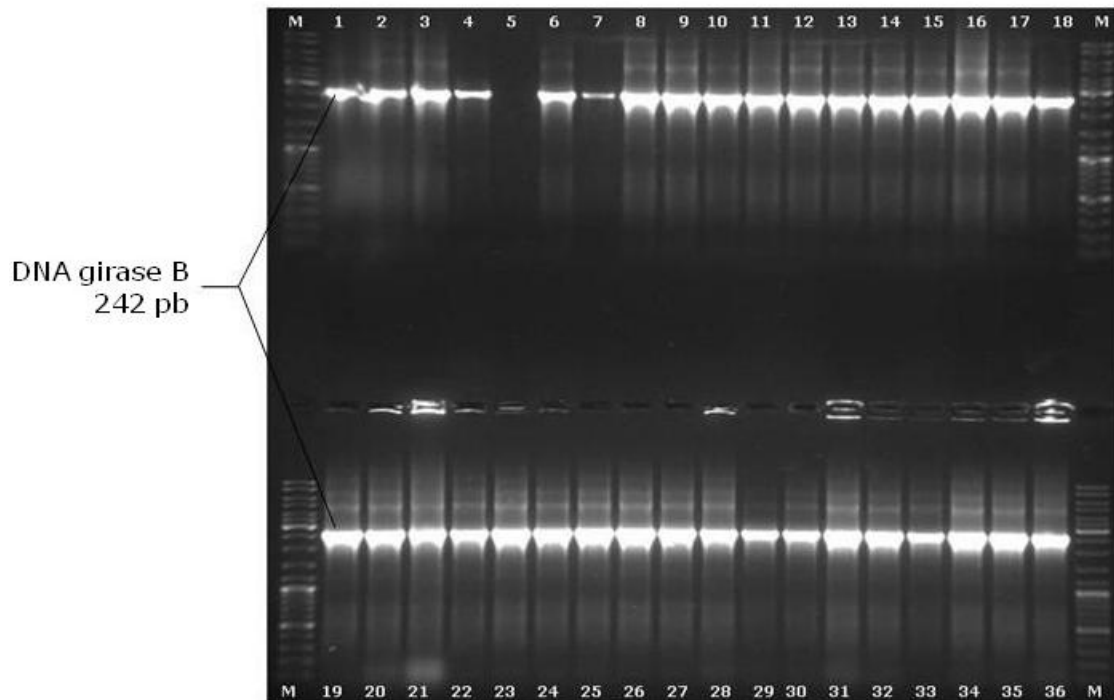


Figura 11: Gel de agarose após amplificação do gene *gyrB* nos clones seleccionados.

#### 4.5. Sequenciação do fragmento de 242 pb

Foram extraídas a partir do gel de agarose as bandas correspondentes ao produto de amplificação de dois dos clones. Estas bandas foram purificadas, tal como anteriormente descrito, e foram enviadas para sequenciação com o intuito de verificar se as mesmas possuíam a mutação anteriormente identificada no codão 464 (serina-TCC → tirosina-TAC) da QRDR da estirpe Pa30.

A análise da sequência do gene *gyrB* de umas das colónias transformadas revelou a presença da mutação no *gyrB* serina→tirosina da estirpe Pa30, conforme se pode observar nas figuras 12 e 13.

PA01	GYRB	AAACTGGCCG	ATTGCCAGGA	AAAGGACCCG	GCGCTCTCCG	AACTGTACAT	CGTGGGGGT	GCTCCGCGG	GCGGTCCGC
21F		AAACTGGCCG	ATTGCCAGGA	AAAGGACCCG	GCGCTCTCCG	AACTGTACAT	CGTGGGGGT	GCTCCGCGG	GCGGTCCGC
22	fw	AAACTGGCCG	ATTGCCAGGA	AAAGGACCCG	GCGCTCTCCG	AACTGTACAT	CGTGGGGGT	GCTCCGCGG	GCGGTCCGC
30	fw	AAACTGGCCG	ATTGCCAGGA	AAAGGACCCG	GCGCTCTCCG	AACTGTACAT	CGTGGGGGT	GCTCCGCGG	GCGGTCCGC
23	fw	AAACTGGCCG	ATTGCCAGGA	AAAGGACCCG	GCGCTCTCCG	AACTGTACAT	CGTGGGGGT	GCTCCGCGG	GCGGTCCGC
4	Fw	AAACTGGCCG	ATTGCCAGGA	AAAGGACCCG	GCGCTCTCCG	AACTGTACAT	CGTGGGGGT	GCTCCGCGG	GCGGTCCGC
PA01	GYRB	CAAGCAGGGC	CGCAATCGCC	GCACCCAGGC	GATCCTGCCG	CTCAGGGGC	AGTTCCTCAA	CGTCGAAAAG	GCGCGCTTCG
21F		CAAGCAGGGC	CGCAATCGCC	GCACCCAGGC	GATCCTGCCG	CTCAGGGGC	AGTTCCTCAA	CGTCGAAAAG	GCGCGCTTCG
22	fw	CAAGCAGGGC	CGCAATCGCC	GCACCCAGGC	GATCCTGCCG	CTCAGGGGC	AGTTCCTCAA	CGTCGAAAAG	GCGCGCTTCG
30	fw	CAAGCAGGGC	CGCAATCGCC	GCACCCAGGC	GATCCTGCCG	CTCAGGGGC	AGTTCCTCAA	CGTCGAAAAG	GCGCGCTTCG
23	fw	CAAGCAGGGC	CGCAATCGCC	GCACCCAGGC	GATCCTGCCG	CTCAGGGGC	AGTTCCTCAA	CGTCGAAAAG	GCGCGCTTCG
4	Fw	CAAGCAGGGC	CGCAATCGCC	GCACCCAGGC	GATCCTGCCG	CTCAGGGGC	AGTTCCTCAA	CGTCGAAAAG	GCGCGCTTCG
PA01	GYRB	ACNAGATGCT	CTCCTCCCG	GAGGTCCGTA	CGCTGATCAC	CGCCCTGGGC	TGTGGCATCG	GCCCGAGGA	ATACAAATC
21F		ACNAGATGCT	CTCCTCCCG	GAGGTCCGTA	CGCTGATCAC	CGCCCTGGGC	TGTGGCATCG	GCCCGAGGA	ATACAAATC
22	fw	ACNAGATGCT	CTCCTCCCG	GAGGTCCGTA	CGCTGATCAC	CGCCCTGGGC	TGTGGCATCG	GCCCGAGGA	ATACAAATC
30	fw	ACNAGATGCT	CTCCTCCCG	GAGGTCCGTA	CGCTGATCAC	CGCCCTGGGC	TGTGGCATCG	GCCCGAGGA	ATACAAATC
23	fw	ACNAGATGCT	CTCCTCCCG	GAGGTCCGTA	CGCTGATCAC	CGCCCTGGGC	TGTGGCATCG	GCCCGAGGA	ATACAAATC
4	Fw	ACNAGATGCT	CTCCTCCCG	GAGGTCCGTA	CGCTGATCAC	CGCCCTGGGC	TGTGGCATCG	GCCCGAGGA	ATACAAATC
PA01	GYRB	GCAAGCTTCG	GCTACCACAA	CATCATCATC	ATGCCGATG	CTGACGTCG	CGGTTCCGC	ATC	
21F		GCAAGCTTCG	GCTACCACAA	CATCATCATC	ATGCCGATG	CTGACGTCG	CGGTTCCGC	ATC	
22	fw	GCAAGCTTCG	GCTACCACAA	CATCATCATC	ATGCCGATG	CTGACGTCG	CGGTTCCGC	ATC	
30	fw	GCAAGCTTCG	GCTACCACAA	CATCATCATC	ATGCCGATG	CTGACGTCG	CGGTTCCGC	ATC	
23	fw	GCAAGCTTCG	GCTACCACAA	CATCATCATC	ATGCCGATG	CTGACGTCG	CGGTTCCGC	ATC	
4	Fw	GCAAGCTTCG	GCTACCACAA	CATCATCATC	ATGCCGATG	CTGACGTCG	CGGTTCCGC	ATC	

Figura 12: Sequenciação da DNA girase B de uma das colónias transformadas. O nucleótido alterado (C→A) está indicado a azul.

PA01	GYRB	KLADCQEKDP	ALSELYIVEG	DSAGGSAKQG	KNKKTQAILP	LKGKILNVEK
21F		KLADCQEKDP	ALSELYIVEG	DSAGGSAKQG	KNKKTQAILP	LKGKILNVEK
22	fw	KLADCQEKDP	ALSELYIVEG	DSAGGSAKQG	KNKKTQAILP	LKGKILNVEK
30	fw	KLADCQEKDP	ALSELYIVEG	DSAGGSAKQG	KNKKTQAILP	LKGKILNVEK
23	fw	KLADCQEKDP	ALSELYIVEG	DSAGGSAKQG	KNKKTQAILP	LKGKILNVEK
4	Fw	KLADCQEKDP	ALSELYIVEG	DSAGGSAKQG	KNKKTQAILP	LKGKILNVEK
PA01	GYRB	ARFDKMLSSQ	EVGTLITALG	CGIGREEYNI	DKLRYHNIII	MTDADVDGSH
21F		ARFDKMLSSQ	EVGTLITALG	CGIGREEYNI	DKLRYHNIII	MTDADVDGSH
22	fw	ARFDKMLSSQ	EVGTLITALG	CGIGREEYNI	DKLRYHNIII	MTDADVDGSH
30	fw	ARFDKMLSSQ	EVGTLITALG	CGIGREEYNI	DKLRYHNIII	MTDADVDGSH
23	fw	ARFDKMLSSQ	EVGTLITALG	CGIGREEYNI	DKLRYHNIII	MTDADVDGSH
4	Fw	ARFDKMLSSR	EVGTLITALG	CGIGREEYNI	DKLRYHNIII	MTDADVDGSH

Figura 13: Dedução da sequência de amino ácidos da *gyrB* da estirpe PA01 e da colónia transformante. A alteração do amino ácido está devidamente assinalada.

#### 4.6. Perfil de resistência às quinolonas

O perfil de resistência às quinolonas foi detectado por uma modificação do método de Kirby Bauer. Os resultados não revelaram a presença de zonas de inibição de crescimento em torno dos discos impregnados de antibiótico, nenhum dos clones apresentou resistência aos compostos testados, com halos de inibição entre 25 e 30 mm para os dois antibióticos testados. Para a estirpe sensível, o halo de inibição correspondia a um perfil de sensibilidade.





## **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

---



## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Tal como já foi referido, a realização deste trabalho teve como objectivo a aprendizagem de algumas técnicas de biologia molecular, constituindo assim uma mais valia no desempenho de funções no laboratório hospitalar.

Assim, e de forma a poder enquadrar a aplicação das distintas técnicas, o estudo foi conduzido de forma a averiguar se a mutação anteriormente encontrada no codão 464 da estirpe de *P. aeruginosa* Pa30 (Ferreira S., 2005), que conduzia à alteração do amino ácido serina para uma tirosina (serina - TCC → tirosina - TAC) no gene da *gyrB*, era responsável pela resistência às fluoroquinolonas.

A selecção de bactérias resistentes às quinolonas é influenciada por vários factores, nomeadamente i) pela estirpe bacteriana em causa; ii) o tipo de quinolona utilizada e sua concentração no local da infecção; iii) a relação entre a concentração e a CMI do antibiótico para o microrganismo em causa; iv) o tamanho da população bacteriana no local da infecção (Sierra J. M., 2005).

É já sabido que a resistência às quinolonas pode dever-se a alterações da membrana externa da bactéria, a mutações nos genes das DNA girase e topoisomerase IV, assim como por mutações no genes reguladores dos diferentes sistemas de efluxo. Estes três tipos de mecanismos de resistência podem manifestar-se individualmente ou numa combinação de diferentes mecanismos porém, acredita-se que o aumento da resistência às quinolonas se deve a uma associação de vários mecanismos secundários em simultâneo (Sierra J. M., 2005).

Os primeiros estudos realizados, centrados em *Escherichia coli*, mostraram que a resistência às quinolonas é produzida normalmente por mutações em regiões definidas das proteínas *gyrA* ou *gyrB*. As mutações nas regiões equivalentes das proteínas *parC* ou *parE* só acontecem depois de já existirem

mutações na DNA girase. Estas mutações produzem, em geral, elevado grau de resistência a estes fármacos. Por esse motivo, identificou-se a DNA girase como principal alvo das quinolonas. Contudo, estudos efectuados em *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* têm refutado a ideia de que isto é um comportamento geral (Taléns-Visconti R., 2002). Em algumas bactérias de Gram positivo a situação é diferente: as primeiras resistências aparecem por mutações produzidas na topoisomerase IV, enquanto que as mutações na DNA girase proporcionam resistências adicionais. Deste modo, em *S. aureus* a topoisomerase IV é o primeiro alvo das quinolonas (Taléns-Visconti R., 2002). Em *S. pneumoniae* a actividade bactericida pode ocorrer sobre a DNA girase, a topoisomerase IV ou ambas, dependendo da estrutura da quinolona. Isto é uma evidência importante já que, a relação entre a estrutura e actividade pode ser diferente para cada espécie bacteriana (Taléns-Visconti R., 2002).

Em bactérias de Gram positivo a primeira mutação ocorre na sub-unidade *parC* da topoisomerase IV e está associada com um baixo nível de resistência. A adição de uma segunda mutação na *gyrA* para formar uma dupla mutação *gyrA-parC* está associada com elevado nível de resistência. Ao contrário, em bactérias de Gram negativo as duas primeiras mutações ocorrem no gene *gyrA*, a terceira e quarta mutações no gene *parC*. A diferença no alvo das quinolonas acontece porque a DNA girase de bactérias de Gram positivo é menos susceptível à inibição pelas quinolonas do que a DNA girase em bactérias de Gram negativo (Hawkey P. M., 2003).

O desenvolvimento de resistência às fluoroquinolonas é um processo gradual, resultante da acumulação de substituições de amino ácidos nas sub-unidades dos genes alvo e, com o aumento do número de mutações geralmente correlacionando-se com CIMs cada vez mais elevadas (Woodford N., 2007). A maioria, mas não a totalidade das mutações, estão localizadas numa pequena porção dos genes alvo das quinolonas denominada "região determinante de resistência às quinolonas" (QRDR). Esta região ocorre na parte da enzima que liga o DNA. Em *E. coli* esta região da DNA girase localiza-se entre as posições 51 e 106, sendo que os codões localizados nas posições 83 e 87 são os preferenciais

para ocorrência de mutação (Woodford N., 2007). A troca de uma serina por um triprofano na posição 83 da QRDR é uma das mutações mais comuns no gene *gyrA* (Hooper D.C., 2001). Ao contrário, em *S. aureus* e em *S. pneumoniae*, o alvo inicial das mutações é, com maior frequência, o gene *parC*. Contudo, em estirpes com elevada resistência, surgem mutações adicionais no gene *gyrA* e *parE* (Woodford N., 2007).

Para as sub-unidades da *gyrB* e *parE* de bactérias resistentes, alterações dos amino ácidos, quando estão presentes, geralmente localizam-se na porção central da sub-unidade, num domínio envolvido nas interações com as suas sub-unidades complementares (*gyrA* e *parC*, respectivamente). Regra geral, mutações nas sub-unidades *gyrB* e *parE* são menos frequentes do que as que ocorrem nos genes *gyrA* ou *parC* (Hooper, D. C., 2001).

O primeiro mecanismo de resistência de *P. aeruginosa* que ocorre em resposta a uma única exposição às quinolonas, em concentrações perto do CMI, é o efluxo do antibiótico e não a alteração da DNA girase. Embora mutações da DNA girase possam conferir um mais elevado nível de resistência, ao que parece, estas mutações ocorrem com menor frequência do que a activação do sistema de efluxo. A activação do mecanismo de efluxo, quer por mutação quer por um aumento transitório da sua expressão poderia evitar acumulação citosólica significativa das quinolonas e, por conseguinte, aumentar o tempo de vida da célula bacteriana. Numa posterior exposição ao antibiótico, subseqüentes mutações como, por exemplo, no gene da DNA girase, iriam então permitir um novo aumento do nível de resistência. (Köller T., 1997).

Como foi referido anteriormente, em bactérias de Gram negativo, a DNA girase tende a ser o principal alvo das fluoroquinolonas. Mutações na *gyrA* são encontradas em isolados com baixo nível resistência, enquanto que CMIs superiores estão associados a mutações adicionais, em particular no gene *parC*, mas também no gene *gyrB* e, menos frequentemente, no gene *parE*.

Em *P. aeruginosa* muitos estudos incidiram sobre a sub-unidade A (*gyrA* e *parC*) e pouco se conhece sobre a sub-unidade B (*gyrB* e *parE*).

Mouneimné H. (1999) descreveu pela primeira vez uma mutação, no gene da *gyrB* de *P. aeruginosa*, que parecia conferir resistência às fluoroquinolonas. Esta mutação foi identificada no codão 464 e conduzia a uma substituição de uma serina para uma fenilalanina e estava localizada fora da QRDR da *gyrB* descrita em *E. coli* e em *S. aureus*. Mutações idênticas foram descritas em estirpes resistentes às quinolonas de *S. enterica typhimurium* no codão 464 onde foram identificadas as mutações: TCC (serina) para TAC (tirosina) e TCC (serina) para TTC (fenilalanina).

Akasaka T. (2001), num estudo com 150 isolados clínicos de *P. aeruginosa* encontrou a mesma mutação descrita por Mouneimné (1999) no codão 464 que levava à alteração de uma serina para fenilalanina. Neste mesmo estudo as principais alterações encontradas foram na *gyrA*, no codão 83, onde uma treonina era substituída por uma isoleucina e na sub-unidade *parC*, codão 87, em que ocorria uma alteração de uma serina para uma leucina.

Gruger T. (2004) num estudo sobre mutações da *gyrA* em *E. coli* concluiu que a mutação de um único codão da *gyrA* (serina para triptofano, no codão 83), está associada a um elevado nível de resistência às quinolonas.

No presente estudo, a mutação identificada na estirpe *P. Aeruginosa* Pa30 no codão 464 da sub-unidade *gyrB* da DNA girase (serina-TCC → tirosina-TAC) aparentemente conduzia a um aumento da resistência desta estirpe às quinolonas. Esta mutação tinha sido anteriormente descrita em outras espécies, mas não em *Pseudomonas aeruginosa* (Ferreira S., 2005).

Após clonagem do gene *gyrB*, contendo a mutação referida anteriormente, numa estirpe sensível de *E. coli*, foi avaliado o perfil de sensibilidade/resistência a duas quinolonas: ácido nalidíxico e ciprofloxacina. Os resultados mostraram

que quer os clones, contendo o gene *gyrB* com a mutação descrita, quer a estirpe sensível de *E. coli*, mantinham o seu perfil de sensibilidade às quinolonas. Assim, os resultados sugerem que, de facto, a nova mutação detectada parece não ter nenhum papel relevante no perfil de resistência às quinolonas observado na estirpe Pa30. Por outro lado, a susceptibilidade observada nos clones mostra ainda que, muito provavelmente, na estirpe Pa30 outros mecanismos, que contribuem para a resistência desta estirpe, possam estar a ser usados em simultâneo, justificando assim o perfil de resistência deste isolado.

Contudo, outras metodologias mais adequadas poderão vir a ser aplicadas na estirpe Pa30, com o intuito de verificar se a introdução de uma nova mutação no codão 464, por mutagénesis, tem alguma influência no perfil de resistência desta estirpe às quinolonas.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Embora as técnicas moleculares tenham uma grande utilidade em várias áreas de estudo, nomeadamente na identificação de genes de resistência a antibióticos, actualmente estas ainda não são muito utilizados na rotina laboratorial de muitos hospitais. Assim, o trabalho prático efectuado constituiu uma mais valia na aprendizagem destas metodologias, num contexto específico, mas que pode também ser aplicado em diferentes estudos. Como exemplo, pode referir-se a sua aplicação na área da patologia clínica, nomeadamente, no diagnóstico de doenças relacionadas com polimorfismos como, por exemplo, a variante da protrombina 2010 (G→A) que está relacionada com um maior risco de trombose.





## **BIBLIOGRAFIA**

---



## 7. BIBLIOGRAFIA

- Akasaka T., Tanaka M., Yamaguchi A., e Sato K., (2001). Type II Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone-Resistant Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in 1998 and 1999: Role of Target Enzyme in Mechanism of Fluoroquinolone Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8):2263–2268.
- Alonso A., Sánchez P. e Martínez J. L., (2001). Environmental Selection of Antibiotic Resistance Genes, *Environmental Microbiology*, 3 (1), 1–9.
- Andriole V. T. (2005). The Quinolones: Past, present, and future, *Clinical Infectious Diseases*, 41:(S2)113–119.
- Anglada R.R., (1997). Microbiología sanitaria y clínica. Madrid: Editorial Síntesis, 1ª Edição, pp. 255-295, 495–497.
- Aubry A., Pan X., Fisher L. M., Jarlier V. e Cambau E., (2004). *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: Interaction with quinolones and correlation with Antimycobacterial drug activity, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4):1281–1288.
- Barker K. F., (1999). Antibiotic resistance: a current perspective. *J Clin Pharmacol.*, 48:109–124.
- Barlow R. S., Pemberton J. M., Desmarchelier P. M. e Gobius K. S., (2004). Isolation and characterization of Integron-Containing Bacteria without antibiotic selection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3):838–842.

- Bertolla F., Kay E. e Simonet P., (2000). Potential dissemination of antibiotic resistance genes from transgenic plants to microorganisms, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21:390–393.
- Bouvier M., Demarre G. e Mazel D., (2005). Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate, *The EMBO Journal*, 24:4356–4367.
- Brooks G. F., J. S. Batel e S. A. Morse, (2001). *Medical Microbiology*. McGraw-Hill of Portugal, 22<sup>a</sup> edition, pp. 88-108, 144–159.
- Cabrera C. E., Gómez R.L F. e Zúñiga A. E., (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes - Una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación, *Colombia Médica*, 38(2):149–158.
- Cantón R., Girón R., Martínez-Martínez L., Oliver A., Solé A., Valdezate S. e Máiz L., (2002). Patógenos multirresistentes en la fibrosis quística, *Arch Bronconeumol*, 38(8):376–85.
- Collis C. M. e Hall R. M., (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:155–162.
- Cornaglia G., Lönnroth A., Struelens M. e Participants in the Conference, (2004). Report from the European conference on the role of research in combating antibiotic resistance, *Clinical Microbiology Infection*, 10:473–497.
- Correia M. J. P., (2003). Caracterização molecular da resistência aos antibióticos em estirpes hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*. Tese Mestrado – Universidade de Aveiro.

- 
- Davey P., Pagliari C. e Hayes A., (2002). The Patient's Role in the Spread and Control of Bacterial Resistance to Antibiotics, *Clinical Microbiology and Infection*, 8(2):43–68.
  - Drlica K. e Zhao X., (1997). DNA gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(3):377–392.
  - Emmerson A. M. e Jones A. M., (2003). The quinolones: decades of development and use, *Journal Of Clinical Microbiology*, 51(S1):13–20.
  - Ferreira L. L., (2005). Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas Aeruginosa*, Tese Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz.
  - Ferreira S. C. N. (2005). Caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a quinolonas; Tese de Mestrado – Universidade de Aveiro.
  - Ferreira W. F. C., (2000). Microbiologia – Volume 2. Portugal: Lidel – Edições Técnicas, 1ª Edição, pp.123–135.
  - Ferreira W. F. C., (1998). Microbiologia – Volume 1. Portugal: Lidel – Edições Técnicas, 1ª Edição, pp.125-137, 239–269.
  - Gales A.C., Pignatari A.C., Jones R.N., Baretta M. e Sader H.S., (1997). Avaliação da atividade in vitro dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. *Rev Ass Med Brasil*, 43(2):137–44.
  - García C. P., (2002). Ventajas y problemas de los métodos automatizado de estudio de susceptibilidad *in vitro*, *Rev. Chil. Infect*, 19(2):96–100.

- Gherardi G, Fallico L., Del Grosso M., Bonanni F., D'Ambrosio F., Manganello R., Palu G., Dicuonzo G. e Pantosti A. (2007). Antibiotic-resistant invasive Pneumococcal clones in Italy, *Journal Of Clinical Microbiology*, 45(2):306–312.
- Gotoh N., Kusumi T., Tsujimoto H., Wada T. e Nishino T.,(1999). Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*, *FEBS Letters*, 458:32–36.
- Grkovic S., Brown M. H. e Skurray R. A., (2002). Regulation of bacterial drug export systems, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(4):671–701.
- Gruger T., Nitiss J. L., Maxwell A., Zechiedrich E. L., Seeber S., Pommier P., Strumberg D., (2004). A Mutation in *Escherichia coli* DNA gyrase conferring quinolone resistance results in sensitivity to drugs targeting eukaryotic Topoisomerase II, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12): 4495–4504.
- Hawkey P. M., (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(S1):29–35.
- Hancock R. E. W., (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria, *Clinical Infectious Diseases*, 27(S1):S93–S99.
- Hollanda L. M., (2001). Caracterização molecular de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com fibrose cística. Tese de Mestrado – Universidade de Campinas.
- Hooper D. C., (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance, *Special Issue*, 7(2):337–341.

- 
- Hooper D. C., (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer Fluoroquinolones, *Clinical Infectious Diseases*, 31(2):S24–8.
  - Hooper D. C., (2000). New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance, *Clinical Infectious Diseases*, 30:243–54.
  - Ito C. A. S., (2004). Ácido nalidíxico como marcador preditivo de sensibilidade às Fluoroquinolonas em *Escherichia coli* isoladas de urocultura. Tese de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.
  - Jacoby G. A., (2005). Mechanisms of resistance to quinolones, *Clinical Infectious Diseases*, 41(S2):120–126.
  - Jalal H., Organji S., Reynolds J., Bennett D., O'Mason Jnr E., Millar M. R., (1997). Determination of penicillin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* using the Polymerase Chain Reaction, *Clin Pathol: Mol Pathol*, 1(50):45–50.
  - Keith F. B., *Antibiotic Resistance: A Current Perspective*, (1999). Blackwell Science Ltd *Br J Clin Pharmacol*, 48:109–124.
  - Köhler T., Michea-Hamzehpour M., Plesiat P., Kahr A. e Pechere J., (1997). Differential selection of multidrug efflux systems by Quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11):2540–2543.
  - Kugelberg E., Löfmark S., Wretling B. e Andersson D. I., (2005). Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55:22–30.
  - Kunin C. M., (1993). Resistance to antimicrobial drugs - A worldwide calamity, *Annals of Internal Medicine*, 118(7):557–561.

- Lambert P. A., (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(41):22–26.
- Lapierre P., Huletsky A., Fortin V., Picard F.J., Roy P., Ouellette M. e Bergeron M. G., (2003). Real-Time PCR assay for detection of fluoroquinolone resistance associated with *griA* mutations in *Staphylococcus aureus*, 41(7): 3246–3251.
- Levin B. R. and Bergtrom C. T., (2000). Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about mechanisms of adaptive evolution in Prokaryotes, *PNAS*, 97 (13):6981–6985.
- Li X., Nikaido H. e Poole K., (1995). Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic Efflux in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(9):1948–1953.
- Li X., Livermore D. M. and Nikaido H., (1994). Role of Efflux Pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to Tetracycline, Chloramphenicol, and Norfloxacin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(8):1732-1741.
- Loureiro M. M., de Moraes B. A., Mendonça V. L. F., Quadra M. R. R., Pinheiro .G. S., Asensi M. D., (2002). *Pseudomonas aeruginosa*: Study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(3):387–394.
- MacKenzie F. M., Struelens M. J., Towner K. J. e Gould I. M. on Behalf of the ARPAC Steering Group and the ARPAC Consensus Conference Participants (2005). Report of the consensus conference on antibiotic resistance; prevention and control (ARPAC), *Clinical Microbiology Infection*, 11:937–954.



- 
- Mao W., Warren M. S., Lee A., Mistry A. e Lomovskaya O., (2001). MexXY-OprM Efflux Pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:2001–2007.
  - Martin S. L. e Garfinkel D. J., (2003). Survival strategies for transposons and genomes, *Genome Biology*, 4:313.
  - Martinez J. L. e Baquero F., (2000). Mutation frequencies and antibiotic resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7):1771-1777.
  - Martineau F., Picard F. J., Lansac N., Ménard C., Roy P. H., Ouellette M. e Bergeron M. G., (2000). Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (2):231–238.
  - Moore J. E., Millar B. C., Yongmin X., Woodford N., Vincent S., Goldsmith C. E., McClurg R. B., Crowe M., Hone R., Murphy P. G. (2001). A rapid molecular assay for the detection of antibiotic resistance determinants in causal agents of infective endocarditis, *Journal of Applied Microbiology*, 90(5):719–726.
  - Mouneimné H., Robert J., Jarlier V., e Cambau E.,(1999). Type II Topoisomerase mutations in Ciprofloxacin-Resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, 43(1):62–66.
  - Nagel R., (2000). La Resistencia de las bacterias a los antibióticos. ¿Un camino sin retorno?, *Ciencia Hoy*, 10 (59).
  - Normark B. H. e Normark S., (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance, *Journal of Internal Medicine*, 252:91–106.

- Nouér S. A., (2005). Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Páez G. A. C., Sánchez M. A., Morales M. Z., (2005). Resistencia de *Escherichia coli* a las fluoroquinolonas, Revista de la Facultad de Medicina, 10(1):7-16.
- Paviani E. R., Stadnik C. B., Heinek I., (2004). Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas Aeruginosa*, Infarma, 15(11-12):66-70.
- Pereira A. S., (2004). Avaliação do perfil de sensibilidade da similaridade genética e da presença do gene *qnr* em amostras de *Escherichia coli* resistentes à ciproflaxina isolados em hospitais brasileiros, Tese de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo.
- Peterson L. R., (2005). Squeezing the antibiotic balloon: The impact of antimicrobial classes on emerging resistance, Clinical Microbiology Infection, 11(5):4-16.
- Piddock L. J. V., (1994). New quinolones and Gram-positive bacteria, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38(2):163-169.
- Pukatzki.S., Kessin R. H., e Mekalanos J. J., (2002). The human pathogen utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, PNAS, 99(5):3159-3164.
- Remonato G., Bolzan V., Zanchi A. C. e D'azevedo P. A., (2005). Detecção Molecular da Resistência Bacteriana - Ênfase para *Enterococcus* e *Streptococcus*, NewsLab, 70:100-112.

- 
- Reinhardt A., Köhler T., Wood P., Rohner P., Dumas J., Ricou B. e van Delden C., (2007). Development and persistence of antimicrobial resistance in : a longitudinal observation in mechanically ventilated patients, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(4):1341–1350.
  - Richter S. N., Giaretta G., Comuzzi V., Leo E., Mitchenall L. A., Mark Fisher L., Maxwell A. e Palumbo M., (2007). Hot-spot consensus of fluoroquinolone-mediated DNA cleavage by Gram-negative and Gram-positive type II DNA topoisomerases, *Nucleic Acids Research Advance*, 1:1–11.
  - Riverón F. F., Hernández J. L., Martínez P. L. M. e Betarte C. M., (2003). Resistencia bacteriana, *Rev Cubana Med Milit.*, 32(1):44–8.
  - Rodríguez-Martínez J. M., (2005). Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 23(1):25–31.
  - Rojo M. I., (1999). Ingeniería genética y transferencia génica. Madrid: Ediciones Pirámide, 1ª Edição, pp. 85–99.
  - Rupf S., Kneist S., Merte K., Eschrich K., (1999). Quantitative determination of *Streptococcus mutans* by using competitive Polymerase Chain Reaction, *Europe Journal Oral Sciences*, 107:75–81.
  - Ruiz J., (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA *gyrase* protection, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51:1109–1117.
  - Santos B. A., (2004). As infecções respiratórias em crianças e a resistência bacteriana: um desafio para o pediatra, *Revista da AMRIGS*, (2):73–152.

- Schweizer H. P., (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in and related bacteria: unanswered questions, *Genetic and Molecular Research*, 2(1):48–62.
- Sierra J. M., Cabeza J. G., Chaler M. R., Montero T., Hernandez J., Mensa J., Llagostera M. e Vila J. (2005). The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11:750–758.
- Silveira G. P., Nome F., Gesser J. C., Sá M. M., Terenz H., (2006). Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana, *Química Nova*, 29 (4):844–855.
- Soares M. C. S. T., (2005). Estudo da resistência aos antimicrobianos em amostras de isoladas em hospitais da cidade de Niterói – R.J., Tese Mestrado - Universidade Federal Fluminense.
- Sörberg M., Farra A., Ransjö U., Gårdlund B., Rylander M., Settergren B., Kalin M. e Kronval G., (2003). Different trends in antibiotic resistance rates at a university teaching hospital, *Clinical Microbiology Infection*, 9:388–396.
- Stansfield W. D., Colomé J. S. e Cano R. J., (1998). *Biologia Molecular e Celular*. Lisboa: McGraw-Hill, 1ª Edição, pp. 206–219.
- Stefania S., Agodi A., (2000). Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13:143–153.
- Stehling E. G., (1999). Estudo comparativo dos fatores de virulência de isoladas de fibrose cística e outras infecções, Tese Mestrado – Universidade de Campinas.

- 
- Stokes H. W., Holmes A. J., Nield B. S., Holley M. P., Nevalainen K. M. H., Mabbutt B. C., e Gillings M. R., (2001). Gene cassette PCR: Sequence-Independent recovery of entire genes from environmental DNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11):5240–5246.
  - Soulsby E. J., (2005). Resistance to Antimicrobials in Humans And Animals, *BMJ*, 331:1219–1220.
  - Souza E. C., (1999). Las Bactéria Resistentes, Una Guerra Casi Perdida. *Ciencia Hoy*, 9 (50).
  - Taléns-Visconti R., Garrigues T.M. e Cantón E., (2002). Mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas, *Revista Española de Quimioterapia*, 15(1):313–324.
  - Thomson K. S., (2000). Minimizing quinolone resistance: the new agents more or less likely to cause resistance?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45:719–723.
  - Torres J. C. N., Menezes E. A., Ângelo M. R. F., Oliveira I. R. N., Salviano M. N. C., Xavier D. E., Santos Filho L., (2006). Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalobetalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. *J Bras Patol Med Lab*, 42(5):313–319.
  - Tortora G. J., Funke B. R. e Case C. L., (2003). *Microbiologia*. São Paulo: Artmed Editora, 6ª Edição, pp. 207–235, 531–552.
  - Ueno M., Jorge A. O. C., (2002). Comparação de técnicas moleculares de análise de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, *Revista Biociência*, 8(2):43–50.

- Van Bambeke F., Michot J.-M., Van Eldere J. e Tulkens P. M., (2005). Quinolones in 2005: an update, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11:256–280.
- Van Bambeke F., Glupczynski Y., Plésiat P., Pechère J. C. e Tulkens P. M., (2003). Antibiotic Efflux Pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51:1055–1065.
- Van Bambeke F., Balzi E. e M.Tulkens P., (2000). Antibiotic Efflux Pumps, *Biochemical Pharmacology*. 60:457–470.
- Van Delden C. e Iglewski B. H., (1998). Cell-to-Cell Signaling and Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4):551–560.
- Vasconcelos U. e Calazans G. M. T., (2006). Antibiogramas de linhagens de de diferentes ambientes aquáticos. *Revista de Patologia Tropical*. 35(3):241–244.
- Videira A., (2001). *Engenharia Genética - Princípios e Aplicações*. Lisboa: Editora Lidel, 1ª Edição, pp. 67–70.
- Vives-Flórez M., Garnica D., (2006). Comparison of virulence between clinical and environmental isolates. *International Microbiology*. 9:247–252.
- Vizváryová M. and Valková D., (2004). Transposons - the useful genetic tools, *Biologia, Bratislava*, 59(3):309–318.
- Wagner A., Lewis C. e Bichse M., (2007). A survey of bacterial Insertion Sequences using IScan, *Nucleic Acids Research*. 35(16):5284–5293

- 
- Webber M. A. e Piddock L. J. V., (2003). The importance of Efflux Pumps in bacterial antibiotic resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51:9–11.
  - Webber M., Piddock L. J. V., (2001). Quinolone resistance in *Escherichia coli*, *Vet. Res.*, 32:275–284.
  - Westin L., Miller C., Vollmer D., Canter D., Radtkey R., Nerenberg M. and O’Connell J. P., (2001). Antimicrobial resistance and bacterial identification utilizing a microelectronic chip array, *Journal Of Clinical Microbiology*, 39 (3):1097–1104.
  - Woodford N. e Ellington M. J., (2007). The Emergence of antibiotic resistance by mutation, *Clinical Microbiology Infection*, 13:5–18.
  - Yatsuyanagi J., Saito S., Harata S., Suzuki N., Ito Y., Amano K. e Enomoto K., (2004). Class 1 Integron containing Metallo-Lactamase Gene *blaVIM-2* in clinical strains isolated in Japan, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2):626–628.
  - Zhao Q., Li X., Mistry A., Srikumar R., Zhang L., Lomovskaya O., e Poole K., (1998). Influence of the TonB Energy-Coupling protein on Efflux-Mediated multidrug resistance in , *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9):2225–2231.

