



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Robson de Souza Leão

**O sistema de reparo do DNA em *Pseudomonas aeruginosa*:
caracterização molecular e ocorrência natural de mutantes**

Rio de Janeiro
2009

Robson de Souza Leão

O sistema de reparo do DNA em *Pseudomonas aeruginosa*: caracterização molecular e ocorrência natural de mutantes

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth de Andrade Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Rio de Janeiro

2009

Robson de Souza Leão

O sistema de reparo do DNA em *Pseudomonas aeruginosa*: caracterização molecular e ocorrência natural de mutantes

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 27 de agosto de 2009.

Co-orientador:

Prof. Dr. Afonso Luis Barth
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Elizabeth de Andrade Marques (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Maciel Plotkowski
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^a. Dr^a. Ana Paula D. Carvalho-Assef
Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – FIOCRUZ

Prof. Dr. Rafael Silva Duarte
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTCA CB/A

L437 Leão, Robson de Souza.
O sistema de reparo do DNA em *Pseudomonas aeruginosa*:
Caracterização molecular e ocorrência natural de mutantes /
Robson de Souza Leão. – 2009.
178 f. : il.

Orientadora: Elizabeth de Andrade Marques.
Co-orientador: Afonso Luis Barth.

1. Reparo do DNA – Teses. 2. *Pseudomonas aeruginosa* –
Teses. 3. Mutação – Teses. 4. Fibrose cística – Teses. 5. Biologia
Molecular – Teses. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Barth,
Afonso Luis. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.8

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

DEDICATÓRIA

À minha orientadora Beth,
pelo compromisso, carinho e exemplo.

AGRADECIMENTOS

Ao pai celestial pela proteção no dia de ontem e no dia de hoje.

Aos meus pais, pelo carinho e exemplo de trabalho e honestidade.

Às minhas irmãs pelo incentivo de sempre e aos meus lindos sobrinhos (Rômulo, Rafael e Miguel) que entenderam os momentos de ausência.

À minha orientadora e amiga, Prof^a Elizabeth, que durante os últimos 12 anos de parceria sempre acreditou em mim, até mesmo nos momentos em que eu mesmo já não acreditava.

Ao Prof. Afonso pela atenção e ajuda na execução deste trabalho.

Ao Dr. Tyrone Pitt, que prontamente me recebeu em seu departamento, ajudando-me em todos os momentos em que fiquei em Londres, não só os científicos, mas até mesmo nos problemas com o idioma.

Aos profissionais do Health Protection Agency (HPA), especialmente a Dervla Kenna, Jane Turton, Jorge Matos, Juliana Coelho, Lianne Yearwood e Susannah Yarde pelas contribuições científicas e pela paciência comigo, que nunca entendia uma piada.

Aos meus grandes amigos, na certeza de poder contar em todos os momentos da minha vida: Daniel Goldenberg, Graziella Matioszek, Rachel Ribeiro, Sílvia Torres, Maicon Jéferson, Marta Santana e Tatiana Gonçalves.

Ao Alex Guerra e Márcia Jones, pela parceria desenvolvida.

Aos companheiros do laboratório 2: Géssica Rocha, Elenice Rosa, Luciene Silva, Marcus Santos, Rosana Helena e Selma Pereira, por todo suporte e bagunça durante essa jornada.

À Dr^a. Ana Paula Carvalho-Assef pela ajuda e discussão científicas que foram imprescindíveis nesse trabalho.

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, aqui representada pela Prof^a Maria Cristina Maciel Plotkowski.

A todos os professores e funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas, pela ajuda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro para a execução desse projeto.

Creio muito na sorte.
Quanto mais trabalho, mais sorte pareço ter.

Emerson

RESUMO

LEÃO, Robson de Souza. *O sistema de reparo do DNA em Pseudomonas aeruginosa: caracterização molecular e ocorrência natural de mutantes*. 2009. 166 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A infecção pulmonar é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com Fibrose Cística (FC). O prognóstico destes pacientes é influenciado pelo número de exacerbações anuais e a carga microbiana nas secreções respiratórias. *Pseudomonas aeruginosa* é o principal patógeno, tanto em importância quanto em prevalência. Recentemente, foi demonstrada a ocorrência de cepas de *P. aeruginosa* altamente transmissíveis em centros de atendimento a pacientes com FC. A persistência de *P. aeruginosa* no pulmão de pacientes com FC está associada, em parte, à presença de cepas com hipermutabilidade (HPM), um fenômeno decorrente, principalmente, de defeitos em genes envolvidos no sistema de reparo do DNA. Tivemos como objetivo investigar a ocorrência de cepas HPM em *P. aeruginosa*, associadas às infecções pulmonares crônicas em pacientes com FC, bem como, avaliar a associação entre HPM, resistência a antimicrobianos e expressão de fatores de virulência. Das 179 amostras bacterianas estudadas, isoladas de 17 (85%) dos 20 pacientes incluídos no estudo, 43 (24%) apresentaram HPM seguindo os critérios estabelecidos por Maciá e colaboradores. Essas subpopulações apresentaram maiores taxas de resistência a antimicrobianos. As amostras estudadas apresentaram grande variabilidade genética (49 perfis definidos com a utilização da técnica de RADP), embora tenha sido observada, também, a incidência de clones compartilhados por diferentes pacientes. Não encontramos similaridade entre os clones estudados e as cepas epidêmicas circulantes em outros países. Das amostras classificadas como HPM pelos critérios de Maciá e colaboradores, apenas 3 delas apresentaram frequência de mutação que permitisse sua classificação como HPM. Com o sequenciamento do DNA encontramos mutações que levaram a mudança de aminoácidos nas proteínas codificadas pelos genes *mutS*, *mutD* e *urvD*. Não observamos mutações nos genes *mutM*, *mutT* e *mutY* que pudessem alterar os aminoácidos sintetizados. Como são escassos estudos sobre a influência da HPM em alterações fenotípicas outras que a resistência a antimicrobianos, comparamos a expressão de atributos de virulência nas populações selvagens e subpopulações. Não observamos alterações nos estados nutricionais, mobilidade e capacidade de formação de biofilme dos microrganismos estudados. Ao contrário, as subpopulações apresentaram uma menor atividade de LasA e um aumento na produção de piocianina, o que reforça nossa hipótese de que células mutantes teriam uma vantagem no ambiente pulmonar de pacientes com FC. Devido à diferença nos testes propostos para caracterização de HPM, sugerimos que o teste de difusão em agar modificado seja adotado como uma metodologia de triagem a ser utilizada em laboratório de microbiologia clínica.

Palavras-chave: Reparo do DNA. *Pseudomonas aeruginosa*. Mutação. Fibrose cística.

ABSTRACT

Pulmonary infection is a major cause of morbidity and mortality in patients with Cystic Fibrosis (CF). The prognosis of these patients is influenced by the number of annual exacerbations of the infectious processes and the microbial load in their respiratory secretions. *Pseudomonas aeruginosa* is the main CF pathogen, both in importance and predominance. Recently, highly transmissible *P. aeruginosa* strains were reported among CF patients from different CF Health Care centers. The persistence of *P. aeruginosa* in the lung of CF patients is associated, at least in part, with the presence of strains with hypermutability (HPM), a phenomenon caused mainly by defects in genes involved in the DNA repair system. In this report, 43 (24%) out of 179 *P. aeruginosa* isolates recovered from 17 (85%) out of 20 CF patients included in the study were characterized as HPM, according to the criteria established by Maciá and colleagues. The HPM subpopulations exhibited higher rates of antimicrobial resistance. By using the RAPD technique, bacteria included in our study were shown to exhibit high genetic variability and could be grouped in 49 different clones. However, a few clones were shared by different patients. No similarity was detected among these clones and epidemic strains from other countries. Of the 43 isolates classified as HPM by Maciá's criteria, only 3 exhibited mutation frequencies allowing their inclusion in the HPM group. By sequencing the DNA from these bacteria we found mutations in the genes *mutS*, *mutD* and *urvD* that resulted in changes in the amino acid sequences. We did not observe mutations in the genes *mutM*, *mutt* and *mutY* that could have altered the amino acid sequence from synthesized protein. Since there are only a few reports in the literature on the influence of HPM on bacterial phenotypic alterations other than antimicrobial resistance, we also compared 81 bacterial isolates from the wild populations and HPM subpopulations in their virulence properties. No difference among the microorganisms was detected considering their nutritional variations, mobility and ability of biofilm formation. In contrast, HPM subpopulations exhibited decreased LasA activity and increased production of pyocyanin. These results reinforced our hypothesis that bacterial mutants may have some advantage in the pulmonary environment of CF patients. Due to the difference in the results of the two sorts of test used to identify HPM, we propose the test of diffusion in modified agar as a trial test to be included in laboratories of clinical microbiology.

Keywords: DNA repair. *Pseudomonas aeruginosa*. Mutation. Cystic fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Percentual de amostras das populações selvagem e subpopulação em <i>P. aeruginosa</i> com os diferentes valores de concentração inibitória mínima para imipenem..... | 65 |
| Figura 2 | Percentual de amostras das populações selvagem e subpopulação em <i>P. aeruginosa</i> com os diferentes valores de concentração inibitória mínima para ceftazidima..... | 66 |
| Figura 3 | Dendrograma mostrando os 47 perfis gerados por PFGE das amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes com FC..... | 72 |
| Figura 4 | Caracterização das amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes fibrocísticos quanto à produção de piocianina..... | 79 |
| Figura 5 | Diferença na produção de piocianina pelas populações selvagens e subpopulações de <i>P. aeruginosa</i> | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1 | Condições metodológicas para detecção dos genes codificadores de metalo- β -lactamase (MBL)..... | 48 |
| Tabela 2 | Sequência dos iniciadores e temperatura de anelamento utilizados para genes do sistema de reparo em <i>P. aeruginosa</i> | 56 |
| Tabela 3 | Critério para classificação de <i>P. aeruginosa</i> quanto a produção de piocianina..... | 60 |
| Tabela 4 | Critério para classificação de <i>P. aeruginosa</i> quanto a formação de biofilme..... | 61 |
| Tabela 5 | Percentual de resistência para isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 64 |
| Tabela 6 | Média dos diâmetros de inibição das populações selvagens e subpopulações dos isolados classificados como hipermutáveis..... | 64 |
| Tabela 7 | Média das concentrações inibitória mínima (CIM) das populações selvagens e subpopulações dos isolados classificados como hipermutáveis..... | 66 |
| Tabela 8 | Rastreamento de metalo- β -lactamase em 179 amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes fibrocísticos, empregando-se seis testes fenotípicos..... | 67 |
| Tabela 9 | Perfis moleculares distintos, determinados pela técnica de RAPD, encontradas exclusivamente em um paciente..... | 68 |
| Tabela 10 | Perfis clonais comuns detectados em diferentes pacientes fibrocísticos, pela técnica de RAPD..... | 69 |
| Tabela 11 | Perfis clonais comuns detectados em diferentes pacientes fibrocísticos pela técnica de PFGE..... | 70 |
| Tabela 12 | Frequência de mutação em amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes fibrocísticos..... | 73 |
| Tabela 13 | Substituições no gene <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> , detectadas pelo sequenciamento gênico em comparação com as sequências descritas na cepa PAO1..... | 75 |

| | | |
|---------|--|-----|
| Anexo J | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutM</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 159 |
| Anexo K | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutY</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 160 |
| Anexo L | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutT</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 162 |
| Anexo M | First report of <i>Paenibacillus cineris</i> from a patient with cystic fibrosis | 164 |
| Anexo N | Comparison between transmissible <i>Pseudomonas aeruginosa</i> spread in the world, with isolates from Brazilian cystic fibrosis patients | 168 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| AN | Agar Nutriente |
| BGN-NF | Bastonete Gram Negativo não Fermentador |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| CAZ | Ceftazidima |
| CBc | Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> |
| CFTR | Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CIP | Ciprofloxacina |
| CN | Caldo Nutriente |
| EDTA | Etilenodiaminotetracético |
| FC | Fibrose Cística |
| HPM | Hipermutável |
| IMP | Imipenem |
| M | Mucoide |
| MBL | Metallo- β -lactamase |
| MER | Meropenem |
| MHA | Müller Hinton Agar |
| MHB | Müller Hinton Broth |
| MPA | Ácido 2-mercaptopropiônico |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| NM | Não Mucoide |
| PFGE | Eletroforese em Gel de Campo Pulsado |
| RAPD-PCR | PCR utilizando iniciadores randômicos |
| TDA | Teste disco aproximação |
| TDC | Teste disco combinado |
| TOB | Tobramicina |
| TSA | Tryptcase soy agar |
| TSDD | Teste Sinérgico Duplo-Disco |

LISTA DE ANEXOS

| | | |
|---------|--|-----|
| Anexo A | Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 127 |
| Anexo B | Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutD</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 134 |
| Anexo C | Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>urvD</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 137 |
| Anexo D | Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutM</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 143 |
| Anexo E | Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutY</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 146 |
| Anexo F | Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutT</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 149 |
| Anexo G | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 152 |
| Anexo H | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutD</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 155 |
| Anexo I | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>urvD</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 156 |

| | | |
|---------|--|-----|
| Anexo J | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutM</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 159 |
| Anexo K | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutY</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 160 |
| Anexo L | Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutT</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 162 |
| Anexo M | First report of <i>Paenibacillus cineris</i> from a patient with cystic fibrosis | 164 |
| Anexo N | Comparison between transmissible <i>Pseudomonas aeruginosa</i> spread in the world, with isolates from Brazilian cystic fibrosis patients | 168 |

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|-----------|
| | INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 1 | A FIBROSE CÍSTICA..... | 18 |
| 2 | MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA..... | 20 |
| 3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>..... | 23 |
| 4 | TIPAGEM MOLECULAR..... | 25 |
| 5 | RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>..... | 29 |
| 6 | HIPERMUTABILIDADE EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>..... | 31 |
| 7 | FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>..... | 36 |
| 7.1 | Formação de Biofilme..... | 36 |
| 7.2 | Elastases..... | 38 |
| 7.3 | Piocianina..... | 38 |
| 7.4 | Variação Nutricional..... | 39 |
| 7.5 | Mobilidade..... | 39 |
| | OBJETIVO GERAL | 41 |
| | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 41 |
| | MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 1 | PACIENTES, ESPÉCIMES CLÍNICOS E AMOSTRAS BACTERIANAS | 43 |
| 2 | DETECÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hipermutáveis..... | 44 |
| 3 | DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS... | 45 |
| 4 | TESTES FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE AMOSTRAS PRODUTORAS DE METALO-β-LACTAMASE (MBL)..... | 45 |
| 4.1 | Teste de Disco-Aproximação (TDA) ou Teste Sinérgico Duplo Disco (TSDD)..... | 46 |
| 4.2 | Teste Disco Combinado (TDC)..... | 47 |
| 5 | DETECÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS PRODUTORAS DE METALO-β-LACTAMASE (MBL)..... | 47 |

| | | |
|------|---|-----|
| 6 | ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO POR AMPLIFICAÇÃO RANDÔMICA DE DNA (RAPD-PCR)..... | 49 |
| 7 | ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)..... | 50 |
| 8 | ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVES DA TECNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)..... | 52 |
| 9 | DETERMINÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO..... | 53 |
| 10 | SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>mutS</i>, <i>mutY</i>, <i>mutM</i>, <i>mutD</i>, <i>mutT</i> e <i>urvD</i>..... | 54 |
| 11 | DETERMINAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL..... | 58 |
| 12 | TESTE DE MOBILIDADE..... | 58 |
| 12.1 | <i>Swimming</i>..... | 58 |
| 12.2 | <i>Swarming</i>..... | 59 |
| 13 | QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIOCIANINA..... | 59 |
| 14 | FORMAÇÃO DO BIOFILME..... | 60 |
| 15 | ATIVIDADE DE LasA PROTEASE..... | 61 |
| 16 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 61 |
| | RESULTADOS..... | 62 |
| | DISCUSSÃO..... | 83 |
| | CONCLUSÃO..... | 99 |
| | REFERÊNCIAS..... | 102 |
| | ANEXO A - Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1..... | 127 |
| | ANEXO B - Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutD</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1..... | 134 |
| | ANEXO C - Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>urvD</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1..... | 137 |

| | |
|---|-----|
| ANEXO D - Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutM</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 143 |
| ANEXO E - Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutY</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 146 |
| ANEXO F - Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene <i>mutT</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 149 |
| ANEXO G - Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 152 |
| ANEXO H - Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutD</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 155 |
| ANEXO I - Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>urvD</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 156 |
| ANEXO J - Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutM</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 159 |
| ANEXO K - Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutY</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 160 |
| ANEXO L - Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene <i>mutT</i> de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1..... | 162 |

INTRODUÇÃO

1- A fibrose cística

A fibrose cística (FC) é a doença genética autossômica recessiva letal mais comum em populações caucasianas, com uma incidência variável entre diferentes países e grupos étnicos de um mesmo país, oscilando entre 1:2000 a 1:5000 caucasianos nascidos vivos na Europa, nos Estados Unidos e Canadá. A incidência da FC no Brasil e na América Latina é pouco conhecida. Poucos estudos epidemiológicos ou triagem neonatal abrangentes permitem estimar a incidência nas diversas regiões do país. Há estimativas de que apenas 10% do total de pessoas afetados são diagnosticadas, o que confere uma impressão equivocada de baixa incidência da FC na população brasileira (Tagle, 1988; Santos, Domingos & Witting, 2005; Raskin *et al.*, 2008).

Cerca de um terço dos fibrocísticos atinge a idade adulta, com uma expectativa de vida superior a 30 anos nos países desenvolvidos. O aumento da sobrevida média destes pacientes está ligado a um avanço do conhecimento sobre a doença, favorecendo a adoção de medidas multidisciplinares padronizados no tratamento dos pacientes portadores de FC (Ratjen & Doring, 2003; Barbato *et al.*, 2009).

A Fc é uma doença multi-sistêmica caracterizada por um defeito no transporte de íons cloro e sódio nas membranas apicais de células epiteliais de diferentes órgãos e glândulas exócrinas, decorrente de mutações no gene que codifica a síntese da glicoproteína reguladora da condutância transmembranar da fibrose cística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* -CFTR) (Riodan *et al.*, 1989).

Já foram descritas mais de 1500 mutações, desde a descoberta do gene em 1989, relacionadas com diferentes graus de gravidade e manifestações da doença. A mutação mais frequente detectada na FC, presente em cerca de 70% dos genes mutantes, é a designada Delta F508, que ocorre pela deleção de três pares de bases,

resultando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR. Entretanto, alguns dos estudos conduzidos no Brasil, mostram uma frequência menor desta mutação (variando em média de 30% a 66%, dependendo da região ou estado avaliado) em comparações aos estudos europeus e norte-americanos, provavelmente devido à grande miscigenação no Brasil (Strait *et al.*, 2003; Raskin *et al.*, 2009).

Como conseqüências das mutações neste gene ocorrem alterações na maturação intracelular e distribuição anormal da proteína CFTR nas células epiteliais. Estas mutações levam ao aumento da absorção de Na⁺ e perda ou redução da secreção de Cl⁻. Nas vias aéreas, como efeito da disfunção da proteína CFTR, as secreções respiratórias dos pacientes com FC tornam-se desidratadas, hiperosmolares e tem suas propriedades reológicas bastante alteradas, acarretando uma grave disfunção no transporte mucociliar, o que favorece a colonização e posterior infecção das vias aéreas dos pacientes fibrocísticos por um grupo restrito de microrganismos. Associada à colonização/infecção bacteriana, as mucosas respiratórias dos pacientes apresentam, caracteristicamente, um processo inflamatório crônico responsável pela destruição irreversível do parênquima pulmonar e insuficiência respiratória progressiva (Damas, Amorim & Gomes, 2008). É importante ressaltar que existem diferentes apresentações clínicas na FC e, estas, são determinadas pelo tipo de mutação genética básica e consequente efeito funcional na CFTR (Foweraker *et al.*, 2005).

A infecção pulmonar é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com FC. O prognóstico dos pacientes é influenciado pelo número de exacerbações das infecções pulmonares anuais e a carga microbiana nas secreções respiratórias. O aumento da expectativa de vida e o uso prolongado de antimicrobianos são fatores determinantes para a seleção de microrganismos multirresistentes, tornando mais difícil o controle da progressão da colonização e da deterioração da função pulmonar. (Foweraker *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005a).

2- Microbiologia das Infecções Pulmonares

A análise do padrão e da evolução temporal da colonização nos pacientes com FC possibilita a identificação de infecções e colonizações apresentadas pelos pacientes seguem uma sequência mais ou menos estabelecida, dependendo da idade. Nos menores de idade, as infecções por vírus respiratórios e micoplasma são frequentes. Posteriormente, ao longo da primeira década de vida, torna-se frequente o isolamento de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* que são rapidamente substituídos por *Staphylococcus aureus* e, posteriormente, por *Pseudomonas aeruginosa* (Demko *et al.*, 1999; Saiman *et al.*, 2003; Tramper - Stranders *et al.*, 2005). Outros microrganismos da microbiota transitória, como, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., também podem ser isolados em culturas de secreções de pacientes com FC, embora com uma frequência muito baixa e, em geral, logo no início da doença pulmonar (Thomassen *et al.*, 1986; Beringer & Appleman, 2000; Renders *et al.*, 2001).

P. aeruginosa é a espécie mais frequente e responsável pela maioria dos óbitos, porém, o aumento da sobrevivência dos pacientes, como consequência do uso contínuo dos antimicrobianos e da deterioração da função pulmonar, foi acompanhado do isolamento de outros patógenos bacterianos, destacando-se os bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGN-NF), como os do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, entre outros. (Goldmann & Klinger, 1986; Govan *et al.*, 1993; Burns & Saiman, 1999).

Os BGN-NF são microrganismos aeróbios, não esporulados, que se caracterizam pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através de fermentação, degradando-os pela via oxidativa. A identificação desses microrganismos sempre foi um desafio para os laboratórios de rotina em microbiologia. Isso porque que a maioria destes laboratórios não se propõe a identificá-los ou o faz de maneira muito simplificada em virtude da pouca incidência dos BGN-NF em espécimes clínicos. Outras razões para o pouco investimento na identificação dos BDN-NF são a complexidade e elevado custo dos esquemas completos de identificação (August *et al.*, 1990; Forbes &

Granato, 1995; Laffleur *et al*, 2002; Kernen *et al.*, 2005). No entanto, a correta caracterização dos BGN-NF é de grande importância para o manejo das infecções na FC e, por isso, devem ser utilizados procedimentos específicos realizados preferencialmente em centros de referência de FC.

O interesse crescente no campo da microbiologia da FC, especialmente com a implementação de técnicas moleculares, permitiu o reconhecimento de microrganismos não usuais em espécimes clínicos humanos, mas que emergiram nas secreções respiratórias desses pacientes. Entre elas destacam-se *Achromobacter xylosoxidans* e diferentes espécies dos gêneros *Ralstonia* spp, *Burkholderia* spp e *Pandoraea* spp. Um fator complicador adicional para os pacientes é que esses “novos” BGN-NF são inerentemente multirresistentes aos antimicrobianos. Embora para muitos desses microrganismos ainda não tenha sido possível a identificação, sua contribuição específica no estabelecimento da doença pulmonar, é sabido que outros estão associados a um curso clínico desfavorável (Chiron *et al*, 2005; Davies & Rubin, 2007).

O CBc compreende um grupo de microrganismos intimamente relacionados. A taxonomia desse grupo tem evoluído dramaticamente nos últimos anos. Até recentemente, o CBc compreendia 9 espécies: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* e *B. pyrrocinia*. Mais recentemente foram descritas as espécies *B. ubonensis*, *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis* e *B. metallica*, perfazendo, até o momento, 15 espécies dentro do CBc. Todas já foram isoladas das secreções respiratórias de pacientes com FC. Entretanto, existem variações na frequência de isolamento, sendo as espécies *B. cenocepacia* e *B. multivorans* as prevalentes (Vanlaere *et al.*, 2009). A colonização das vias respiratórias pelo CBc em geral envolve apenas uma espécie de forma transitória ou crônica (Carvalho *et al*, 2005).

O CBc tem grande impacto para os pacientes com FC, podendo causar desde colonização assintomática até um quadro fulminante com pneumonia necrosante fatal que é geralmente associada a bacteremia, denominado de “síndrome cepacia”

(Pegues, 1999; Coenye *et al.*, 2000; Vinion-Dubiel *et al.*, 2004). Além disso, as bactérias do CBc apresentam resistência inata à maioria dos antimicrobianos e podem ser adquirido em ambiente hospitalar. Algumas espécies apresentam alta capacidade de transmissão entre os pacientes (Butler *et al.*, 1995; Vinion-Dubiel *et al.*, 2004). Assim, pacientes colonizados por estes microrganismos apresentam maior mortalidade e um declínio mais rápido da função pulmonar após a colonização (Lewin *et al.*, 1990, Li Puma, 1998; Saiman *et al.*, 2003; Vinion-Dubiel *et al.*, 2004). Em laboratórios de rotina, todas as espécies costumam ser identificadas pelos métodos fenotípicos apenas como pertencentes ao “Complexo *B. cepacia*”. A identificação definitiva requer a utilização da associação de métodos fenotípicos e moleculares, tais como comparação da seqüência do gene *recA* e polimorfismo do gene *DNAr16S*. As limitações na execução destes métodos justificam a recomendação da mesma para laboratórios de referência (Mahenthiralingam & Vandamme, 2005).

A prevalência de *S. maltophilia* pode chegar a 30%, embora seu potencial patogênico ainda não esteja definido (Marshall *et al.*, 1989; Khardori *et al.*, 1990; Denton *et al.*, 1998).

A. xylosoxidans, em geral, está associado a exacerbações dos sintomas pulmonares (Dunne & Maisch, 1995; Saiman *et al.*, 2001). Nesse contexto, tem-se destacado em termos de frequência de isolamento nas secreções respiratórias de FC, embora sem que tenha sido documentado ainda o seu real impacto clínico na colonização/infecção crônica. Os raros trabalhos de epidemiologia molecular com *A. xylosoxidans* mostram que os pacientes costumam ser colonizados por um mesmo genótipo, o que afasta a possibilidade de transmissão cruzada entre os pacientes (Van daele *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2006).

Pandoraea é um gênero recentemente identificado em amostras de secreções respiratórias de pacientes com FC. Embora ainda com prevalência baixa, sua associação com infecções invasivas (sepse) e surtos sugere serem estes microrganismos clinicamente mais relevante para os pacientes com FC que outros

BGN-NF similares (Atkinson *et al*, 2006). No Brasil, descrevemos o primeiro caso de isolamento de *Pandoraea* spp em paciente atendido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, centro de referência do Rio Grande do Sul. Posteriormente, na população de pacientes do Rio de Janeiro, observamos o encontro de *Pandoraea* spp em várias culturas de secreções respiratórias de um mesmo paciente, sugerindo colonização crônica (Vieira *et al*, 2006). Entretanto, é precoce qualquer afirmativa sobre o seu real papel nas infecções pulmonares dos pacientes por nós acompanhados. Estudos prospectivos são necessários.

Recentemente, também foi descrito o primeiro caso, no Brasil, de colonização respiratória em FC por *Burkholderia pseudomallei* (Barth *et al*, 2007). Este BGN-NF, agente da melioidose, uma doença multissistêmica grave, teve seu primeiro relato, no Brasil, em 2004 em paciente não fibrocístico (Mirallis *et al*, 2004). O isolamento desse microrganismo é raro em pacientes com FC fora de áreas endêmicas, como o caso descrito. Portanto, o encontro dessa espécie em FC foi um achado improvável, mas que teve a sua confirmação através de testes fenotípicos, imunológicos e moleculares. Esses resultados mostram a importância da atenção e identificação acurada, além de reforçar que o encontro de BGN-NF não usuais não deve ser subestimado na FC.

Além da correta identificação dos patógenos pulmonares, outro fator muito importante no acompanhamento microbiológico dos pacientes com FC é o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, que contribui não apenas para a orientação do tratamento clínico adequado como fornecerá informações sobre a ocorrência de fenótipos multirresistentes (Kernen *et al.*, 2005).

3- *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria ubíqua, com predileção por ambientes úmidos, sendo encontrada no solo, água e plantas. São pouco frequentes como constituintes da microbiota de indivíduos saudáveis (Kiska & Gilligan, 2001). Trata-se de um microrganismo com elevado potencial adaptativo, de caráter oportunista, associado a

uma variedade de infecções em humanos e outros animais (Martin *et al.*, 1993; Dubois *et al.*, 2001; Salunkhe *et al.*, 2005).

É o principal patógeno, tanto em importância quanto em prevalência, encontrado no pulmão dos pacientes com FC. Em geral, as crianças com infecção por esse microrganismo apresentam uma redução da expectativa de vida de cerca de 10 anos, quando comparadas àquelas sem infecção pela bactéria. (Saiman *et al.*, 2003). Mais de 90% dos pacientes adultos são infectados por esses microrganismos (Li *et al.*, 2005).

Na FC, as infecções pulmonares crônicas por *P. aeruginosa*, associada à inflamação das vias aéreas, levam a um dano progressivo do tecido pulmonar, com consequente falência respiratória e óbito (Lyczak, Cannon *et al.*, 2002; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2009). Algumas mecanismos têm sido sugeridas para explicar a associação entre *P. aeruginosa* e células respiratórias: falhas das células epiteliais na internalização e morte dessas bactérias (Pier *et al.*, 1996); inativação de substâncias antibacterianas – defensinas, devidos a alta concentração de sais existentes nas secreções respiratórias (Goldman *et al.*, 1997); disfunção do movimento ciliar das células epiteliais por exoprodutos bacterianos incluindo a piocianina (Look *et al.*, 2005); a própria estagnação de secreções na superfície das células do epitélio respiratório com a conseqüente proliferação de microrganismos em geral (Lee *et al.*, 2005) e, ainda, o aumento da expressão de asialo-GM₁ na superfície apical das células do epitélio respiratório favorecendo a adesão destes microrganismos (Davies *et al.*, 1997; Yagci *et al.*, 2007).

Normalmente, o morfotipo não mucóide (NM) é o responsável pela colonização inicial das vias aéreas dos pacientes fibrocísticos e pelo início da patogênese, devido ao arsenal de fatores de virulência que expressa, como lipolissacarídeo, pili, sistema de secreção do tipo III, exotoxina A, elastases e proteases, fatores estes que, associados à resposta inflamatória, causam o dano tecidual no pulmão (Martin *et al.*, 1993; O'Toole & Kolter, 1998; Terada *et al.*, 1999; Hentzer *et al.*, 2001; Finnam *et al.*, 2004).

Estudos longitudinais mostram que o fenótipo inicial NM de *P. aeruginosa*, pode permanecer no pulmão dos fibrocísticos por vários anos (Mahenthiralingam *et al.*, 1996; Bjarnsholt *et al.*, 2009). A caracterização do estágio de infecção crônica normalmente se dá pelo aumento das exacerbações e pela conversão do morfotipo NM para o mucóide (M) (Liczak, Cannom & Píer, 2002). Este fenótipo é resultado da hiperprodução de alginato, um polímero acetilado de ácidos manurônico e gulurônico (Ryder, Byrd & Wozniak, 2007). A conversão para o morfotipo M está associada a mutações no gene regulador *mucA* (Mahenthiralingam *et al.*, 1994; Drenkard & Ausubel, 2002).

O aparecimento do morfotipo M está associado a um pior prognóstico para os pacientes, com aumento da deterioração pulmonar (Pedersen *et al.*, 1992; Demko, Byard & Davis, 1995). Estudos mostram que uma minoria de pacientes que não apresenta o morfotipo M possui a função pulmonar significativamente melhor que aqueles colonizados por este fenótipo (Parad *et al.*, 1999; Sener *et al.*, 2001; Bagge *et al.*, 2004; Heijerman, 2005). O alginato atua como um importante fator de proteção contra a ação das imunidades inata e adquirida, protegendo o microrganismo contra a fagocitose, o estresse oxidativo e o sistema complemento, além de agir como uma relevante barreira à ação de antimicrobianos, garantindo, assim, a persistência da *P. aeruginosa* no pulmão dos fibrocísticos (May, Shinabarged & Mahara, 1991; Moss, 1995; Hentzer *et al.*, 2001; Liczak, Cannom & Píer, 2002).

Enquanto o tratamento com drogas anti-pseudomonas é necessário para impedir o rápido declínio da função respiratória dos pacientes infectados, a emergência de mutantes resistentes a múltiplos antibióticos invariavelmente ocorre, com consequente falência terapêutica. Ao contrário de outras bactérias, *P. aeruginosa* pode gerar mutantes que são resistentes a concentrações de uso clínico para todos os agentes usados no tratamento (Livermore., 2002).

4- Tipagem molecular

Devido à importância de *P. aeruginosa* como agente de infecções hospitalares, e o surgimento de amostras multirresistentes, os estudos epidemiológicos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras tornam-se muito importantes, pois permitem a caracterização de surtos de infecção bem como a avaliação de possíveis fontes de transmissão e aquisição deste patógeno. Podem também, determinar a prevalência de grupos clonais dentro de uma população bacteriana, visando o monitoramento da emergência e disseminação de bactérias multirresistentes e/ou potencialmente virulentas (Olive & Bean, 1999; Sader *et al.*, 2003).

Métodos genotípicos como amplificação de segmentos do DNA empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e principalmente, a análise dos perfis de fragmentação do DNA, após digestão com enzimas de restrição, através de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), são recomendados para a tipagem de microrganismos com propósitos epidemiológicos. Estes métodos são menos sujeitos as variações e apresentam maior poder discriminatório, maior reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de bancos de dados para caracterização dos microrganismos (Tenover, Arbeit & Goering, 1995; Olive & Bean, 1999; Belkum *et al.*, 2001).

A técnica da reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores randômicos (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) tem mostrado bons resultados em estudos epidemiológicos das infecções por *P. aeruginosa* (Mahenthalingam *et al.*, 1996; Renders *et al.*, 1996; Campbell, Mahenthalingam & Speert, 2000). A técnica utiliza iniciadores randômicos que, quando anelados ao genoma em condições de baixa estringência e posterior separação dos produtos de amplificação por eletroforese, resulta em padrões passíveis de serem comparados.

O método de macrorrestrição é o mais discriminatório dos métodos moleculares. Nele as bactérias são embebidas em “plugs” de agarose e lisadas “*in situ*” e seu DNA

genômico é digerido com enzimas de restrição que clivam o cromossomo de forma infrequente o material obtido é submetido à eletroforese em gel de campo pulsado (Struelens *et al.*, 1993; Agodi *et al.*, 2000).

Estudos mostram um alto nível de diversidade genotípica entre amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, refletindo a mesma diversidade verificada em amostras ambientais, o que sugere que estes pacientes adquirem as cepas de *P. aeruginosa* de maneira independente, provavelmente de reservatórios ambientais distintos (Romling *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1997; Burns *et al.*, 2001).

Cepas de *P. aeruginosa* genotipicamente diferentes podem colonizar os pacientes fibrocísticos. No entanto, acredita-se que, uma vez infectados, os pacientes tendem a abrigar o mesmo clone de *P. aeruginosa* durante o curso da doença, indicando que, mesmo durante os períodos de antibioticoterapia, a cepa original não é erradicada (Römling, Fiedler & Bobhammer, 1994; Burns *et al.*, 2001). Outros pacientes parecem manter variantes de um clone original, caracterizados por pequenas diferenças no genoma, indicando uma adaptação da bactéria ao microambiente pulmonar dos pacientes com FC durante a infecção crônica. Este processo corresponde as consideráveis adaptações genéticas e acumulação ou perda por mutações funcionais em genes específicos da *P. aeruginosa* (Struelens *et al.*, 1993; Silbert, Barth & Sader, 2001; Smith *et al.*, 2006).

A infecção e colonização do pulmão dos pacientes com FC por *P. aeruginosa* é um processo muito dinâmico, já que frequentemente verifica-se uma colonização mista por diferentes clones isolados em momentos diferentes (Renders *et al.*, 1996; Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al.*, 2007).

Em pacientes acompanhados por longos períodos foi identificada a ocorrência de diversos clones distintos, com períodos de estabelecimento de uma infecção seguidos pela eliminação de clones específicos, indicando a substituição de clones infectantes. Essa troca seria resultado de uma intensa competição por nichos específicos no

pulmão dos fibrocísticos, revelando que alguns clones possuem fatores competitivos mais vantajosos, principalmente no que tange as condições nutricionais, à tolerância ao sistema imune e aos períodos de antibioticoterapia (Boukadida *et al.*, 1993; Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al.*, 2007). Estudos similares sugerem que a transmissão cruzada de *P. aeruginosa* entre pacientes com FC ocorre mais frequentemente quando o contato é mais intenso, principalmente entre irmãos (Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al.*, 2007).

Mais recentemente, tem sido demonstrada a ocorrência de cepas de *P. aeruginosa* altamente transmissíveis em centros de atendimento a pacientes com FC, indicando que alguns clones têm a habilidade de se difundir entre os fibrocísticos. Esta transmissão pode ocorrer por rota direta ou indireta e estes clones possuem vantagens evolutivas significativas para colonizar o pulmão dos pacientes. Embora as vias de aquisição e os meios de transmissão não sejam ainda bem estabelecidos, são crescentes os relatos de surtos envolvendo cepas epidêmicas altamente transmissíveis em unidades de atendimento a FC, e nesses casos, as cepas apresentam também a característica de multirresistencia (Scott & Pitt, 2004; Panagea *et al.*, 2005; Jelsbak *et al.*, 2007; Tingpej *et al.*, 2007).

Römling e colaboradores (1994) descreveram um clone epidêmico, denominado clone C, que se encontra disseminado em alguns países europeus. Cerca de 28% dos isolados de pacientes fibrocístico estudados apresentavam este clone, o que também foi detectado, com uma frequência similar de 21% em amostras do meio ambiente, como por exemplo, água de rio, de piscina e mesmo água potável. Na Inglaterra, uma cepa epidêmica apresentando multirresistencia (LES, Liverpool Epidemic Strain) foi encontrada em 59% dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos de crianças fibrocísticas em uma clínica pediátrica em Liverpool (Cheng *et al.*, 1996), sendo posteriormente isoladas em pacientes fibrocísticos adultos (McCallum *et al.*, 2001). Jones e colaboradores (2001), em um estudo prospectivo com 159 pacientes adultos crônicos, verificaram a presença de um clone denominado Manchester. Scott and Pitt (2004) relataram a presença de um novo clone epidêmico, Midlands 1, sendo o segundo genótipo mais

comumente encontrado, detectada em 10% das amostras de *P. aeruginosa* na Inglaterra e no país de Gales. Essa mesma cepa já foi isolada na Austrália.

Centros de tratamentos de pacientes fibrocísticos adotam, em suas rotinas, a segregação de pacientes com cultura positivo para bactérias pertencentes ao CBc. Existe uma discussão sobre a real possibilidade de expandir tal medida de segregação para os indivíduos com cultura positivos de *P. aeruginosa* com genótipo transmissível (Jones *et al.*, 2001. Armstrong *et al.*, 2002). Nos EUA, 65% dos centros de atendimento a FC apresentam política de controle de infecção implantada. Os dados sugerem que a adoção de políticas locais de controle é extremamente importante para melhorar o controle de infecção na FC (Saiman & Garber, 2009).

5- Resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa*

Um dos grandes problemas nas infecções por *P. aeruginosa* é a resistência natural e adquirida a diversos antimicrobianos. A resistência intrínseca pode ser devido à escassa permeabilidade de sua membrana externa, ao seu eficaz sistema de efluxo e à produção de β -Lactamase - AmpC, que confere resistência a ampicilina, ácido clavulânico, e cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, com exceção da ceftazidima, ticarcilina, piperacilina, as cefalosporinas de 4^o geração, aztreonam e aos carbapenens (Livermore, 1992; Masuda *et al.*, 1995; Hancock & Speert, 2000).

A resistência adquirida em *P. aeruginosa* ocorre principalmente por mutações (mutações pontuais, deleções, inserções e inversões no genoma bacteriano) e por transferência genética horizontal (plasmídeos, transposons, integrons). *P. aeruginosa* apresenta diferentes mecanismos para adquirir resistência às diferentes classes de antimicrobianos, sendo os principais mecanismos, a diminuição da absorção da droga (porinas mutantes); aumento da eliminação das drogas (bombas de efluxo); inativação ou modificação dos alvos das drogas (mutações em proteínas ribossomais, proteínas ligantes de penicilina, metilação ou mutação do RNAr), a aquisição de genes de resistência, hidrólise enzimática (como por exemplo β -lactamases), modificação dos

antimicrobianos (como por exemplo a enzima modificadora de aminoglicosídeos) (Livermore, 1992; Li *et al.*, 1998; Cornaglia *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Normark & Normark, 2002).

Isolados de *P. aeruginosa* com capacidade de produzir metalo- β -lactamases (MBLs) tem sido descritas, o que representa um problema mundial de grande importância clínica. Assim, o monitoramento dessas enzimas, bem como a detecção precoce deste perfil de resistência, tornou-se crucial para um tratamento eficaz, para o controle da infecção e da disseminação de amostras com este fenótipo (Migliavacca *et al.*, 2002; Yong *et al.*, 2002).

As MBLs são enzimas com atividade sobre vários β -lactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenens e, ainda, sobre os inibidores β -lactâmicos, como o sulbactam (Bush *et al.*, 1995, Arakawa *et al.*, 2000, Santos F^o *et al.*, 2003).

Baseado em estudos moleculares de enzimas, dois grupos com capacidade de hidrolisar os carbapenens tem sido descritos. As enzimas que possuem a serina como sítio ativo, chamadas de classe A, C e D, e enzimas que requerem cátions divalentes como co-fatores para sua atividade enzimática, denominadas MBLs, classe B, que podem ser inibidas por quelantes de metais, como o EDTA ou compostos tiólicos. As MBLs pertencem ao grupo 3 das β -lactamases de espectro ampliado, fazendo parte de uma classe funcional comum de metalo-enzima classificada com base em sua habilidade de hidrolisar o imipenem (Rasmussen & Bush, 1997; Santos F^o *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2003).

Dentro da classe B das metalo-enzimas, as duas primeiras β -lactamases encontradas nas amostras de *P. aeruginosa* foram a IMP-1 e VIM-1, ambas possuindo uma ampla diversidade de substratos para hidrólise que inclui penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenens, mas que não atingem os monobactâmicos (Bush, 2001). As amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBL, VIM-1 e VIM-2 são susceptíveis apenas ao aztreonam (Poirel *et al.*, 2000). Existem, ainda, outras variantes identificadas na Ásia e em outras regiões, como é o caso da VIM 3 em Taiwan (Yan *et*

al., 2001). Atualmente já estão descritas mais de 15 variantes do tipo IMP e 11 do tipo VIM presentes em amostras de *P. aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2005; Picão *et al.*, 2008).

A propagação de *P. aeruginosa* produtoras de MBL têm sido descrita em vários locais, como Grécia, Portugal, Inglaterra, França, Itália. No Brasil, foram isoladas as primeiras amostras no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, havendo registros, também, na região nordeste e em São Paulo (Pellegrino *et al.*, 2002; Santos F° *et al.*, 2003; Tolleman *et al.*, 2002). Em 2002, Tolleman *et al.*, descreveram a caracterização bioquímica e molecular de uma nova MBL, presente em isolado proveniente de uma criança com quatro anos de idade de São Paulo. Essa nova MBL foi denominada SPM-1 e faz parte de uma nova subfamília com características próprias. Assim como as amostras do tipo IMP e VIM, a SPM-1 também não hidrolisa o ácido clavulânico nem o aztreonam. (Murphy *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2005).

“German Imipenemase”- GIM-1 foi descrito como uma MBL única, localizada em uma estrutura distinta de integron, e representa a quarta sub-classe de MBL. Foi descrita em 2002, em amostra clínica de *P. aeruginosa* isoladas na Alemanha. As amostras produtoras dessa enzima apresentam susceptibilidade apenas à polimixina. (Castanheira *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2005).

Lee *et al* (2005), na Coreia, descreveram uma nova classe de enzima, em integron de classe 1, denominada SIM, provenientes de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Na Austrália, foi descrita uma classe de enzima, denominada AIM (Yong, 2007). Mais recentemente, uma nova enzima, denominada KHM-1 foi encontrada em isolados de *Citrobacter freundii* resistente à maioria dos β -lactâmicos (Sekiguchi *et al.*, 2008).

6- Hipermutabilidade em *Pseudomonas aeruginosa*

A homeostase dos seres vivos requer um correto funcionamento de suas proteínas. Entretanto, essas proteínas são susceptíveis aos danos causados por

mutações em genes que as codificam. A manutenção da estabilidade genômica e a fiel cópia das seqüências dos ácidos nucléicos sobre muitas gerações, dão as características dos seres vivos (Coporale, 2003; Chopra, O'Neill & Miller, 2003). Embora as mutações sejam eventos raros, as alterações nas sequências de bases do DNA são relativamente comuns. No entanto, a grande maioria das alterações que surge no DNA é imediatamente corrigida, não sendo, portanto, transmitida para a próxima geração celular (Pontes *et al.*, 2005).

Embora a mutação seja uma das principais fontes para a evolução, se não existisse a possibilidade de consertar as alterações na seqüência de bases do DNA, em poucas gerações a informação genética transmitida de uma célula para outra estaria muito modificada. O acúmulo de mutações em genes importantes para o funcionamento celular rapidamente inviabilizaria o desempenho normal das células e afetaria, no caso de seres multicelulares, as funções de tecidos e órgãos (Taddei *et al.*, 1997; Sniegowski, Gerrish and Lenski, 1997). Esse evento pode ter ainda um efeito particularmente letal, quando se trata de organismos unicelulares, como as bactérias, por possuírem um único cromossomo (Chopra, O'Neill & Miller, 2003).

Como todo o sistema de reparo do DNA depende da atividade de proteínas específicas, podemos dizer que o sistema de reparo presente em uma célula é determinado geneticamente (Hall & Stephanie, 2006). Várias são as proteínas que atuam no sistema de reparo. Algumas são capazes de detectar alterações na estrutura do DNA, ou seja, são proteínas que detectam modificações na dupla hélice. Por exemplo, o diâmetro da dupla hélice de DNA é constante ao longo de toda a dupla fita. Em todas as espécies, o DNA forma uma fibra de 2nm de espessura e esse valor constante só é possível através do despareamento entre purinas e pirimidinas. Onde ocorrer um pareamento entre duas purinas, haverá um aumento no diâmetro da dupla hélice. Se, por acaso, acontecer um pareamento entre pirimidinas, a dupla hélice apresentará nesse ponto um estreitamento. Proteínas do sistema de reparo reconhecem rapidamente essas regiões onde a dupla hélice está alterada e entram em ação para corrigir o erro (Blásquez, 2003).

Outras proteínas do sistema de reparo reconhecem a presença de bases anormais no DNA. Por exemplo, as bases nitrogenadas podem perder um grupamento amina. Nesse caso, uma citosina pode se transformar em uma uracila. A presença de uracila na dupla hélice de DNA é reconhecida como erro e põe em ação um conjunto de proteínas do sistema de reparo que removerão a uracila e adicionarão uma nova citosina no local, recuperando o par original C-G (Martinez & Baquero, 2000).

A DNA polimerases III, codificada pelo gene *mutD*, é exemplo de proteína que exerce funções muito importantes no sistema de reparo do DNA. Embora essa classe de enzimas seja mais famosa pela capacidade de catalizar a formação da ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos, durante a síntese de uma nova fita de DNA (atividade de polimerase), elas também têm atividade revisora. As DNA's polimerases são capazes de “rever” as últimas ligações que foram feitas durante a síntese da nova fita e, antes de adicionar um novo nucleotídeo complementar à fita molde, essas enzimas podem detectar e remover pareamentos errados (Martinez & Baquero, 2000; Belkum *et al.*, 2001).

O mecanismo molecular implicado na adaptação de *P. aeruginosa* no ambiente pulmonar de pacientes fibrocísticos é complexo e pouco conhecido. Recentemente, Smith *et al.*, 2006 mostraram em seu estudo a importância da mutação na adaptação de *P. aeruginosa* no pulmão dos fibrocísticos. Mostraram, ainda, o papel do fenótipo de hipermutação no papel geral da patogênese. Bactérias hipermutáveis ou hipermutantes são bactérias que apresentam uma taxa de mutação aumentada (acima de 1000 vezes). Esse fenômeno foi descrito inicialmente em *Escherichia coli*, que apresentavam defeito no sistema de reparo do DNA “*mismatch repair system*” [MRS] (Herman & Modricha, 1981). Em *P. aeruginosa* obtidas de fibrocísticos, o mecanismo mais comumente envolvido no fenômeno de hipermutação também é o “MRS”, e o gene mais frequentemente afetado é o *mutS* (Oliver *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2002; Guitiérrez *et al.*, 2004).

Este sistema repara o mau pareamento das bases de DNA gerados por erros de replicação. Em *E. coli*, o MRS é direcionado por metilação de seqüências GATC na fita que é sintetizada após a replicação. Além da DNA polimerase, SSB (*single strand binding protein*), helicase, exonucleases e DNA ligase, três enzimas especializadas – mutS, mutL e mutH – são requeridas. O mutS se liga nas bases mal pareadas. O mutH se liga na seqüência GATC. Se somente uma das fitas é metilada no GATC, a proteína mutH atua como endonuclease sítio específica clivando a fita não metilada na porção 5' do G no GATC, marcando a fita para ser reparada. A proteína mutL se liga ao mutS e mutH no complexo. Uma vez que a clivagem ocorreu, a fita de DNA não metilada é degradada no sítio de clivagem até a região de mau pareamento e replicada com DNA novo (Lahue *et al.*, 1989; Bregeon *et al.*, 1999).

A proteína helicase II é um produto do gene *urvD* que está envolvida com o processo de desespiralação da dupla fita de DNA com a aparente polaridade 3' para 5'. A helicase II tem sido relacionada com a função de replicação e de recombinação. Esta proteína também é requerida no direcionamento da mutilação no sistema de reparo em que parece atuar como iniciante do desenrolamento do DNA a ser reparado (Matson & Robertson, 2006).

P. aeruginosa é exposta a radicais de oxigênio gerados pelo seu próprio metabolismo e especialmente aqueles liberados por um grande número de polimorfonucleares em resposta à infecção pulmonar crônica na FC. Mandsberg *et al.* (2009) avaliaram o papel do sistema de reparo do DNA oxidativo no desenvolvimento da HPM e da resistência aos antimicrobianos. Construíram mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 e caracterizaram *mutT*, *mutY*, e *mutM*. O mutantes por deleção dos genes *mutT* e *mutY* apresentaram um aumento na frequência de mutação e maiores danos oxidativos no DNA quando comparadas PAO1.

Recentemente, tem ocorrido grande interesse sobre o real papel de *P. aeruginosa* hipermutáveis na FC (Oliver *et al.*, 2000; Maciá *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2004; Maciá *et al.*, 2005; Fothergill *et al.*, 2007; Kenna *et al.*, 2007). Em seu estudo, Oliver *et al.*, (2000) revelaram que 37,7% dos pacientes eram colonizados por isolados

que exibiam o fenômeno de hipermutabilidade. Das amostras testadas, 19,5% exibiam um fenótipo de hipermutabilidade, com uma frequência média de mutação de $3.2 \pm 2,5 \times 10^{-6}$. Outros estudos corroboram com esses dados (Maciá *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2004; Hotgard *et al.*, 2005 ; Maciá *et al.*, 2005; Kenna *et al.*, 2007; Wiegand *et al.*, 2008).

A alta prevalência de cepas hipermutáveis nesse grupo de pacientes sugere que a hipermutação possa ter papel na adaptação bacteriana, contribuindo para a sua longa persistência no ambiente pulmonar. No entanto, algumas questões precisam ainda ser elucidadas, como por exemplo: as cepas hipermutáveis são responsáveis pela emergência de mutantes com resistência adquirida ou esses mutantes são produtos da seleção mediada pelo uso de antibióticos? Teoricamente, pelo menos, quando uma população bacteriana é desafiada com situações adversas, como a antibioticoterapia, a seleção pode favorecer a evolução de genes mutantes (Oliver *et al.*, 2004). Se esses dois produtos da seleção mediada por antibióticos (resistência adquirida e hipermutação) forem aplicáveis, poderão agir sinergicamente. A seleção mediada por antibioticoterapia leva à evolução de genes mutantes assim como a emergência da resistência. Uma vez presentes, cepas com genes mutantes aumentam a probabilidade da geração de mutantes resistentes a antibióticos adicionais.

Nos últimos anos, o papel da hipermutação no desenvolvimento da resistência tem sido reconhecido como um problema potencialmente preocupante (Blazquez, 2003; Chopra, O'Neill & Miller, 2003). Um recente estudo *in vitro* mostrou que a deficiência de *mutS* em isolados de *P.aeruginosa*, determina o desenvolvimento imediato de resistência a cada agente, devido ao aumento predominante de mutantes resistentes, em poucas horas, durante à exposição às drogas, e por isso a monoterapia deve ser evitada no tratamento de infecções por cepas hipermutáveis (Oliver *et al.*, 2004). Esses resultados demonstram que a hipermutação é o principal fator negativo no tratamento de infecções crônicas por *P.aeruginosa*, não só porque essas cepas são mais frequentemente resistentes aos antimicrobianos (limitando o arsenal terapêutico), mas

também porque é esperado que o desenvolvimento da resistência a antimicrobianos adicionais ocorra rapidamente durante a antibioticoterapia.

Dessa forma, o tratamento precoce da colonização pulmonar por *P.aeruginosa* em pacientes com doença respiratória de base, antes do aparecimento de marcadores típicos de cronicidade, como por exemplo, a hipermutação, deve ser a principal estratégia da antibioticoterapia nesses pacientes (Ratjen, Doring & Nikolaizik, 2001). Uma vez a infecção crônica estabelecida e as cepas hipermutáveis selecionadas, a erradicação se torna praticamente impossível. Evitar a falência do tratamento devido ao desenvolvimento de cepas multirresistentes deve ser o principal objetivo a ser alcançado. Recentemente tem sido sugerido que cepas hipermutáveis (devida à imediata seleção de mutantes resistentes) devem ser consideradas resistentes à maioria, se não a todos, os antimicrobianos utilizados em monoterapia. Tem sido sugerido que as associações de antimicrobianos devem ser usadas para impedir o desenvolvimento de resistência (Maciá *et al.*, 2004).

Entretanto, Forthergill *et al.* (2007) encontraram evidências que algumas cepas hipermutáveis podem ser mais susceptíveis para ceftazidima, meropenem, aztreonam, tobramicina e ciprofloxacina que as cepas não hipermutáveis. Resultados similares foram descritos por Maciá *et al.* (2007), que observaram um aumento de susceptibilidade a colistina em cepas hipermutáveis. Com base em seus resultados os autores sugerem o uso de colistina no tratamento de cepas hipermutáveis.

Cepas hipermutantes tendem a apresentar mutações em genes que desempenham papel importante na colonização, invasão e sobrevivência deste microrganismo no hospedeiro, como os genes envolvidos na formação de biofilme e na produção de alginato, entre outros (Smania *et al.*, 2004; Forthergill *et al.*, 2007).

Entretanto, estudos *in vivo*, demonstraram que cepas classificadas como hipermutáveis foram menos eficientes em estabelecer a infecção pulmonar que seu tipo selvagem. Estes resultados sugerem que a hipermutabilidade em *P. aeruginosa* está

associada a um custo biológico, reduzindo o potencial da bactéria de colonização de novos ambientes e, portanto, sua transmissibilidade (Hogartdt *et al.*, 2007; Montanari *et al.*, 2007).

7- Fatores de Virulência em *Pseudomonas aeruginosa*

7.1- Formação de Biofilme:

P.aeruginosa é conhecida pelo seu alto nível de adaptabilidade, especialmente em infecções crônicas, onde os organismos vivem tanto de forma plantônica como em biofilmes, que são comunidades bacterianas inseridas na matriz extracelular composta de biopolímeros. A ligação de uma única célula à superfície da matriz extracelular promove a proliferação bacteriana levando à formação de microcolônias que se agrupam em várias camadas formando um “aglomerado” bacteriano, tornando assim, mais difícil o acesso dos antimicrobianos (Christensen *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005).

Os biofilmes podem ser compostos por uma ou mais espécies microbianas e podem ser formados em uma ampla gama de superfícies bióticas e abióticas. Enquanto que os biofilmes polimicrobianos predominam no meio ambiente, os monomicrobianos existem em várias infecções e na superfície de dispositivos médicos (Adal & Farr, 1996; Archibald & Gaynes; 1997; Seno *et al.*, 2005).

Em pacientes sob tratamento as bactérias crescem numa diversidade de condições, nas diferentes partes do biofilme, e estão expostas a diferentes concentrações dos antimicrobianos. Assim, em cada micronicho ocorre diferente pressão seletiva para um nível particular de resistência, incluindo situações em que os microrganismos estão completamente protegidos da ação dos antimicrobianos, seja pela sua fase de crescimento ou pelo próprio ambiente (Drenkard, 2003).

A formação do biofilme pelas bactérias é um processo que pode ser dividido em quatro estágios: adesão a uma superfície, estabelecimento de uma monocamada de

bactérias, formação de microcolônias e, por último, a maturação deste biofilme (Head & Yu, 2004). Esta formação tem início quando a bactéria identifica condições ambientais, como alterações na temperatura, na osmolaridade, no pH e na disponibilidade de ferro e oxigênio, que sinalizam a transição para o crescimento em biofilme (Waltnick & Kolter, 1999; O'Toole *et al.*, 2000).

Assim, uma mesma população infectante poderá conter bactérias com diferentes padrões de susceptibilidade. O escarro expectorado contém fragmentos de diferentes partes do biofilme, assim como formas planctônicas, resultando que, no mesmo espécime clínico, bactérias com diferentes níveis de resistência poderão ser encontradas (Haubler, 2004).

A antibioticoterapia, sem dúvida, traz enorme contribuição para o aumento da expectativa de vida de pacientes com infecções por *P. aeruginosa*. Entretanto, a padronização e validação dos métodos laboratoriais disponíveis para determinação da susceptibilidade a antimicrobianos visam especificamente à terapia de infecções sanguíneas ou urinárias por *P.aeruginosa* (Moskowitz *et al.*, 2005).

As características peculiares de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, como a presença de diferentes morfotipos na mesma população infectante, incluindo aqueles com exopolissacarídeo mucóide, o crescimento em biofilme e a possibilidade de existência de subpopulações hipermutáveis, afetam adversamente o desempenho e a interpretação dos testes de sensibilidade a antibióticos. A realização desses testes para os isolados de FC tem gerado controvérsias sobre a sua utilidade clínica. (Smith *et al.*, 2003; Foweraker *et al.*, 2005).

7.2- Elastases:

P. aeruginosa tem a capacidade de secretar proteases com atividade elastolítica, que incluem duas enzimas, a LasA (serino protease) e a LasB (metaloprotease de zinco) que atuam sinergicamente para degradar a elastina, um importante componente do tecido conjuntivo, dentre eles o pulmonar. (Kessler *et al.*, 1993). Tem a capacidade

de também degradar componentes do sistema complemento e inibir a quimiotaxia e a atividade fagocítica dos neutrófilos. As infecções crônicas por *P. aeruginosa* são caracterizadas pela formação de anticorpos anti-LasA e LasB, com a conseqüente deposição de complexos nos tecidos (Kesser *et al.*, 1997; Grande *et al.*, 2007).

A protease LasA é conhecida como uma enzima de grande atividade estafilolítica, resultante da capacidade desta enzima de clivar peptídeo sem pentaglicina que cruza as pontes de peptidoglicano em *Staphylococcus aureus* (estafilolisina). Essa atividade confere uma grande vantagem da *P. aeruginosa* sobre o *S. aureus* durante a colonização no pulmão de pacientes fibrocísticos (Grande *et al.*, 2007).

7.3- Piocianina.

A piocianina é uma exotoxina de pigmento azul, difusível, produzido por *P. aeruginosa* e detectada em altas concentrações em secreções respiratórias de pacientes fibrocísticos (Look *et al.*, 2005). A piocianina e seu precursor, o ácido fenizina-1-carboxílico (PCA), apresentam numerosos efeitos tóxicos bastante relevantes em FC: são capazes de inibir o movimento ciliar de células epiteliais respiratórias humanas *in vitro* (Kanthakumar *et al.*, 1993), e modulam a expressão de proteínas imunomodulatórias em células do epitélio respiratório humano. Estudos mostraram aumento na produção de IL-8 e expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) (Denning *et al.*, 2003). Usher *et al.* (2002) e Allen *et al.* (2005), utilizando testes *in vitro* e *in vivo*, demonstraram ainda que a piocianina produzida por *P. aeruginosa* tem a capacidade de induzir a apoptose de neutrófilos.

7.4- Variação Nutricional

Algumas amostras de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com FC apresentam uma exigência nutricional específica e são chamadas de auxotróficas devido à incapacidade de crescer em meio basal contendo apenas sais minerais e glicose como única fonte de carbono. A incapacidade de sintetizar o aminoácido metionina parece ser a alteração auxotrófica mais frequentemente observada. (Barth & Pitt, 1995; Thomas *et al.*, 2000). A maior proporção de cepas auxotróficas durante os quadros de

exacerbações respiratórias, em pacientes adultos com FC, também tem sido relatada (Taylor *et al.*, 1993).

7.5- Mobilidade

P. aeruginosa apresenta três tipos de mobilidade: *swimming*, *swarming* e *twitching*. A mobilidade por *swarming* é do tipo flagelo-dependente e é observada em superfície de meio semi-sólido (Harshey, 2003). No fenômeno de *swarming* observam-se alterações morfológicas das células bacterianas (*swarmer cells*), que se tornam alongadas e hiperflageladas (Fraser & Hughes, 1999; Harshey, 2003). Em adição ao flagelo, na mobilidade tipo *swarming* há necessidade do aumento na produção de certos componentes extracelulares, que seriam capazes de reduzir o atrito da célula com a superfície (Harshey, 2003). Sendo assim, a mobilidade do tipo *swarming* difere de *swimming*, que também é flagelo-dependente, por ser representada por movimentos celulares independentes, que podem ser observados em meios líquidos ou sólidos com baixa concentração de agar. *Swarming* é um movimento multicelular e diversos autores têm associado sua função, em diferentes espécies bacterianas, com fatores de virulência e resistência (Fraser & Hughes, 1999; Harshey, 2003; Kim *et al.*, 2003; Merino *et al.*, 2006).

O movimento por *twitching* em *P.aeruginosa* é principalmente mediado por pili do tipo IV. Os pilis são proteínas que se projetam da superfície de células bacterianas e tem sido descritas como uma estrutura de grande importância para aderência e colonização de células eucarióticas (Woods *et al.*, 1980; Bieber, *et al.*, 1998). As bactérias aderidas têm a capacidade de retrair o pili em direção à célula hospedeira, aumentando assim o contato entre os dois tipos celulares (Spangenberg *et al.*, 1995; Comer *et al.*, 2002).

OBJETIVO GERAL:

Investigar a similaridade genética e a ocorrência de cepas hipermutáveis em *P. aeruginosa* associadas às infecções pulmonares crônicas em pacientes com Fibrose Cística atendidos em dois centros de referências na cidade do Rio de Janeiro. Avaliar a associação entre o fenótipo hipermutável, resistência a antimicrobianos e a produção de fatores de virulência.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Determinar a ocorrência de amostras de *P. aeruginosa* hipermutáveis pelo teste de difusão em agar modificado.
- ✓ Comparar a susceptibilidade aos antimicrobianos de uso terapêutico, imipenem e ceftazidima, através de técnica quantitativa, de cepas selvagens e subpopulações.
- ✓ Detectar, por seis diferentes métodos fenotípicos, amostras de *P.aeruginosa* produtoras de *metalo-β-lactamases* (MBLs);
- ✓ Aplicar a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisar os principais genes que codificam MBLs.
- ✓ Analisar o grau de similaridade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, pelas técnicas de RAPD e PFGE;
- ✓ Verificar a ocorrência de cepas transmissíveis dentre nossa amostragem e comparar com clones epidêmicos mundiais;
- ✓ Estimar a frequência de mutação na população infectante de *P. aeruginosa*;
- ✓ Sequenciar os genes mais comumente envolvidos no fenômeno de hipermutação (*mutS*, *mutY*, *mutM*, *mutD*, *mutT* e *urvD*);

- ✓ Determinar a exigência nutricional das amostras estudadas (auxotróficas ou prototróficas);
- ✓ Caracterizar os atributos de virulência, tipo de mobilidade, produção de pirocianina, formação de biofilme e atividade de LasA protease na população bacteriana estudada;
- ✓ Comparar os fatores de virulência entre as amostras selvagens e subpopulação.

MATERIAL E MÉTODOS

PRIMEIRA FASE DO ESTUDO:

A primeira fase deste estudo foi desenvolvida no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ (DMIP - FCM) sob a supervisão da Prof^a. Elizabeth de Andrade Marques e no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar - FIOCRUZ sob a supervisão da Dra. Ana Paula D Carvalho-Assef.

1- Pacientes, espécimes clínicos e amostras bacterianas:

Os pacientes incluídos neste estudo são portadores de FC e fazem acompanhamento no Departamento de Pneumologia do Instituto Fernandes Figueira (IFF – FIOCRUZ) ou no Departamento de Pneumologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), dois centros de referência, no Rio de Janeiro, responsáveis pelo atendimento a pacientes com FC pediátricos e adultos, respectivamente. O acompanhamento microbiológico regular dos pacientes de ambos os centros é realizado no Laboratório de Bacteriologia Clínica do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (LABAC-UERJ) e no laboratório 02 do DIMIP-FCM-UERJ. Os espécimes respiratórios são processados e os patógenos isolados são identificados, com a utilização de metodologias fenotípicas e moleculares, e submetidos a testes de susceptibilidade a antimicrobianos, quando aplicável.

Para realização do estudo, foram selecionados 20 pacientes, sendo 14 atendidos no IFF–FIOCRUZ e 6 atendidos no HUPE–UERJ, do período de 2002 a 2006. Os pacientes foram incluídos por apresentarem infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa*, definida pela ocorrência de pelo menos quatro culturas positivas para *P. aeruginosa* em um ano com intervalo mínimo de três meses entre elas (Maciá *et al.*, 2005).

Todas as amostras de *P. aeruginosa* foram estocadas em solução de leite desnatado a 10% (*Skim Milk*; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) contendo glicerol a 10% e mantidas a -20° C até a realização dos testes, quando foram avaliadas quanto à pureza e tiveram sua identificação confirmada através de testes fisiológicos convencionais, tais como a caracterização morfo-tintorial após coloração pelo método de Gram, avaliação do metabolismo oxidativo da glicose, detecção da produção de oxidase, mobilidade, decarboxilação da arginina, crescimento a 42°C (Schreckenberger, 2000) e produção de pigmentos utilizando-se os meios King A (detecção de piocianina e piorrubina) e King B (detecção de pioverdina) (King, Ward & Raney, 1954).

2- Detecção de amostras de *P. aeruginosa* hipermutáveis:

Foram realizados os teste de sensibilidade aos antimicrobianos ceftazidima 30 µg (CAZ), imipenem 10 µg (IPM), meropenem 10 µg (MER), ciprofloxacina 5 µg (CIP) e tobramicina 10 µg (TOB) pelos métodos de difusão em agar, seguindo as recomendações de execução descritas no *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003) e os critérios de leitura obedeceram as orientações descritas no *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006).

Para permitir a detecção de subpopulações mutantes foi utilizada a técnica descrita por Maciá *et al.* (2004). As suspensões bacterianas foram padronizadas para a turvação semelhante aos dos tubos 0.5 e 1.0 da escala de McFarland e uma primeira leitura do halo de inibição foi realizada com 24 e 36 h, para as variantes NM e M, respectivamente. A presença ou ausência de subpopulações mutantes no interior das zonas de inibição nos testes de difusão foi pesquisada após 12 horas adicionais de incubação. As subpopulações mutantes foram reisoladas e retestadas para o mesmo antimicrobiano no qual foi verificado o crescimento no halo de inibição. Foram consideradas como hipermutáveis amostras que apresentaram diferença de halo de inibição maior ou igual a 5 mm no teste de difusão, exceto para TOB, (onde qualquer

diferença foi considerada significativa) para pelo menos três dos cinco antimicrobianos testados.

Como controle do teste, utilizamos a cepa padrão *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

3- Determinações das Concentrações Inibitórias Mínimas:

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de CAZ e IMP para as amostras classificadas como hipermutáveis pelo teste descrito por Maciá *et al.* (2004) foram obtidas pelo método de Etest® (AB BIODISK). As suspensões bacterianas foram padronizadas seguindo os mesmos critérios descritos do teste de difusão em agar (NCCLS, 2003). As fitas do Etest® foram aplicadas em *Müller Hinton Agar* (MHA) após 10 a 15 min da semeadura para total absorção da umidade na superfície do meio.

Após aplicação das fitas, as placas foram imediatamente incubadas a $35\pm 2^{\circ}$ C por 16-18h em aerobiose. Ao término deste período, foi realizada a leitura das CIM. Os resultados foram interpretados conforme os critérios estabelecidos pelo CLSI (2006), sendo as amostras agrupadas nas categorias sensíveis, com sensibilidade intermediária e resistente. As placas foram reincubadas por 12h adicionais. As subpopulações foram reisoladas e retestadas para o mesmo antimicrobiano no qual foi verificado o crescimento na elipse de inibição.

Como controle do teste, utilizamos a cepa padrão *P. aeruginosa* ATCC® 28723.

4- Testes fenotípicos para detecção de amostras produtoras de metalo- β -lactamase (MBL):

Procedemos à pesquisa de MBL em todas as amostras bacterianas, independente da suscetibilidade a CAZ e IMP. Para isso, empregamos testes de disco-difusão em agar na presença de inibidores de MBL (agentes quelantes de metais). Foram utilizados seis tipos de testes fenotípicos previamente descritos na literatura.

Dentre eles, cinco testes do tipo sinérgico duplo-disco (ou disco-aproximação) e um teste disco-combinado.

Os compostos quelantes empregados foram o ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) (EDTA P.A. sal dissódico, Promquímios, Rio de Janeiro, Brasil) e o ácido 2-mercaptopropiônico (MPA) (MPA, *Aldrich Chemical Company, Inc.*, EUA). Como substratos enzimáticos, utilizamos CAZ e IMP em discos de papel filtro impregnados com 30µg e 10µg de cada antibiótico, respectivamente. As cepas *P. aeruginosa* 163 (amostra clínica produtora de SPM-1) (Carvalho *et al.*, 2006) e *S. maltophilia* ATCC® 13637 foram utilizadas como controles positivos e a cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853, como controle negativo.

4.1- Teste de Disco-Aproximação (TDA) ou Teste Sinérgico Duplo-Disco (TSDD):

Para a realização do Teste Sinérgico Duplo-Disco (TSDD), utilizamos técnica adaptada de Arakawa *et al.*, (2000) e Lee *et al.*, (2003). Uma suspensão bacteriana com concentração padronizada (turbidez 0,5 de McFarland) foi semeada em uma placa de 90x15 mm contendo 20 mL de MHA. Na metade superior da placa, foram aplicados discos de CAZ e IMP, separados entre si por 5 cm de distância (centro a centro), e um disco estéril de papel de filtro não impregnado, posicionado a 2,5 cm de cada substrato. No disco não impregnado foram adicionados 3 µL de solução não diluída de MPA. Na porção inferior da mesma placa, foram posicionados discos de CAZ e IMP, separados entre si por 4 cm de distância (centro a centro), e um disco estéril de papel de filtro não impregnado, posicionado a 2cm de cada substrato, no qual adicionou-se 10µL de solução de EDTA a 0,5M.

Realizamos ainda, o TSDD de acordo com a técnica descrita por Franklin *et al.*, (2006). Uma suspensão bacteriana diluída (1:10) a partir do inóculo padrão (0,5 de McFarland) foi semeada em uma placa de 90x15 mm contendo 20 mL de MHA. Um

disco impregnado com IMP foi posicionado a 2 cm (centro a centro) de um disco não impregnado contendo de 10 µL de solução de EDTA 0,1M. A presença de MBL foi observada pela distorção e/ou ampliação do halo de inibição entre os substratos (CAZ e/ou IMP) e os agentes quelantes (EDTA e/ou MPA) (Arakawa *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003).

4.2- Teste Disco-Combinado (TDC):

Para a realização do Teste Disco-Combinado (TDC) empregamos os procedimentos descritos por Franklin *et al.* (2006). Em uma placa de 90x15 contendo 20 mL de MHA semeada com inóculo bacteriano diluído (1:10) a partir de suspensão padronizada a 0,5 de McFarland, foram aplicados dois discos de IMP, tendo sido adicionado a um deles 10µL de solução de EDTA a 0,1M. A distância entre os centros dos discos foi de 2,5cm. A produção de MBL foi indicada pelo aumento superior a 4 mm no halo de inibição em torno do disco de IMP com o inibidor, em comparação ao disco contendo apenas o antibiótico (Yong *et al.*, 2002).

5- Detecção molecular de amostras produtoras de *metalo-β-lactamases* (MBL):

Foi realizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos genes de algumas carbapenemases descritas na literatura, como *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2}, por serem aquelas freqüentemente descritas no Brasil.

Extração do DNA bacteriano:

As suspensões bacterianas foram padronizadas de modo que se obtivesse uma densidade ótica final padrão, igual a 0,5 na escala de McFarland. Para isso, foram colocados 200 µL de um crescimento recente em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI -

Difco, Detroit, Mich.) em 2 mL de água destilada (diluição de 1:100) e realizada a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (Colorímetro B440, Micronal; $\lambda = 580$ nm). A partir desta densidade foi possível determinar o volume da cultura necessário para se obter a D.O. padrão.

As suspensões bacterianas padronizadas foram, então, distribuídas conforme o volume determinado em tubos tipo Eppendorf, centrifugadas (2 min/ 14000 rpm) e o sobrenadante desprezado completamente.

Os sedimentos foram ressuspensos em 900 μ L de água deionizada estéril. O DNA foi obtido após fervura das suspensões bacterianas por 10 minutos e centrifugação por 10 seg a 16000 rpm. O DNA molde foi mantido em banho de gelo durante a preparação da mistura de reação.

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 50 μ L contendo 200 μ de dNTP; 25 pmol de cada par de iniciadores; 1 X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50mM KCl, 1 mg/mL gelatina); 2,5 mM MgCl₂; 2,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen) e aproximadamente 200ng de DNA bacteriano.

A amplificação dos segmentos gênicos empregando diferentes pares de iniciadores foi realizada conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1: Condições metodológicas para detecção dos genes codificadores de *metalo-β-lactamases* (MBL).

| Gene | Iniciadores | Tamanho do Fragmento (pb) | Condições de amplificação | Referência |
|----------------------------|---|---------------------------|---|----------------------------|
| <i>Bla_{IMP-1}</i> | 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3' 5'-GAACAACCAGTTTTGCCTTACC-3' | 593 | Desnaturação inicial 95°C/2min; 33 ciclos de 94°C/1 min; 60°C/1 min; 72°C/1min | Senda <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Bla_{SPM-1}</i> | 5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3' 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3' | 648 | Desnaturação inicial (95°C/5min), 30 ciclos de 95°C/1 min; 54°C/1min; 68°C/1min | Gales <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Bla_{VIM-2}</i> | 5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG T-3' 5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG- 3' | 800 | Desnaturação inicial (95°C/10min), 25 ciclos de 95°C/30s; 53°C/1min; 72°C/45s | Gales <i>et al.</i> , 2003 |

Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1,2% em 0,5% em TBE (45mM Tris-boratos, pH 8,4; 1mM EDTA). Para coloração, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 30 min, sob agitação, descorado em água por 20 min, observado em transluminador de UV e posteriormente fotografado.

Como controles negativos foram utilizados MIX de reação sem DNA bacteriano (45µL) e a cepa de *P. aeruginosa* ATCC® 27853. Para controles positivos de *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP-1}* e *bla_{VIM-2}* foram utilizadas as cepas de *P.aeruginosa* produtoras de SPM-1 (48-1997A), IMP-1 (PSA 319) e VIM-2 (AG-2), respectivamente, gentilmente cedidas pela Dra. Ana Cristina Gales da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

6 - Análise do polimorfismo genético por amplificação randômica de DNA – RAPD-PCR:

A extração do DNA bacteriano foi realizada como descrito no item 5.

Na etapa para reação de polimerização em cadeia, 3 µL do DNA de cada cepa foram adicionados à mistura de reação composta de 3,0 µL do iniciador 208 [5' - ACG GCC GAC C - 3' (38 pmol)] (Mahethiralingam *et al.*, 1996) 3 µL de dNTP mix (0,25 mM de cada dNTP), 3 µL de *Taq* polimerase (*Taq DNA Polimerase* – Invitrogen - 1,5 U), 3 µL de tampão PCR, 1,8 µL de MgCl₂ (3 mM) e 13,2 µL de água Mili-Q por tubo tipo *Eppendorf*. A mistura foi submetida a 44 ciclos de 94°C por 30s e 35° C por 1 min em termociclador.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese (70V, 82mA por 2 h e 30 min) em gel de agarose (Gibco BRL) a 1,2% em cuba horizontal (Horizon, Gibco BRL) com tampão TBE 1X (Tris-base, ácido bórico, EDTA - 0,5M e pH 8,0). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) sendo imediatamente visualizados e fotografados, após a corrida (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA) em transluminador de luz UV (TFX 20 M – Vilbert Lourmat, França).

Os resultados obtidos foram analisados visualmente seguindo os critérios de Strulens (1998), amostras bacterianas que apresentaram o mesmo perfil foram consideradas idênticas. As que possuíram diferença de uma a três bandas, refletindo um evento genético, foram consideradas muito relacionadas. Amostras com diferenças de quatro a seis bandas, representando dois eventos genéticos distintos, foram consideradas como possivelmente relacionadas. Aquelas contendo sete ou mais bandas de diferença, representando três ou mais eventos genéticos, foram consideradas não correlacionadas.

As amostras também foram analisadas com auxílio do aplicativo GelCompar versão 3 (Applied Maths) e os percentuais de similaridade foram determinados pelo

Coeficiente de Dice. Os dendrogramas foram construídos usando-se tolerância de 1,5 % e otimização de 1,5 %.

7- Análise do polimorfismo genético através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *P. aeruginosa* foi realizada conforme descrito por Carvalho *et al.*, (2006). As amostras bacterianas foram semeadas em placas contendo *Tryptcase Soy Agar* (TSA; Difco, Detroit, Mich.) e incubadas a 35-37°C por 18-24h. A seguir, as células bacterianas foram suspensas em 500µL de tampão PIV (1M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,6) de forma a ter turvação equivalente a do padrão 5 da escala de McFarland. À suspensão bacteriana foi adicionado igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve GTG agarose; FMC BioProducts, Rockland, Maine, EUA) a 2% preparada em tampão PIV. A mistura obtida foi vertida em moldes apropriados para a obtenção de blocos.

Após a solidificação da agarose, os blocos foram colocados em 3,5mL de solução de lise (6mM Tris-HCl, pH 7,6; 1M NaCl; 100mM EDTA; 0,5% Brij-58; 0,2% desoxicolato sódico; 0,5% lauril sarcosinato de sódio; 1mg/mL de lisozima) e incubados por 15-18h a 35-37°C, sob agitação branda. Após esse período, os tubos foram resfriados a 4°C - 8°C e a solução foi substituída por 2,0mL de solução ESP (0,5M EDTA, pH 8,0; 1% Sarcosyl; 0,1mg/mL de proteinase K) com incubação por 18-24h a 49-51°C sob leve agitação. A seguir, a solução foi substituída por nova solução ESP e incubada durante 18-24h a 50±1°C. Os blocos foram, então, lavados em tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,1mM EDTA) por 5 vezes a 35-37°C, sob agitação branda (três lavagens de 20 a 30 min cada, duas lavagens de 2h cada e uma lavagem de 24h).

Um ou dois blocos de cada amostra foram colocados em 200µL do tampão da enzima (20µL do tampão; 180µL de água milliQ esterilizada) e incubados por 2h à 35-

37°C. Após esse período, os blocos foram submetidos ao tratamento com solução contendo 15U da enzima de restrição *SpeI* (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, Ind, EUA) por 16-18h a 35-37°C em aerobiose.

A enzima de restrição foi retirada e os blocos contendo o DNA digerido foram fundidos à 72°C e aplicados em gel de agarose (SeaKem GTG agarose; FMC) a 1,0% em 0,4X TBE. A separação eletroforética foi realizada no sistema CHEF DRIII (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EUA) por 18h a 6V/cm, com pulso inicial de 5 segundos e pulso final de 35 segundos, a 14°C. Para a visualização das bandas obtidas, o gel de agarose foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 30 minutos, sob agitação, descorado em água por no mínimo 2h, observado em transiluminador de UV e posteriormente fotografado.

Os resultados obtidos foram analisados visualmente seguindo os critérios de Tenover *et al.* (1995) e posteriormente, com auxílio do *software* GelCompar versão 3 (Applied Maths) e os percentuais de similaridade foram determinados pelo Coeficiente de Dice, mesmos critérios estabelecidos para o RAPD.

SEGUNDA FASE DO ESTUDO:

A segunda fase deste estudo foi desenvolvida no Laboratory of HealthCare Associated Infection (LHCAI) - Health Protection Agency (HPA) Colindale - Londres, Inglaterra sob a supervisão do Dr. Tyrone Leslie Pitt.

8- Análise do polimorfismo genético através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A partir de crescimento recente (18-24h / 35-37°C) em agar nutriente (AN - Oxoid), 1-3 colônias foram gentilmente ressuspensas em 1mL de tampão SE (75mM NaCl, 25mM EDTA pH 7.5) e ajustado para uma turbidez de 2.3 - 2.7 McFarland, com o

emprego do densitômetro ATB (*BioMérieux* SA France). Seguiu-se uma segunda diluição de 1:1, onde 400 µL da suspensão bacteriana foram adicionados a 400µL agarose a 2% (MacroSieve LM agarose Flowgen Bioscience UK) diluída em tampão SE a uma temperatura de 54-56°C.

Para o processo de emblocamento das células para extração “*in situ*”, após homogeneização, a suspensão foi dispensada em molduras plásticas (10 mm x 5mm x 1mm). As molduras foram condicionadas sob 4°C por aproximadamente 20 min. Os blocos foram removidos para pequenos frascos de vidros (*bijou bottles*), contendo 3mL de tampão de lise (6mM Tris, 100mM EDTA, 1M NaCl, 0,5% w/v Brij 58, 0,2% w/v sodium deoxycholate, 0,5% N-lauroyl sarcosine, 1mM MgCl₂ pH 7,5) e 500 µg/mL de lisozima (Sigma Aldrich USA). Esses blocos foram, então, incubados a 34-36°C/ 18-24h sob agitação.

Em seguida, um segundo ciclo de lise foi realizado, o primeiro tampão de lise foi descartado e a cada frasco de vidro adicionado 3 mL de tampão de lise alcalino (1% (w/v) N-lauroyl sarcosine, 0,5 M EDTA pH 9.5) e proteinase K (3,6 µL de uma solução de 50mg/mL) e condicionado a 55±1 °C / 18-24h sob agitação.

Os blocos foram lavados quatro vezes com TE 1X (10mM Tris, 10 mM EDTA pH 7,5) e após cada lavagem, foram incubados a uma temperatura de 4°C por no mínimo 30 minutos. Uma pequena porção de cada bloco (aproximadamente 5 x 2 mm) foi cortada e transferido para um tubo tipo *Eppendorf* de 0,5 mL. A esses tubos de reação foram adicionados 100 µL do tampão H (recomendado pelo fabricante da enzima de restrição usada - Roche). Após incubação a 4°C por 30 min, o tampão foi substituído por um tampão recente acrescido de 2 µL (20U) da enzima de restrição *SpeI* (Roche - Indianápolis IN USA) . Esta mistura foi incubada por 4-5 horas a 35-37°C.

Os fragmentos de DNA foram então separados em gel de agarose a 1,2% (Certified Molecular Biology Agarose – Bio-Rad Laboratories CA USA) por eletroforese

em campo pulsado (PFGE) com equipamento CHEF DRIII System (Bio-Rad) em TBE 0,5 (44,5mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) por 30 horas com pulso inicial de 1 e final de 50 s. Lambda (λ) ladder PFGE Marker (New England Biolabs) foi utilizado como marcador de peso molecular.

O gel foi imerso em solução de brometo de etídio (1 μ g/mL) por 50 min, descorado em água por 20 min, observado em transiluminador de UV e posteriormente fotografado (Ingenius Syngene BioImaging, England). Para análises dos géis, foi utilizado o aplicativo *BioNumerics Software* 5.3 (Applied Maths, St. Marten-Latem, Belgium).

9- Determinação da frequência de mutação (Oliver *et al* 2000):

Os microrganismos classificados como hipermutáveis pelos critérios de Maciá *et al.* (2004) foram estudadas quanto à frequência de mutação. Uma colônia foi ressuspensa em 10 mL de *Müller-Hinton Broth* (MHB) e incubada 35-37°C / 18-24 h sob forte agitação. Essa cultura foi então centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de MHB. A suspensão obtida foi então submetida a diluições sucessivas de base 10 em MHB, de modo a obtermos diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} . 100 μ L das diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram semeadas em MHA e o mesmo volume, nas diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , foram plaqueadas em MHA contendo 300 μ L/mL de rifampicina (Sigma).

As colônias foram quantificadas após 36 h de incubação a 35-37°C. O número de mutantes foi então calculado para cada amostra, isto é: número de colônias com crescimento no meio com antimicrobiano dividido pelo número de colônias no meio desprovido de antimicrobiano, levando-se sempre em conta o fator dilucional. Para melhor desempenho foram escolhidas preferencialmente as diluições que apresentavam contagem de 100 a 1000 UFC.

Uma amostra foi considerada como hipermutável quando a frequência de mutação era de pelo menos 20 vezes maior que a taxa observada com a amostra controle PAO1. Como controle positivo utilizamos uma cepa clínica previamente classificada como hipermutável (RH04000003-2), gentilmente cedida pela Dra. Joanne L Fothergill da University of Liverpool, UK.

10- Sequenciamento dos genes *mutS*, *mutY*, *mutM*, *mutD*, *mutT* e *urvD* .:

A caracterização genotípica da mutação foi realizada por técnica de sequenciamento gênico, utilizando-se iniciadores desenvolvidos para amplificar os genes envolvidos no sistema de reparo e prevenção de erros gênicos (*mutS*, *mutY*, *mutM*, *mutD*, *mutT* e *urvD*). As amostras selecionadas foram aquelas que apresentaram algum crescimento do meio com rifampicina, independente de ser ou não classificadas como HPM.

Inicialmente foi feita uma reação de PCR para cada par de iniciador, como descrito na tabela 2. Para extração do DNA bacteriano, cada amostra foi semeada em ágar nutriente e incubada por uma noite. Após esse período, uma colônia foi suspensa em 100 µl água destilada estéril em tubos tipo *Eppendorf*, posteriormente homogeneizada com auxílio do Vortex e centrifugada por 2 min a 12000 rpm. O DNA molde foi mantido em banho de gelo durante a preparação da mistura de reação. Cada 25 µL de reação de PCR continham os seguintes reagentes: aproximadamente 20 ng de DNA, 250 µM de cada iniciador, 1,5 mM MgCl₂, 1 X de tampão PCR, 20 pmol de cada iniciador, 1,25 U de Taq polimerase (Qiagen) e água destilada estéril. As condições de reação para a detecção dos genes foram: 1 ciclo de 95° C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 95° C por 1 min, temperaturas de anelamento estão descritas na tabela 2, com um período de extensão final de 72° C por 10 min. Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 1,2% em 1X TBE. O gel foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) para coloração, posteriormente visualizado em

transiluminador de UV e fotografado. Como controle negativo foi usado uma mistura do PCR sem DNA e como controle positivo usamos a amostra PAO1.

Tabela 2: Sequência dos iniciadores e temperatura de anelamento utilizados para genes do sistema de reparo em *P. aeruginosa*.

| Primer | Seqüência do primer (5' - 3') | Temperatura de anelamento (°C) | Referência |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| <i>mutS1</i> | ATGACCGACCTCTCCCAGCA | 62 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutS2</i> | TCTGGAATCAGCAGCTCGGC | | |
| <i>mutS3</i> | GCCGCTTCAGCGTCCAGGAGATAA | 65 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutS4</i> | TTTTCGCTCAGCGCCTGCAGCT | | |
| <i>mutS5</i> | GAAGTGGTGGCCAAGGCGAT | 59 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutS6</i> | TTCGCCAGCACGTCCAGTTC | | |
| <i>mutS7</i> | CCGCATCCATGGCTACTTCA | 58 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutS8</i> | GATGCGGTCCACCAGGGA | | |
| <i>mutS9</i> | GCGGTTTCGTCGAACACACCT | 59 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutS10</i> | TAGTTCTCTCCTCAGGCGGG | | |
| <i>urvD1</i> | CAAGGGCTCGACATGGACGGTCATA | 65 | esse estudo |
| <i>urvD2</i> | TTGGTGAAGGTCACCGACAGGATGC | | |
| <i>urvD3</i> | AGCATCCTGTCCGGTACCTTCACCA | 65 | esse estudo |
| <i>urvD4</i> | TGGAACTCGTCCACCAGGATATGGC | | |
| <i>urvD5</i> | GGTGGACGAGTTCAGGACACCAAC | 65 | esse estudo |
| <i>urvD6</i> | GTTGGAGCGGTAGAGGATGGCGATC | | |
| <i>urvD7</i> | AGATCGCCATCCTCTACCGCTCCAA | 65 | esse estudo |
| <i>urvD8</i> | AGGACCTTGTTGGCGATCATCAGG | | |
| <i>urvD9</i> | AGAAGACCGTGGAGAGCATCCGCGA | 65 | esse estudo |
| <i>urvD10</i> | TAGGTCAGGACCAGTCGCTGCATGG | | |
| <i>urvD11</i> | CGCACAAGATGAGCCTGGAGGAATC | 65 | esse estudo |
| <i>urvD12</i> | GGATGAAGGTGGCGAAGTCCGAATC | | |
| <i>mutY1</i> | ATGACACCTGAAGGCTTCAA | 55 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutY2</i> | ACTGAAGGTATGGGTCAGGC | | |
| <i>mutM1</i> | ATGCCCGAACTACCCGAAGTCG | 63 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutM2</i> | TTGGCAGCGCGGGCAGTACA | | |
| <i>mutD1</i> | TGCGTAGCGTCGTAAGGATAC | 61 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutD2</i> | TCCAGTTGCGCCAGAGTGA | | |
| <i>mutT1</i> | CTGGACCAGGAGGAAACGCT | 62 | Kenna <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>mutT2</i> | GTGATTTCGTGGCTCCGATGG | | |

Para remoção de excesso de iniciadores e nucleotídeos, o produto do PCR foi submetido à purificação pelo kit USB/ExoSAP-IT® (USB Europe Corporation) onde 5µL de amplicon foram misturados com 2µL da enzima de purificação (ExoSap-IT) em tubos Eppendorfs, e submetidos à incubação por 37°C por 15 min, para ação enzimática e inativação da enzima a 80°C por 15 min, seguindo as recomendações do fabricante.

Com obtenção do *amplicon* purificado iniciamos a reação de seqüenciamento do DNA, com auxílio do kit DTCS Quick Start (GenomeLab™) que foi realizado utilizando-se os mesmos iniciadores da reação de PCR. A mistura para seqüenciamento constituiu-se de 1 µL de cada iniciador (10mM) da reação de PCR, 9 µL de água estéril destilada, 2 µL do amplicon purificado e 8 µL da solução de CEQ (DTCS Quick Start). As condições de termociclagem foram: 31 ciclos de 96° C por 20 s, 50° C por 20 s e 60° C por 4 min. Após o ciclo termal, a cada poço da microplaca de seqüenciamento foi adicionado 5 µL de solução de parada/glicogênio (2 µL de 3M acetato de sódio, 2 µL de 100mM Na₂-EDTA e 1 µL de 20mg/mL glicogênio). Para a próxima etapa deu-se a precipitação do etanol, 60 µL de etanol/dH₂O 95% (v/v) -20°C foi adicionado a cada amostra, sendo imediatamente submetidos à centrifugação (Allegra™ X-22R, Beckman-Coulter), 3000 rpm/4°C por 30 min. Cuidadosamente o sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta. O precipitado foi lavado por duas vezes com 200 µL de etanol/dH₂O 70% (v/v) -20°C. A cada lavagem, para precipitação, realizamos centrifugação imediata de 3000 rpm a 4°C por 5 min. Foi aguardada a secagem das microplacas por 20 min em temperatura ambiente e, após esse período, as amostras foram ressuspensas em 40 µL de SLS (*Sample Loading Solution*). Uma gota de óleo mineral estéril foi adicionada em cada poço para evitar evaporação. As reações foram então aplicadas no seqüenciador *Beckman Coulter CEQ 8000 System* (Beckman Coulter, High Wycombe, UK), reação de óxido nucleotídeo.

Os cromatogramas de DNA obtidos foram analisados usando o aplicativo *BioNumerics Software* (Applied Maths, St. Marten-Latem, Belgium) e as seqüências de alinhamento foram comparadas com a de PAO1 publicadas da (GenBank NC002516

ou Pseudomonas Genoma Database V2) em BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

11- Determinação do estado nutricional (King, Ward & Raney, 1954)

Uma colônia de *P. aeruginosa* foi semeada em caldo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI – Difco) e incubada a 35-37°C 18-24h. Após incubação, o crescimento foi ressuspensão em água destilada estéril, de modo que se obtivesse uma suspensão bacteriana com turbidez de 0.5, o que correspondeu a 10^8 UFC/mL. Para o preparo da suspensão bacteriana foi utilizado o densitômetro ATB (*BioLab Meriéux SA France*). Essa suspensão foi então diluída em base 10 (900 µL de água estéril com 100 µL da suspensão bacteriana) e aplicada o volume de 0.3 µL em spot (~ 10^4 UFC) na superfície dos meios *Minimal Salt Ágar* (MSA) e Ágar Nutriente (AN – Oxoid Basingstoke Hampshire England). A placa foi incubada a 35-37°C por aproximadamente 24 h. A amostra foi considerada como prototrófica quando se observava crescimento no meio MSA e auxotrófica quando não se observava crescimento no mesmo. A aplicação da suspensão bacteriana no meio AN foi utilizada como controle positivo de crescimento.

A composição do meio *Minimal Salt* (MS) apresentava a seguinte constituição: 20 g de cloreto de amônio, 4 g de nitrato de amônio, 8 g de sulfato de sódio anidro, 12 g de hidro ortofosfato di-potássio anidro, 4 g de dihidrogênio ortofosfato de potássio, 0.4 g de hepta sulfato de magnésio hidratado, essa composição foi aplicada em 1L de água destilada e teve o seu pH ajustado para 7.2. Cada 100 mL de MSA continha: 25 mL de MS, 75 mL de água destilada estéril, 1 g de ágar e 1 mL de glicose a 20%.

12- Teste de mobilidade (Diziel, Comeau & Villemur, 2001):

12.1- *Swimming*:

Uma colônia foi semeada em CN (Caldo Nutriente – Oxoid Basingstoke Hampshire England) e incubada a 35-37°C durante 18-24h. Após incubação o crescimento bacteriano foi homogeneizado e um volume de 3 µL foi aplicado no centro do meio AN. 10 mL do meio CN acrescido de 0,3% de AN foram distribuídos em placas de petri estéreis 90 X 15 mm, para formar uma camada de ágar de aproximadamente 1,6 mm. Após o período de 18-24h de incubação a 35-37°C a mobilidade foi avaliada qualitativamente, medindo-se a zona de turbidez que se formou, devido à migração das células bacterianas, a partir do ponto de inoculação.

12.2- *Swarming Motility* (Diziel, Comeau & Villemur, 2001):

Uma colônia foi semeada em CN e incubada a 35-37°C por 18-24 h. Após incubação o crescimento bacteriano foi homogeneizado e um volume de 3 µL foi aplicado em spot no superfície do meio composto por: 0,5% Bacto agar, 8g de CN/litro, suplementados com 5 g de dextrose/litro. Após o período de 18-24 h de incubação a 30°C a mobilidade foi avaliada qualitativamente medindo-se a zona de turbidez que se formou devido à migração das células bacterianas a partir do ponto de inoculação.

13- Quantificação da Produção de Píocianina (Salunkhe *et al.*, 2005):

Uma colônia bacteriana foi ressuspensa em 10 mL de caldo peptonado (1% peptona) e posteriormente incubada a 37-35°C durante 24h sob agitação de 250 rpm para que houvesse estímulo da produção de píocianina. 1,5 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para tubos *Eppendorf* de 1,5 mL e posteriormente centrifugado a 3.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi filtrado usando-se filtro estéril de 0,45 µm. A absorbância (A_{695}) de 200 µL de cada amostra previamente filtrada foi medida em espectrofotômetro Ultrospec® III Pharmacia (LaKB-Biochrom, England). As

amostras foram classificadas segundo os critérios estabelecidos por Fothergill *et al.*, 2004.

Tabela 3: Critério para classificação de *P. aeruginosa* quanto a produção de piocianina (Fothergill *et al.*, 2004)

| Produção de piocianina | A ₆₉₅ | Densidade celular A ₆₀₀ |
|------------------------|--|------------------------------------|
| Forte | > 0,1 | 1,2 |
| Intermediária | >0,1 | 1,7 |
| Fraca | Detecção similar a encontrada na PAO1 | |
| Negativa | Não detecção na produção de piocianina | |

14- Formação do Biofilme (Tendolkar *et al.*, 2004):

Os isolados de *P. aeruginosa* foram semeados em caldo TSB (Tryptcaseína de Soja, Merck) acrescido de 0,75% de glicose (TSB-G, Difco) e incubados por um período de 18-24h/35-37°C. Após crescimento, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 min e o precipitado foi ressuspenso em 5 mL de meio TSB-G recém preparado. Após homogeneização, a cultura bacteriana foi diluída 1:40 (950 µL de TSB-G com 250 µL da suspensão bacteriana) e 200 µL da suspensão diluída foram inoculadas em microplaca de polietileno estéril de 96 poços com fundo plano (Nunclon™ Surface, Nunc Dinamarca). Após incubação a 37°C durante 24h, as células planctônicas foram removidas, com auxílio de uma pipeta multicanal, e os poços lavados por 3 vezes com PBS (Salina Fosfatada Tamponada) estéril, sendo posteriormente deixada invertida em temperatura ambiente por uma hora para secagem.

Para quantificação do biofilme, 200 µL de uma solução aquosa de cristal violeta foi adicionada em cada poço. Após incubação em temperatura ambiente por 15 min, os poços foram lavados por 3 vezes com PBS estéril para remoção do excesso de corante. Para a remoção do cristal violeta ligado ao biofilme, foram utilizados 200 µL de uma mistura de álcool e acetona 80:20 (vol/vol) e a absorbância do extrato do cristal violeta

foi medido com leitor de ELISA Sunrise - Remote (Tecan Australia) em 595nm. Como controle para possível ligação do cristal violeta à microplaca, o teste foi também realizado em poços sem bactéria. Todo o processo foi realizado em triplicata. As amostras foram classificadas segundo os critérios estabelecidos por Seno *et al.*, 2005.

Tabela 4: Critério para classificação de *P. aeruginosa* quanto a formação de biofilme (Seno *et al.*, 2005)

| Formação de Biofilme | A ₅₉₅ |
|----------------------|------------------|
| Forte | ≥ 0,5 |
| Médio | ≥ 0,2 a <0,5 |
| Fraco | < 0,2 |

15- Atividade de LasA Protease (Kesser *et al.*, 1993)

Para detecção da atividade de LasA protease, uma colônia foi ressuspensa em 10 mL de *Luria broth* (LB), sendo incubada a 35-37°C por 18 - 24h sob forte agitação (250 rpm). 1 mL dessa cultura foi distribuído em tubos plásticos de 1,5mL e centrifugado a 3.000 rpm durante 2 min. O sobrenadante foi utilizado. Uma colônia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 9194®) foi semeada em 20 mL de LB, incubada a 34°C por 18h sob agitação de 250 rpm. A suspensão de *S. aureus* foi centrifugada a 3.500 rpm durante 10 minutos e o precipitado celular ressuspensa em 0,02 M de tris-HCl (pH 8,5) e ajustado absorvância para A₆₀₀ 0,8. 950 µL da suspensão ajustada de *S. aureus* foi adicionada a 50 µL do sobrenadante das amostras de *P. aeruginosa*. 200 µL dessa nova suspensão foram aplicadas em microplaca de polietileno estéril de 96 pocos com fundo plano (Nunclon™ Surface, Nunc Dinamarca) e determinado a absorvância com auxílio de um leitor de ELISA Sunrise Remote (Tecan, Austrália) em 600 nm, chamado de tempo zero. Em seguida a microplaca foi incubada a 35-37°C por 60 min, sendo posteriormente determinada sua absorvância. A atividade de LasA protease foi expressa em porcentagem referente leitura obtida em A₆₀₀ no tempo inicial (0 s) e final (60 min).

RESULTADOS

Primeira fase do estudo

Identificação de microrganismos:

No período do estudo, durante o processamento de espécimes clínicos, além dos patógenos pulmonares usuais como *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, observamos um aumento na frequência de microrganismos não usuais, especialmente os BGN-NF.

Em um dos pacientes foi isolado um BGN-NF com características morfológicas e fisiológicas nunca antes observadas pelo nosso grupo. Diante disso, em estudo mais aprofundado empregando um conjunto amplo de testes fenotípicos associados a métodos moleculares, publicamos o primeiro relato de *Paenibacillus cineris* em paciente com FC (Leão *et al.*, 2009). Embora este estudo não fizesse parte de nossos objetivos iniciais, o relato foi incluído no corpo desta tese e é apresentado, sob forma reduzida abaixo.

P. cineris foi isolado de escarro de paciente masculino, 25 anos, que apresentava problemas respiratórios crônicos desde a pré-escola. Devido a um episódio da exacerbação respiratória, a amostra do escarro foi coletada para exame bacteriológico. Foi observada a presença de colônias apresentando bordas ligeiramente irregulares e uma cor amarela em agar sangue, agar chocolate e agar CLED. Na bacterioscopia utilizando a técnica de Gram, este isolado mostrou-se como BGN contendo alguns endósporos. A bactéria não foi identificada usando um sistema automatizado (GN cartões; Sistema compacto de Vitek 2 com versão de software 1.02 (bioMérieux). Para identificação final o isolado foi submetido a identificação fenotípica e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e depositado em GenBank sob o nº de acesso FJ840534 (Anexo M).

Perfil de susceptibilidade e detecção de amostras hipermutáveis:

Foram estudadas 179 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de 20 pacientes fibrocísticos crônicos. As porcentagens de resistência aos antimicrobianos para as 179 amostras variaram de 1,1% para CIP a 5,5% para CAZ (tabela 4). Quarenta e três (24%) das amostras isoladas de 17 (85%) pacientes foram caracterizadas como hipermutáveis, seguindo os critérios estabelecidos por Maciá *et al.* (2004).

Quando comparamos o perfil de resistência da população selvagem e da subpopulação de hipermutáveis, observamos a emergência da resistência, na subpopulação, para todos os antimicrobianos. CAZ foi o único antimicrobiano no qual se observou resistência prévia na população selvagem (4,6%), enquanto nas subpopulações foi de 65,1%. Para os demais antimicrobianos, as amostras foram inicialmente classificadas como sensíveis nas suas subpopulações passaram a apresentar os seguintes percentuais de resistência: IMP 30,2%, MER 16,2%, TOB 4,6% e CIP 2,3% (Tabela 5). As diferenças entre os percentuais de resistência das populações selvagens e subpopulações hipermutáveis foram significativas para CAZ, IMP e MER.

Quando as porcentagens de resistência das subpopulações (HPM) e não-hipermutáveis (NHPM) foram analisadas, as taxas de resistência da NHPM eram de 5,8%, 4,4%, 2,2% e 1,4% para CAZ, IMP, MER, CIP e TOB, respectivamente. As subpopulações apresentaram maiores taxas, alcançando os seguintes percentuais 65,1%, 30,2%, 16,2%, 2,3% e 4,6% para CAZ, IMP, CIP e TOB, respectivamente (tabela 5).

Tabela 5: Percentual de resistência para isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|----------------|
| Antimicrobianos | Total | NHPM | HPM | |
| | | | População selvagem | Subpopulação |
| | n= 179 n (%) | n= 136 n (%) | n= 43 n (%) | n= 43 n (%) |
| Ceftazidima | 10 (5,5) | 8 (5,8) | 2 (4,6) | 28 (65,1)* |
| Imipenem | 6 (3,5) | 6 (4,4) | - | 13 (30,2)* |
| Meropenem | 3 (1,6) | 3 (2,2) | - | 7 (16,2)* |
| Ciprofloxacina | 2 (1,1) | 2 (1,4) | - | 1 (2,3) |
| Tobramicina | - | - | - | 2 (4,6) |

NHPM= não-hipermutável; HPM= hipermutável

* Teste Exato de Fisher's: $p \leq 0,05$ quando os percentuais de resistência entre as população selvagem e subpopulação foram comparadas.

As subpopulações apresentaram uma substancial redução no diâmetro de halos de inibição pelos diferentes antimicrobianos, quando comparadas com a população selvagem. Tendo sido significativo para todos os antimicrobianos, exceto para CIP.

Tabela 6: Média dos diâmetros de inibição das populações selvagens e subpopulações dos isolados classificados como hipermutáveis.

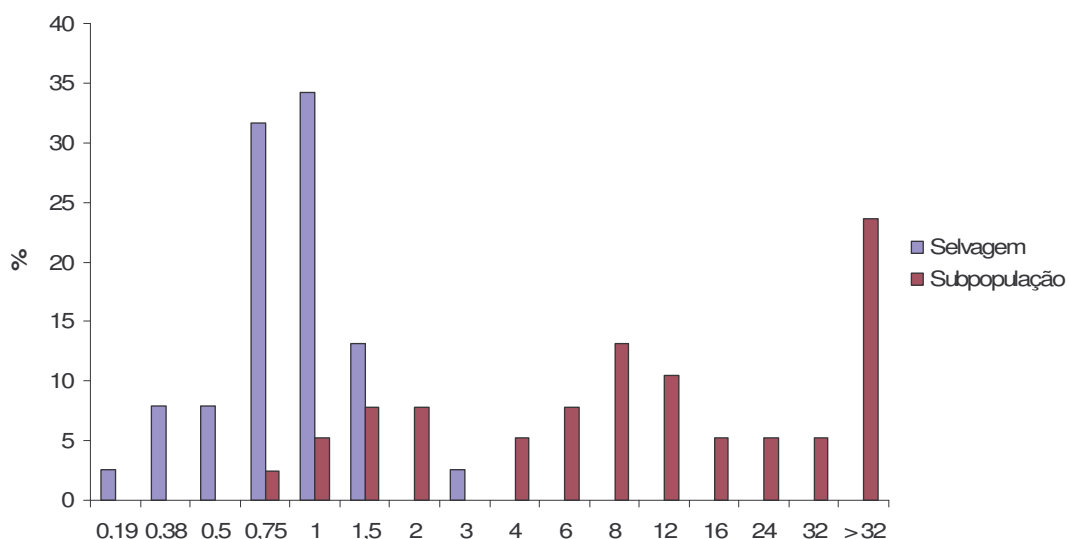
| Antimicrobianos | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | p |
|-----------------|---|-----------------------------------|----------|
| | População selvagem | Subpopulação | |
| | Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) / n | Média (mm) do halo de inibição/ n | |
| Ceftazidima | 27,9 / 43 | 14 / 38 | < 0,0001 |
| Imipenem | 28 / 43 | 17 / 38 | < 0,0001 |
| Meropenem | 31 / 43 | 19,7 / 43 | < 0,0001 |
| Ciprofloxacina | 34 / 43 | - / 1 | - |
| Tobramicina | 25 / 43 | 20 / 34 | < 0,0001 |

p – Teste T (significativo quando $p \leq 0,05$)

As 43 amostras identificadas com hipermutáveis foram submetidas à determinação das CIMs para os antimicrobianos IMP e CAZ com a utilização de fitas de

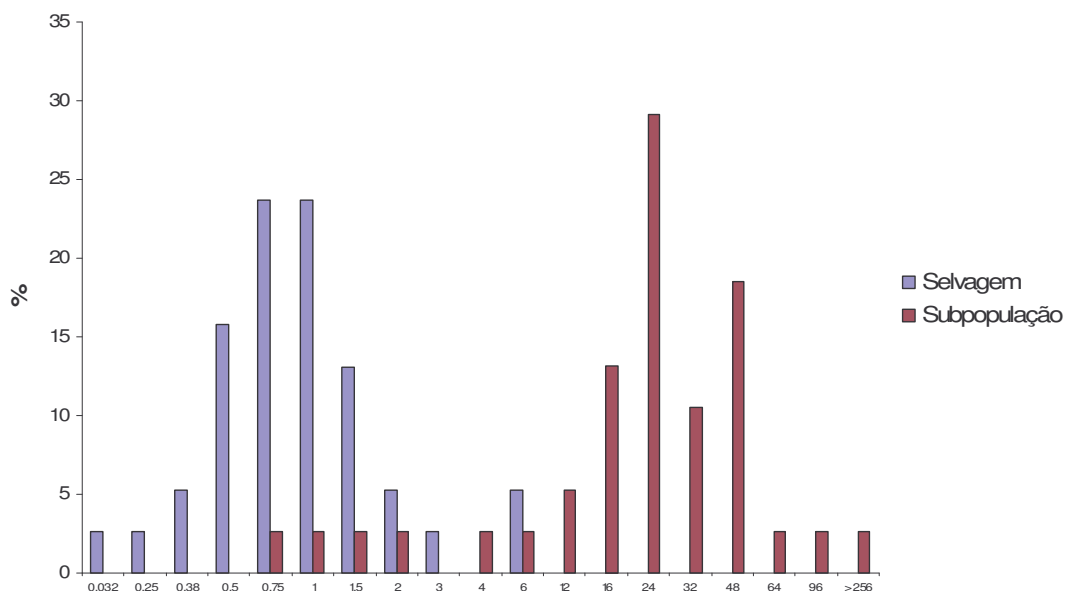
E-test®. Observamos que para IMP, as CIMs da população selvagem variaram de 0,10 a 3 µg/mL, com média de 0,908 µg/mL. As CIMs das subpopulações, variaram de 0,75 a > 32 µg/mL, com média de 7,138 µg/mL (Figura 1). Para CAZ, as taxas da população selvagem variaram de 0,032 a 6 µg/mL, com média de 1,203 µg/mL, enquanto nas subpopulações, a variação foi de 0,75 a >256 µg/mL, com média de 26,57 µg/mL (Figura 2). A comparação entre as CIMs mostrou que as subpopulações apresentavam um significativo aumento no nível de resistência para esses antimicrobianos, quando comparados com a população selvagem (tabela 7).

Figura 1: Percentual de amostras das populações selvagem e subpopulação em *P. aeruginosa* com os diferentes valores de concentração inibitória mínima para imipenem.



Interpretação da CIM para IMP: S: ≤ 4; I: 8; R ≥ 16.

Figura 2: Percentual de amostras das populações selvagem e subpopulação em *P. aeruginosa* com os diferentes valores de concentração inibitória mínima para ceftazidima:



Interpretação da CIM para CAZ: S: ≤ 8 ; I: 16; R: ≥ 32 .

Tabela 7: Média das concentrações inibitória mínima (CIM) das populações selvagens e subpopulações dos isolados classificados como hipermutáveis.

| Antimicrobianos | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | p |
|-----------------|-------------------------------|----------------------|----------|
| | População selvagem | Subpopulação | |
| | Média da CIM (µg/mL) | Média da CIM (µg/mL) | |
| Ceftazidima | 1,203 | 26,57 | < 0,0001 |
| Imipenem | 0,908 | 7,138 | < 0,0001 |

p – Teste T (significativo quando $p \leq 0,05$)

Detecção fenotípica de metalo- β -lactamase:

A caracterização de MBL foi realizada em todas as amostras estudadas (n= 179), independente da susceptibilidade apresentada aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem), empregando-se seis testes fenotípicos. Se considerarmos o resultado obtido em todos os testes, encontramos 45 amostras positivas (25,1%) positividade esta definida por algum dos testes empregados. Na tabela 8 estão discriminados os

resultados obtidos em cada teste. O TDS – CAZ com EDTA 0,5M foi o único teste sem positividade, enquanto no TS (IMP) encontramos a maior número de resultados positivos (n= 40 - 88,8%) (Tabela 8).

Tabela 8: Rastreamento de metalo- β -lactamase em 179 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes fibrocísticos, empregando-se seis testes fenotípicos.

| Testes (Inibidor) | Substratos | n | % |
|---------------------------------|-------------|----|------|
| TDC (EDTA 0,1M) | Imipenem | 5 | 11,1 |
| TDA (EDTA 0,1M) | Imipenem | 40 | 88,8 |
| TDSS (ácido mercaptopropiônico) | Imipenem | 3 | 6,6 |
| | Ceftazidima | 5 | 11,1 |
| TDSS (EDTA 0,5M) | Imipemen | 3 | 6,6 |
| | Ceftazidima | - | - |

TDC= Teste de Disco Combinado; TDA= Teste de disco aproximação; TDSS= teste Duplo Sinérgico;

Detecção dos genes codificadores de metalo- β -lactamase:

As amostras caracterizadas fenotipicamente (independente do teste) como produtoras de MBL, foram submetidas à técnica de PCR para pesquisa dos genes *bla_{SPM1}*, *bla_{IMP1}* e *bla_{VIM2}*. Utilizando a metodologia da PCR não foi detectada a presença dos genes pesquisados

Análise do polimorfismo genético pela técnica de RAPD-PCR

A técnica se mostrou reprodutível e entre as amostras estudadas não foi detectada presença de um clone prevalente. Quando analisamos a população em geral, observamos grande variedade genética entre as amostras de *P. aeruginosa*.

No total de 179 amostras foram encontrados 49 perfis. Alguns perfis eram exclusivos em alguns pacientes, como por exemplo, o perfil C, exclusivo do paciente CE. Também nos pacientes em que observamos um número maior de isolados, observamos a presença de um clone persistente, como por exemplo, o perfil A (n=6), recuperados em culturas realizadas entre o intervalo de 2003 a 2005, mostrando assim a persistência de *P. aeruginosa* no ambiente pulmonar desses pacientes ao longo do tempo (Tabela 9).

Tabela 9: Perfis moleculares distintos, determinados pela técnica de RAPD, encontrados exclusivamente em um paciente.

| Perfil | Número de isolados | Paciente | Período |
|--------|--------------------|----------|-------------------------|
| A | 6 | JE | 28/08/2003 a 27/01/2005 |
| L | 6 | BR | 10/07/2003 a 19/08/2004 |
| Y | 6 | WA | 18/10/2004 a 09/06/2005 |
| MM | 6 | LA | 21/08/2003 a 01/02/2005 |
| XX | 5 | AL | 08/10/2003 a 23/03/2005 |
| BB | 5 | AR | 21/08/2003 a 30/08/2004 |
| D | 4 | DI | 04/04/2003 a 21/11/2003 |
| KK | 4 | DV | 18/10/2004 a 14/04/2005 |
| VV | 3 | DI | 09/04/2004 a 20/05/2005 |
| SS | 3 | JN | 01/12/2003 a 27/01/2005 |
| C | 2 | CE | 09/03/2004 a 06/01/2005 |
| H | 2 | CA | 10/07/2003 a 16/09/2004 |
| T | 2 | DV | 30/08/2004 a 18/10/2004 |
| X | 2 | JO | 01/07/2004 a 26/08/2004 |
| NN | 2 | DV | 01/09/2003 a 07/06/2004 |
| QQ | 2 | JN | 17/07/2003 a 14/12/2004 |
| W | 2 | LA | 22/05/2003 a 17/06/2004 |
| EE | 1 | CE | 11/03/2005 |
| GG | 1 | DV | 16/12/2004 |
| DD | 1 | JA | 13/05/2004 |
| E | 1 | CA | 15/01/2004 |
| J | 1 | JC | 01/07/2004 |
| B | 1 | JN | 17/03/2003 |
| CC | 1 | DV | 02/12/2004 |
| Q | 1 | WA | 05/04/2004 |
| S | 1 | JC | 26/06/2003 |
| ZZ | 1 | JA | 15/05/2003 |

Foi observada também a presença do mesmo grupo clonal em diferentes pacientes, como observado no perfil AA, presente em 7 pacientes (tabela 10).

Tabela 10: Perfis clonais comuns detectados em diferentes pacientes fibrocísticos, pela técnica de RAPD:

| Perfil | Total de isolados | Total de pacientes | Nº de isolados por paciente |
|--------|-------------------|--------------------|--|
| AA | 9 | 7 | CA (n=1), LU (n=2), TH (n=1), WA (n=1), JA (n=2), JO (n=1), RA (n=1) |
| F | 5 | 3 | CA (n=1), JA (n= 3), JO (n=1) |
| FF | 3 | 2 | LA (n=1), TH (n=2) |
| G | 4 | 2 | DI (n=1), JE (n=3) |
| HH | 8 | 3 | AR (n=6), CA (n=1), DV (n=1) |
| I | 9 | 6 | BR (n=1), CM (n=4), CE (n= 1), JE (n= 1), WA (n= 1), SA (n=1) |
| II | 4 | 3 | CA (n=1), JA (n= 1), TH (n=2) |
| JJ | 7 | 4 | BR (n=1), JO (n=2), CA (n=1), RA (n=3) |
| K | 2 | 2 | DV (n=1), LA (n=1) |
| LL | 4 | 3 | DV (n=1), TH (n=2), SA (n=1) |
| M | 2 | 2 | WA (n=1), SA (n=1) |
| N | 6 | 3 | AN (n=3), AR (n=1), SA (n=1) |
| O | 2 | 2 | AR (n=1), CA (n=1) |
| OO | 4 | 2 | JO (n=3), RA (n=1) |
| P | 12 | 3 | LA (n= 1), LU (n= 8), TH (n=2), WA (n= 1) |
| PP | 3 | 3 | BR (n=1), CA (n= 1), DV (n= 1) |
| R | 2 | 2 | AL (n=1), AN (n=1) |
| TT | 3 | 2 | CE (n=1), JN (n= 2) |
| U | 6 | 3 | JE (n=2), JC (n=2), LU (n=2) |
| UU | 3 | 2 | CM (n=1), CA (n=2) |
| V | 3 | 3 | CA (n=1), SA (n=1), WA (n=1) |
| Z | 6 | 4 | WA (n=3), SA (n=1), JO (n=1), JA (n=1) |

Análise do polimorfismo genético através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Como critério de seleção para a execução do primeiro PFGE, usamos os resultados obtidos no RAPD. Foram selecionados um representante de cada perfil clonal: uma HPM e uma NHPM, quando aplicável, perfazendo um total de 78 amostras.

Em duas das amostras, não foram possíveis quebras do DNA bacteriano com a enzima trabalhada. À semelhança do que foi encontrado no RAPD, também observamos grande diversidade clonal (38 perfis) e clones exclusivos entre os pacientes (Tabela 11).

Tabela 11: Perfis clonais comuns detectados em diferentes pacientes fibrocísticos pela técnica de PFGE:

| Perfil | Número de isolados | Paciente | Período |
|--------|--------------------|--|---------------------|
| F | 6 | BR (1); CE (1); LA (1); SA (2); JR (1) | 17/02/04 a 01/07/05 |
| G | 3 | JÁ (1); LU (2) | 15/05/03 a 09/12/04 |
| GG | 4 | AR (3); DV (1) | 01/03/04 a 19/04/05 |
| HH | 4 | CA (1); JN (1); LA (1); TH (1) | 17/07/03 a 07/10/04 |
| J | 5 | TH (1); WA (4) | 05/04/04 a 09/12/04 |
| P | 6 | CR (5); JÁ (1) | 10/07/03 a 06/01/05 |
| U | 3 | JE (2); LA (1) | 21/08/03 a 01/07/04 |

Segunda fase do estudo

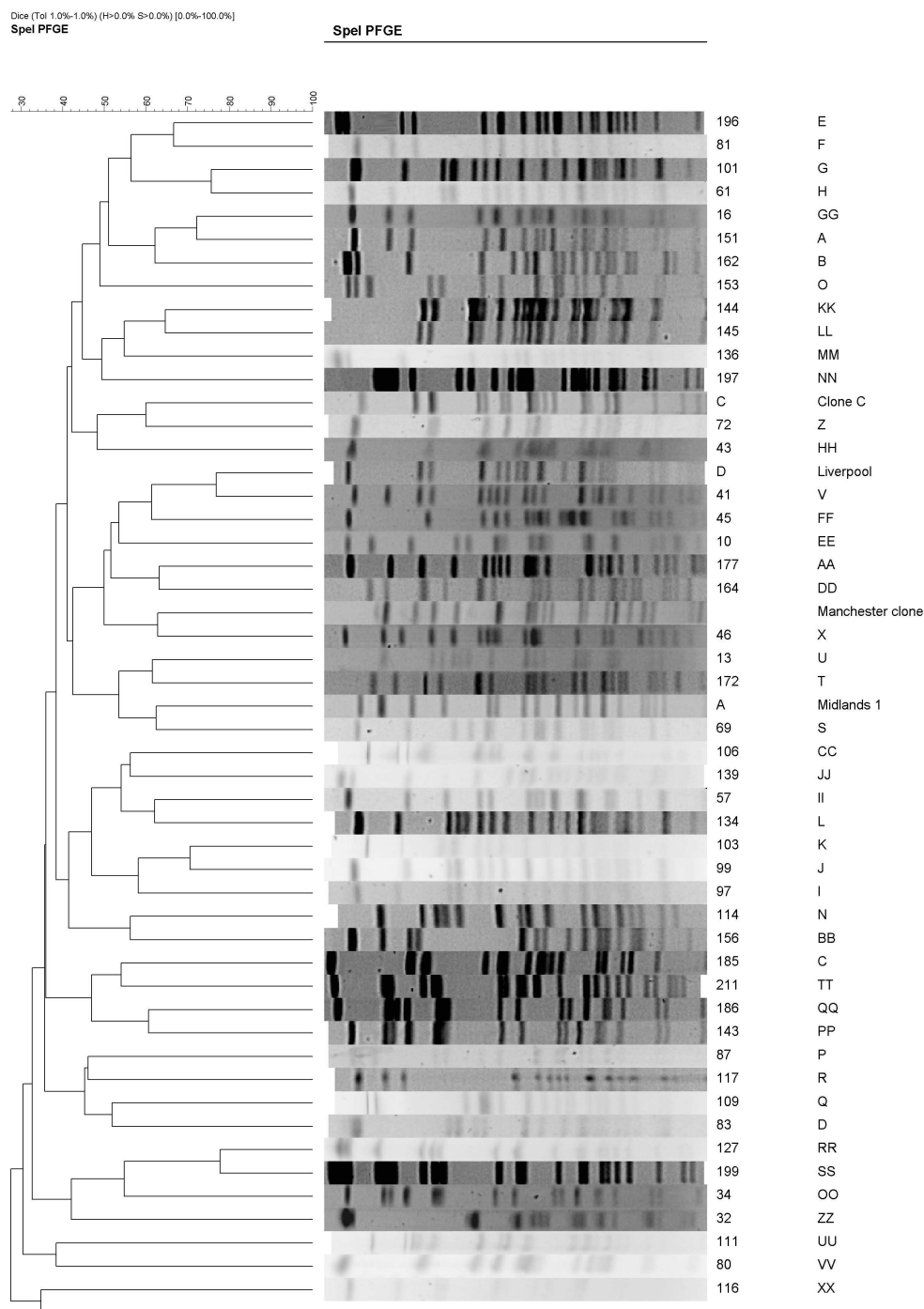
Para segunda fase do estudo, realizado no Laboratory of HealthCare Associated Infection (LHCAI) - Health Protection Agency (HPA) foram selecionadas 81 amostras, incluindo: a) um representante de cada grupo clonal, sendo um hipermutável e um não hipermutável, quando aplicável; b) amostras com perfis clonais que apareciam como crônicas em um paciente, no decorrer do tempo; c) todas as amostras classificadas como hipermutáveis pelo teste de triagem descrito por Maciá *et al.* (2004), independente do grupo clonal.

Análise do Polimorfismo genético por Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE

Além das amostras mencionadas foram incluídas no estudo de tipagem molecular as cepas epidêmicas Liverpool – H063880485 (Cheng *et al.*, 1996), Manchester – H072580529 (Jones *et al.*, 2001), clone C – H054900667 (Romling *et al.*, 1994) e Midlands – H050920421 (Scott & Pitt, 2004).

No total de 81 amostras de *P. aeruginosa* estudadas, foram encontrados 47 perfis clonais distintos. Não encontramos similaridade entre nossos clones e as cepas epidêmicas provenientes de outros países (Figura 3).

Figura 3: Dendrograma mostrando os 47 perfis gerados por PFGE das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC.



Determinação da frequência de mutação (Oliver *et al.*, 2000)

As 43 amostras classificadas como HPM pelo teste descrito por Maciá *et al* (2004), na primeira fase do estudo, foram analisadas quanto à estimativa da frequência de mutação seguindo os critérios descritos por Oliver *et al* (2000). Destas, apenas 3 apresentaram frequência de mutação vinte vezes maior do que a da cepa PAO1. Seis outras amostras apresentaram crescimento no meio com rifampicina, mas com taxas inferiores às estabelecidas para caracterização de HPM (Tabela 12).

Tabela 12: Frequência de mutação em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes fibrocísticos.

| Amostras | Morfotipo | Pacientes | Origem | Data | Frequência de mutação | Perfil no PFGE |
|----------|-----------|-----------|--------|------------|-----------------------|----------------|
| 52* | NM | CA | IFF | 27/04/2004 | $4,5 \times 10^{-7}$ | X |
| 60 | M | CE | HU | 13/01/2005 | $3,9 \times 10^{-9}$ | II |
| 93* | M | JA | IFF | 13/05/2004 | $4,1 \times 10^{-7}$ | WW |
| 95* | M | JA | IFF | 06/01/2005 | $4,9 \times 10^{-7}$ | WW |
| 100 | M | JE | IFF | 29/01/2004 | $1,2 \times 10^{-8}$ | G |
| 101 | M | JE | IFF | 15/04/2004 | $2,0 \times 10^{-8}$ | G |
| 127 | M | JO | HU | 27/02/2004 | $1,9 \times 10^{-7}$ | RR |
| 186 | M | SA | HU | 01/04/2005 | $1,6 \times 10^{-8}$ | QQ |
| 199 | M | JO | HU | 07/10/2005 | $1,5 \times 10^{-9}$ | SS |

* Amostras classificadas como hipermutáveis pelos critérios de Oliver *et al.* (2000). IFF: Instituto Fernandes Figueira; HU: Hospital Pedro Ernesto. M: mucoide; NM: não mucoide.

Sequenciamento dos genes *mutS*, *mutM*, *mutT*, *mutY*, *mutD* e *urvD*

Os genes foram sequenciados nas 9 amostras que tiveram crescimento no meio com rifampicina, tanto nas populações selvagens quanto em suas respectivas subpopulações resistentes, totalizando 18 amostras. Os resultados foram comparados com os obtidos com a cepa PAO1. As sequencias de alinhamento das amostras em estudo foram comparadas com as descritas na cepa PAO1 (GenBank NC002516 ou Pseudomonas Genoma Database V2) em BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

As amostras selvagens e mutantes estudadas apresentaram os mesmos resultados de sequencia dos genes estudados. Em todas foram observadas mutação nos genes sequenciados, exceto no gene *mutT*. Essas mutações ocorreram principalmente por substituição de base (Anexo A ao F). Muitas vezes foram mutações silenciosas, uma vez que, quando transformamos os produtos seqüenciados para aminoácidos, não observamos alterações (Anexo G ao L).

Após sequenciamento e alinhamento do gene *mutS*, observamos alteração de aminoácidos em quatro amostras (52,60,90 e 95). Na posição do nucleotídeo 739 da amostra 60, observamos a alteração do aminoácido Alanina (A) para Treonina (T), decorrente da alteração do nucleotídeo guanina para adenina. Essa mesma substituição de aminoácido repetiu-se na posição 781 nas amostras 52 e 60, embora não tenha ocorrido o mesmo tipo de mutação nos nucleotídeos (tabela 13). Nas amostras 93 e 95, pertencentes ao mesmo perfil clonal, na posição do nucleotídeo 768, verificamos uma mutação por substituição de bases, guanina para citosina (tabela 13), que foi suficiente para levar à substituição do aminoácido Arginina (R) para Prolina (P) (Tabela 13 e Anexo G).

Na amostra 127 observamos uma grande mutação por deleção na posição da base 162 (11 nucleotídeos). Além disso, entre o aminoácido arginina e histidina,

exatamente na posição 258, observamos um códon de terminação. Estas alterações nos levaram a concluir que a proteína codificada pelo gene não deve ser funcional. Curiosamente, a amostra 127 não foi classificada com HPM pelo teste da estimativa da frequência (Anexo G).

Tabela 13: Substituições no gene *mutS* de *P. aeruginosa*, detectadas pelo sequenciamento gênico em comparação com as sequências descritas na cepa PAO1.

| Posição do aminoácido | Posição do nucleotídeo | Códon da PAO1 | Aminoácido | Sequencia dos isolados | | | |
|-----------------------|------------------------|---------------|------------|------------------------|-----|-----|-----|
| | | | | 52 | 60 | 93 | 95 |
| 256 | 768 | CGC | Arginina | - | - | CCC | CCC |
| 739 | 2217 | GCG | Alanina | - | ACG | - | - |
| 781 | 2343 | GCC | Alanina | ACT | ACT | - | - |

Apenas a amostra 52 apresentou mutação do gene *mutD* (Anexo B). A mutação detectada resultou na substituição do aminoácido Metionina por Isoleucina na posição 193 (Tabela 14).

Tabela 14: Substituições no gene *mutD* de *P. aeruginosa*, detectadas pelo sequenciamento gênico em comparação com as sequências descritas na cepa PAO1.

| Posição do aminoácido | Posição do nucleotídeo | Códon da PAO1 | Aminoácido PAO1 | Sequencia dos isolados |
|-----------------------|------------------------|---------------|-----------------|------------------------|
| | | | | 52 |
| 193 | 579 | ATG | Metionina | ATA |

Com a análise do alinhamento do gene *urvD*, foram identificadas ocorrências de mutações nos nucleotídeos que levaram a alterações em alguns aminoácidos (Anexo C). Na posição 306, observamos uma alteração do aminoácido leucina (L) para prolina (P). A substituição da lisina (L) para arginina (R) foi notada na amostra 52 na posição 344. Na amostra 186, uma mutação no códon GGC para GCC foi capaz de alterar o aminoácido glicina (G) para alanina (A). A substituição dos aminoácidos serina para asparagina na posição 622 e de asparagina para serina na posição 666 foi detectada nas

amostras 52, 60, 63, 95, 127 e 199. Não observamos alterações nos aminoácidos das amostras 100 e 101 (Tabela 15 e Anexo I).

Tabela 15: Substituições no gene *urvD* de *P. aeruginosa*, detectadas pelo sequenciamento gênico em comparação com as sequências descritas na cepa PAO1.

| Posição do aminoácido | Posição do nucleotídeo | Códon da PAO1 | Aminoácido | Sequencia dos isolados | | | | | | |
|-----------------------|------------------------|---------------|------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 52 | 60 | 93 | 95 | 127 | 186 | 199 |
| 306 | 918 | CTG | Leucina | - | - | - | - | CCG | - | - |
| 344 | 1032 | AAG | Lisina | AGA | - | - | - | - | - | - |
| 657 | 1971 | GGC | Glicina | - | - | - | - | - | GCC | - |
| 662 | 1986 | AGT | Serina | AAC | AAC | AAC | AAC | AAC | - | AAC |
| 666 | 1998 | AAC | Asparagina | AGC | AGC | AGC | AGC | AGC | - | AGC |

Para os genes *mutM*, *mutT* e *mutY*, após alinhamento com os respectivos genes da cepa padrão PAO1, não observamos mutações que pudessem alterar os aminoácidos sintetizados (Anexos J, K e L).

Determinação da expressão de mecanismos de virulência

Nesta fase, foram analisadas todas as amostras selecionadas (n= 81) e também as subpopulações resistentes a rifampicina, detectadas no teste da estimativa da frequência (n= 9).

Determinação do estado (*status*) nutricional

Toas as 90 amostras testadas foram capazes de crescer no meio MSA, isto é, em meio contendo uma única fonte de carbono, o que as caracteriza como prototróficas. Assim, nenhuma das amostras teve metabolismo auxotrófico.

Determinação da motilidade do tipo *swimming* e *swarming*

O teste da mobilidade tipo *swimming* foi positivo para 81 amostras testadas. O diâmetro dos halos de turbidez variou de 0,9 a 8 cm, não tendo sido encontradas diferenças significativas quando os halos das populações selvagens foram comparados com as da subpopulação.

No teste de mobilidade tipo *swarming*, 75 amostras foram positivas. A variação do diâmetro das zonas de turbidez, que se formaram a partir do ponto de inoculação, foi de 0,8 a 2,7 cm. Também não foram significativas as diferenças entre as populações selvagens e as subpopulações. Na tabela 16, apresentamos a característica das 15 amostras que apresentaram mobilidade do tipo *swimming* e foram negativas a mobilidade tipo *swarming*.

Tabela 16: Características das 15 amostras de *P. aeruginosa* com resultados positivos no teste de motilidade tipo-*swimming* e negativos no teste de motilidade tipo-*swarming*.

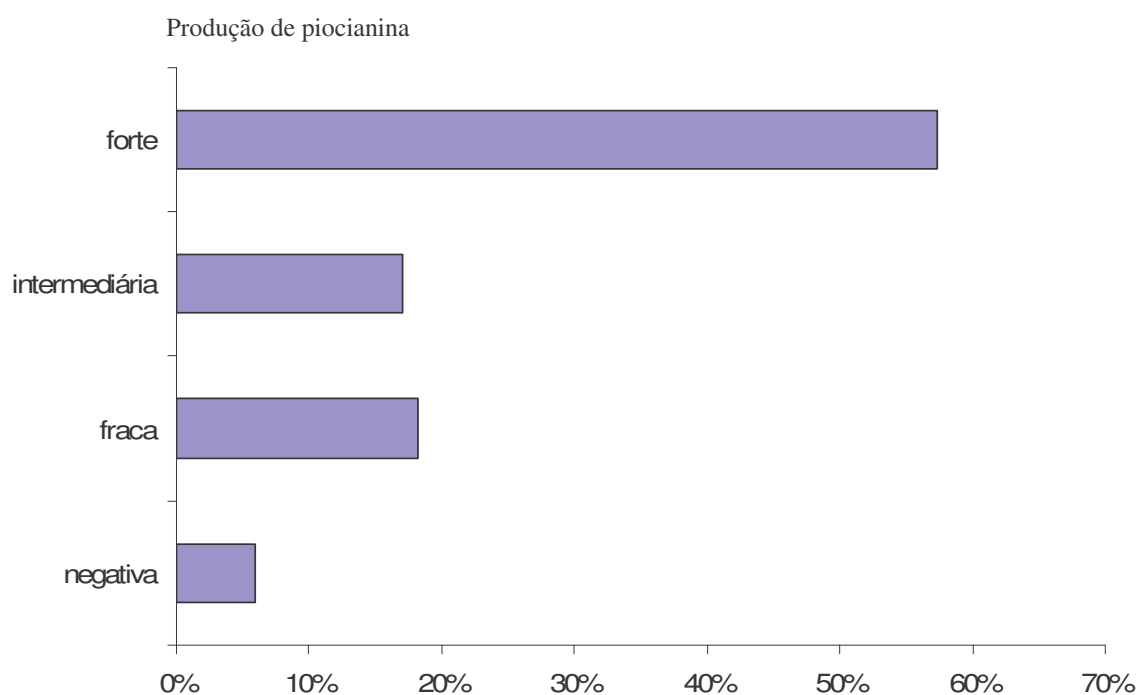
| Amostra | Paciente | PFGE | Swimming | Swarming |
|---------|----------|------|----------|----------|
| 32 | BR | ZZ | 3,3 | 0 |
| 41 | CA | V | 3,8 | 0 |
| 57 | CE | II | 1,9 | 0 |
| 61 | DI | H | 3,7 | 0 |
| 67 | DI | H | 4,0 | 0 |
| 68 | DI | H | 0,6 | 0 |
| 72 | DV | Z | 5,3 | 0 |
| 77 | DV | Z | 1,3 | 0 |
| 78 | DV | Z | 5,2 | 0 |
| 80 | DV | VV | 1,2 | 0 |
| 87 | JA | P | 2,7 | 0 |
| 95 | JA | WW | 2,7 | 0 |
| 96 | JA | II | 1,5 | 0 |
| 127 | JO | RR | 4,5 | 0 |
| 185 | SA | C | 1,5 | 0 |

Produção de Piocianina

Na determinação de produção de piocianina por 81 amostras de *P. aeruginosa*, 47 (57,3%) apresentaram hiperprodução desse exoproduto, 14 (17%) produção

intermediária e 15 (18%) produção normal. Apenas 5 amostras não foram capazes de produzir a piocianina (Figura 4).

Figura 4: Caracterização das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes fibrocísticos quanto à produção de piocianina.



Quando comparamos a população selvagem (n=9) com a subpopulação (n=9), observamos de uma forma geral, um aumento na produção de piocianina (Figura 5). Em alguns casos, esse aumento resultou na mudança da classificação da amostra (Tabela 17).

Figura 5: Diferença na produção de piocianina pelas populações selvagens e subpopulações de amostras de *P. aeruginosa*.

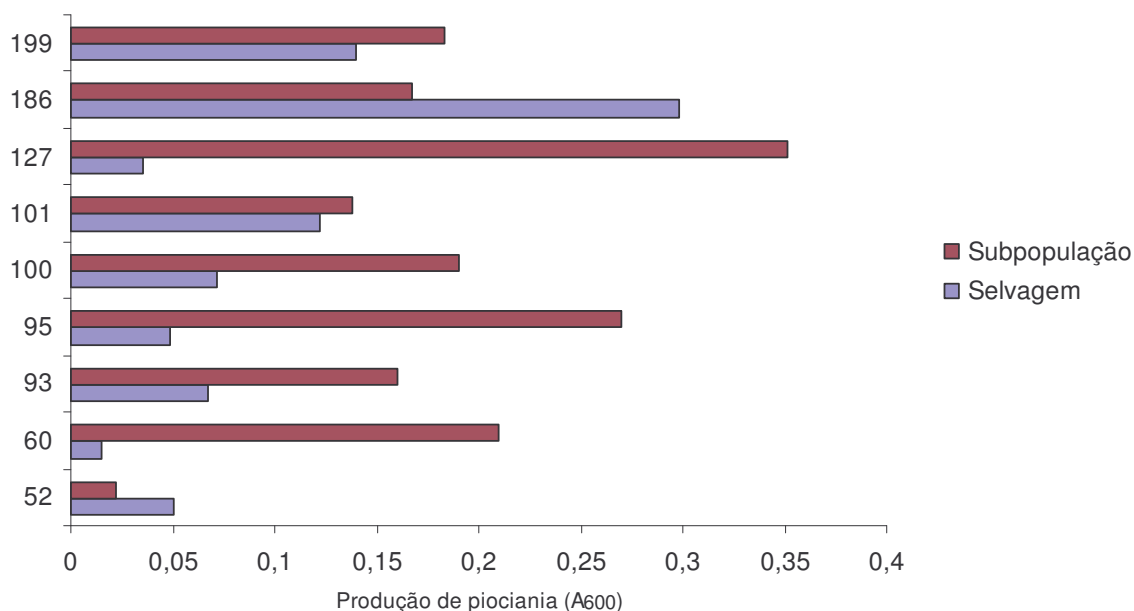


Tabela 17: Diferença na produção de piocianina entre as populações selvagens e subpopulações em amostras de *P. aeruginosa*.

| Amostra | Produção de Piocianina | |
|---------|------------------------|--------------|
| | População selvagem | Subpopulação |
| 52 | negativa | fraca |
| 60 | fraca | forte |
| 93 | intermediária | forte |
| 95 | fraca | forte |
| 100 | intermediária | forte |
| 101 | forte | forte |
| 127 | fraca | forte |
| 186 | forte | forte |
| 199 | forte | forte |

Formação de Biofilme

Todas as amostras testadas (n=81) foram capazes de formar biofilme, sendo 39 amostras (48,1%) classificadas como fracas formadoras de biofilme, 39 (48,1%) apresentaram média e três amostras (3,8%) tiveram forte formação de biofilme.

Quando pesquisada uma possível diferença na formação do biofilme entre as populações selvagens e suas subpopulações, não observamos mudanças na classificação para a maioria das amostras. As exceções foram as amostras 93 e 199 cujas populações selvagens foram fracas formadoras e as subpopulações apresentaram média capacidade de formação de biofilme (Tabela 18).

Tabela 18: Diferença na formação do biofilme nas populações selvagens e subpopulações de amostras de *P. aeruginosa*.

| Amostras | Capacidade de formação de Biofilme | |
|----------|------------------------------------|----------------------------------|
| | Selvagem | Subpopulação |
| | A ₅₉₅ / classificação | A ₅₉₅ / classificação |
| 52 | 0,16 (fraca) | 0,32 (fraca) |
| 60 | 0,297 (média) | 0,239 (média) |
| 93 | 0,159 (fraca) | 0,158 (média) |
| 95 | 0,3 (média) | 0,203 (média) |
| 100 | 0,24 (média) | 0,28 (média) |
| 101 | 0,454 (média) | 0,163 (média) |
| 127 | 0,073 (fraca) | 0,141 (fraca) |
| 186 | 0,198 (fraca) | 0,159 (fraca) |
| 199 | 0,083 (fraca) | 0,303 (média) |

Atividade de Protease LasA

A atividade de LasA foi expressa em porcentagem da absorbância da suspensão de *S. aureus* incubada com os sobrenadantes das culturas das diferentes amostras de *P. aeruginosa* após 60 minutos, em relação às absorbâncias no início da incubação obtida. Obtivemos uma grande variação na atividade de LasA nas 90

amostras estudadas, que variou de nenhuma atividade (0) a 97,8%, com média de 41,15% de atividade. Quando confrontamos os resultados obtidos nas populações selvagens e subpopulações, observamos, de forma geral, uma diminuição na atividade de LasA para a maioria das amostras (Tabela19).

Tabela 19: Atividade de LasA nas populações selvagens e subpopulações em amostras de *P.aeruginosa*.

| Amostras | População selvagem % | Subpopulação % |
|----------|-------------------------|-------------------|
| 52* | 76,1 | 52,3 |
| 60 | 0 | 4,3 |
| 93* | 2,7 | 0 |
| 95* | 6,1 | 2,8 |
| 100 | 70,8 | 55 |
| 101 | 66,7 | 40,4 |
| 127 | 3,5 | 0 |
| 186 | 47,1 | 62,4 |
| 199 | 29,7 | 39,7 |

* Amostras classificadas como hipermutáveis.

DISCUSSÃO

Avanços significativos no tratamento das infecções respiratórias dos pacientes com FC e uma melhoria da prestação de cuidados por equipes multidisciplinares resultou nos últimos anos, em aumento da sobrevivência destes pacientes. Este aumento é devido em grande parte ao desenvolvimento de antimicrobianos eficazes no tratamento da infecção por *P. aeruginosa* (Milagres *et al.*, 2008), tratamento este fundamental para reduzir a lesão pulmonar, especialmente na fase adulta (Kidd *et al.*, 2009).

É recomendado que o monitoramento microbiológico dos pacientes com FC seja realizado, a cada três meses e/ou na vigência de exacerbações do quadro pulmonar (Damas *et al.*, 2009). A diversidade microbiana encontrada nas secreções respiratórias desses pacientes contribui para a dificuldade da caracterização de todos os patógenos e posterior realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Dessa forma, a microbiologia da FC inclui procedimentos diferenciados das rotinas usuais em laboratórios clínicos. Os protocolos devem incluir a adoção de meios não seletivos e seletivos direcionados para os principais patógenos, destacando-se os BGN-NF.

Como as espécies desse grupo de microrganismos são muito similares, é fundamental a sua identificação correta e a exclusão do CBc. Devido a complexidade de testes necessários à precisa identificação, os BGN-NF costumam ser identificados de forma incorreta ou não identificados por métodos fenotípicos, sendo necessária a utilização de técnicas moleculares. Dessa forma é provável que a prevalência desses microrganismos seja subestimada em laboratórios de microbiologia clínica (McMenamin *et al.*, 2000; Wellinghausen *et al.*, 2005).

Um dos fatores agravantes no prognóstico da FC é a emergência de BGN-NF raramente encontrados ou até mesmo não descritos em espécimes clínicos humanos. Nosso grupo descreveu o primeiro caso de isolamento de *Pandoraea* spp (Vieira *et al.*, 2006) e o de *B. pseudomallei* nesses pacientes (Barth *et al.*, 2007). Durante a execução do atual projeto publicamos também o primeiro relato de *P. cineris* (Leão *et al.*, 2009),

uma espécie primariamente ambiental. Embora não saibamos seu papel na doença pulmonar dos pacientes com FC, seu isolamento enfatiza a importância de uma atenção cuidadosa no processamento de espécimes clínicos de pacientes com FC para que microrganismos raros não deixem de ser detectados.

Enquanto o papel desses novos patógenos na doença pulmonar não for esclarecido, acredita-se ser prudente considerar todos os microrganismos Gram negativos como patogênicos. A escolha do antimicrobiano a ser usado contra aqueles microrganismos para os quais os testes de sensibilidade ainda não tiverem sido padronizados deve ser direcionada por dados colhidos na literatura e pela experiência clínica (Elborn 2008).

O perfil de resistência aos antimicrobianos das 179 amostras de *P. aeruginosa* deste estudo foram inferiores a 6%, o que difere de alguns dados internacionais. García *et al.* (2004), ao estudarem 305 amostras de pacientes adultos, encontraram percentuais de resistência superiores a 40% para GEN, AMI, CIP e CPM (cefepima). Para ATM (aztreonam), IMP, PPT (piperacilina-tazobactam) e CAZ as taxas foram semelhantes, com cerca de 20% das amostras resistentes.

Em estudos prospectivos, alguns autores não encontraram aumento significativo nas taxas de resistência de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes pediátricos. Manno *et al.* (2005) avaliaram 1315 amostras isoladas de pacientes acompanhados por 5 anos e observaram que cerca de 80% se mantiveram sensíveis a CAZ, ATM, PPT e IMP. Da mesma forma, Smyth *et al.* (2005) observaram que as taxas de resistência de *P. aeruginosa* isoladas durante 10 anos (1994-2004) não haviam aumentado significativamente para os antimicrobianos testados.

Duas principais hipóteses podem ser levantadas para explicar a maior sensibilidade encontrada na nossa amostragem: a) as estratégias que determinam a

escolha do antibiótico, a posologia, bem como a duração do tratamento; b) ausência de cepas de alta transmissibilidade e com ela a possibilidade da veiculação de resistência a múltiplas drogas.

As metalo- β -lactamases (MBL) têm emergido no mundo inteiro como um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, especialmente entre os BGN-NF, e a sua rápida detecção é fundamental para impedir a disseminação generalizada desse mecanismo de resistência. Entretanto, vários são os testes descritos na literatura que utilizam diferentes substratos, diferentes agentes quelantes e com critérios de leitura, passíveis de subjetividade na interpretação. Picão e colaboradores (2008) publicaram o primeiro artigo que compara diferentes metodologias fenotípicas para caracterização de amostras produtoras de MBL (IMP, SPM, VIM, GIM e IMP). Utilizaram várias espécies bacterianas, diferentes substratos e diferentes agentes quelantes. Os resultados indicaram que a escolha do método para a detecção fenotípica, depende do gênero bacteriano a ser testado, independentemente da enzima produzida por esses isolados.

Em nossa amostragem não foi detectada resistência a IMP e MER. Entretanto, devido ao trabalho publicado por Franklin, Liolios & Peleg (2006) em que foi descrita a utilização de técnica fenotípica para caracterização de cepas sensíveis aos carbapenêmicos, mas portadores de genes MBL, decidimos verificar a possibilidade do encontro desta enzima. Como não existe consenso sobre o melhor método de detecção fenotípica, resolvemos empregar seis diferentes metodologias para caracterização de MBL em nossa amostragem.

Detectamos resultados que variaram de negativo a 88,8% de positividade nos diferentes testes. O teste usando Disco-Combinado proposto por Franklin, Lionios & Peleg (2006) foi o que apresentou a maior sensibilidade. Entretanto, nenhum produto foi amplificado com a utilização da técnica de PCR. Concluímos serem inexistentes as cepas produtoras de MBL para os genes pesquisados, em nossa amostragem.

Vários são os benefícios decorrentes da detecção de cepas hipermutáveis de *P.aeruginosa* em pacientes com FC. Sob o ponto de vista básico, a informação coletada a partir de amplas coleções de isolados sequenciais de origens geográficas distintas certamente será de grande valor para a compreensão do papel de populações hipermutáveis de *P.aeruginosa* nas infecções crônicas bem como em relação a fatores que determinam a sua presença e consequente papel na fisiopatologia da FC.

Já existem recomendações consensuais visando o aperfeiçoamento de testes a serem utilizados em isolados de pacientes com FC, como por exemplo, modificações no tempo de incubação e preparo do inóculo (CLSI, 2009). Apesar disso, os métodos não são capazes de revelar a presença de cepas hipermutáveis.

Maciá *et al.* (2004) sugeriram a implementação de testes de sensibilidade simples que pudessem detectar essas peculiaridades. Tal implementação representaria um passo importante para os laboratórios de microbiologia clínica no complexo campo das infecções pulmonares na FC, com potencial impacto positivo na conduta médica frente aos pacientes, permitindo estabelecer a terapia antimicrobiana adequada para impedir o desenvolvimento de resistência.

Com aplicação da técnica descrita por Maciá *et al.* (2004), 24% (n=49) da nossa amostragem (n=179) foram classificadas como hipermutáveis. Analisando e comparando cepas selvagens e suas subpopulações de HPM, destacamos um aumento estatisticamente significativo da resistência aos antimicrobianos testados, exceto para CIP e TOB, entretanto esses resultados chamam atenção uma vez que, na população selvagem, não havíamos detectado resistência a essas drogas.

Os dados iniciais obtidos corroboravam os descritos na literatura, isto é, a hipermutação é um fator fundamental para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos e, portanto, estes resultados são de consequências importantes para o tratamento de infecções crônicas (Blásquez, 2000; Maciá *et al.*, 2004; Macia *et al.*, 2005; Henrichfreise *et al.*, 2007).

Embora a associação entre resistência e hipermutabilidade, tenha sido fortemente discutido por Maciá e colaboradores (2004), sugerindo que a resistência possa ser usada como um teste para caracterização fenotípica de hipermutabilidade, obtivemos resultados conflitantes quando comparamos com a determinação da frequência de mutação proposta por Oliver *et al.* (2000). Das 43 amostras classificadas como hipermutáveis pelo teste inicial, apenas três apresentaram frequência que pudesse categorizá-las como hipermutáveis, ou seja, frequência de mutação 20 vezes maior que a observada com a cepa PAO1. Entendemos que o teste proposto por Maciá *et al.* (2004) deva ser utilizado como teste de triagem, já que se apresenta com uma técnica exequível na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica.

Devemos considerar, também, que o encontro de populações HPM nesses pacientes pode ser influenciado por outros fatores biológicos e ou clínicos, como a exposição ao antimicrobiano, morfologia colonial, formação de biofilme, propagação de amostras epidêmicas com alta resistência ou, ainda, mudança no genoma bacteriano. Essas características têm sido pouco estudadas. Um estudo recente (Wayne *et al.*, 2008) sugere que a presença de cepas hipermutáveis pode estar associada a fatores relacionados com a gravidade da própria doença, como: idade, função pulmonar, Índice Massa Corporal (IMC), uso de antimicrobiano intravenoso, uso de azitromicina, associação com a presença do fenótipo mucoide e *small variant colony* que são variações morfológicas representativas de adaptações ao processo infeccioso pulmonar. Assim o aumento na taxa de mutação levando a hipermutabilidade pode estar relacionado com determinadas pressões ambientais, incluindo, é claro, os agentes antimicrobianos.

Embora a técnica de PFGE seja considerada padrão-ouro para a tipagem da maioria dos microrganismos, a técnica de RAPD-PCR tem sido de grande aplicabilidade para tipagem de *P. aeruginosa* (Barnini, Dodi & Campa 2004). Em nosso estudo os resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR foram avaliados com objetivos de: a) verificar se na população bacteriana havia um grupo clonal prevalente; b) se os

pacientes mantinham-se colonizados cronicamente pelo mesmo grupo clonal; c) selecionar as amostras para a próxima etapa do trabalho. Quando analisamos a população geral (n=179 amostras), observamos grande variabilidade genética entre as amostras de *P. aeruginosa*, sem a presença de um clone prevalente. No entanto, foram encontrados, em pequena porcentagem, clones idênticos e clones estritamente relacionados nos mesmos pacientes e em diferentes pacientes.

O perfil com maior distribuição entre diferentes pacientes foi o AA, presente em 7 pacientes (9 amostras), seguido do perfil I, em 6 pacientes e dos perfis JJ e Z, ambos presentes 4 pacientes. Estes resultados apontam para a possibilidade de transmissão entre os pacientes ou de aquisição a partir de fonte comum.

Mahenthiralingam *et al.* (1996) realizaram a técnica de RAPD-PCR para estudar 385 *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC. Foram observadas várias situações: alguns pacientes com infecção por dois ou mais clones distintos, pacientes colonizados por um único clone; um único paciente que apresentou colonização por seis clones distintos; dois pacientes que apresentaram colonização por clones idênticos e alguns com colonização por clones estritamente relacionados.

Em estudo realizado no Brasil, onde foram avaliadas geneticamente 97 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de 41 pacientes com FC, foram encontrados 39 padrões genéticos diferentes e dois padrões idênticos em pacientes distintos. Este estudo também descreveu a presença de amostras com 100% de similaridade, no mesmo paciente por um longo período de tempo (17 meses), demonstrando que mesmo com a antibioticoterapia a amostra inicial não foi erradicada. (Silbert *et al.*, 2001).

A maioria dos estudos demonstra a presença de linhagens distintas infectando um mesmo paciente. Sabe-se que pacientes crônicos normalmente abrigam clones únicos. As infecções cruzadas para *P. aeruginosa* para paciente com FC, embora sejam consideradas raras, tem sido relatada de forma contínua na literatura (Denamur *et al.*,

1991; Elaichouni *et al.*, 1994, Cheng *et al.*, 1996; Mahenthiralingam *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2001; Lewia *et al.*, 2005).

Alguns desses clones circulantes, caracteristicamente, mostravam um alto poder de disseminação. Na Europa, a primeira cepa de alta transmissibilidade de *P. aeruginosa* em FC (*Liverpool Epidemic Strain* - LES) foi identificada em Liverpool - Reino Unido, onde superinfectava indivíduos e, eventualmente, substituía suas estirpes originais (Cheng *et al.*, 1996). O segundo clone mais comum no Reino Unido é o Midlands 1, originalmente isolado em Birmingham - UK (Scott & Pitt, 2004).

Uma linhagem multirresistente e transmissível (clone Manchester) também foi identificada em adultos em um centro de tratamento em Manchester – Inglaterra (Jones *et al.*, 2001). Römling e colaboradores (1994) relataram a propagação de um clone epidêmico (clone C), com disseminação por vários países em dois continentes, com maior prevalência no ambiente aquático e com potencial para infectar pacientes com FC com êxito a nível mundial.

Em estudo recente com pacientes da Tasmânia, Bradbury, Champion & Reid (2008), ao utilizarem as técnicas de RAPD-PCR e PFGE em *P. aeruginosa*, identificaram que 9 (26%) destes indivíduos apresentavam cepas idênticas ao padrão de cepa AES III (*Australian Epidemic Strain III*). Estes pacientes sofreram significativamente mais exacerbações e necessitaram de hospitalização durante os dois anos anteriores ao estudo, em comparação com pacientes infectados com cepas exclusivas. As cepas AES III eram mais resistentes aos antimicrobianos, em comparação com as outras.

Devido à presença de clones compartilhados entre diferentes pacientes, detectados pela técnica de RAPD, comparamos esses com clones epidêmicos distribuídos mundialmente pela técnica de PFGE. Iniciamos, então, a segunda fase do estudo. Não foram encontradas relação genética entre as amostras do nosso estudo e os clones C, Liverpool, Manchester e Midlands. A alta diversidade genética entre as cepas do Rio de Janeiro e a não correlação genética com clones epidêmicos

internacionais, pode indicar uma provável aquisição desses microrganismos por fontes ambientais.

Como nosso estudo tem um caráter local, e levando em consideração as dimensões continentais do nosso país, as discrepâncias do nível socioeconômico, e a ausência de dados nacionais, não é possível confirmar a presença ou ausência de clones de *P. aeruginosa* transmissíveis entre portadores de FC no Brasil.

A ocorrência de cepas transmissíveis provoca debates sobre questões do controle de infecção e no manejo destes doentes, permanecendo controverso se pacientes portadores de clones transmissíveis de *P.aeruginosa* devem ser segregados. Dessa forma, são necessários estudos para esclarecer esse aspecto.

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na caracterização da importância de mutações bacterianas em adaptação e, em particular, o papel da hipermutação na patogênese bacteriana. Na FC, o verdadeiro papel de cepas de *P. aeruginosa* hipermutáveis na infecção pulmonar crônica e na resistência aos antimicrobianos tem sido amplamente estudado (Oliver *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2004; Ciofu *et al.*, 2005; Maciá *et al.*, 2004; Maciá *et al.*, 2005).

Curiosamente, das 49 amostras inicialmente classificadas como HPM com a utilização do teste proposto por Maciá e colaboradores, apenas 3 delas (52, 93 e 95) foram positivas no teste proposto por Oliver (2000). As três amostras HPM foram isoladas de dois pacientes pediátricos, sendo as amostras 93 e 95 pertencentes ao mesmo grupo clonal.

Nossos resultados diferem de achados anteriores que demonstram uma elevada percentagem de doentes com FC infectados com cepas hipermutáveis, variando de acordo com as regiões estudadas. Montanari *et al.* (2007) encontraram 60% de cepas HPM entre pacientes alemães, percentual maior que relatado (36,7%) por Oliver e colaboradores (2000), mas semelhantes aos resultados encontrados por Cioffu *et al.* (2005) (54%).

Alguns estudos apontam a existência de relação entre o achado de cepas HPM e o tempo de cronicidade das infecções pulmonares por *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, o grau de deterioração pulmonar. Por outro lado, segundo Kenna *et al.* (2007), talvez a hipótese da existência de associação entre o aparecimento de cepas hipermutáveis e a cronicidade do processo infeccioso não seja verdadeira. Isso, porque, em seu estudo foi demonstrada a presença de cepas hipermutáveis (5% dos isolados) em pacientes nos primeiros estágios de infecção, e embora, em nosso estudo, tenhamos observado positividade apenas em pacientes pediátricos, é precoce qualquer afirmativa relacionando esse achado com o estágio da infecção devido ao pequeno número de cepas.

O baixo percentual de cepas HPM em nosso estudo pode ser devido à alta sensibilidade aos antimicrobianos observadas em nossas cepas e à diversidade dos esquemas terapêuticos usados ao longo do acompanhamento clínico dos pacientes.

A detecção de cepas HPM em nossa amostragem, embora pequena, não invalida nossos achados uma vez que, na prática, eles podem contribuir para a escolha correta do esquema de antibióticos a ser usado em tais casos. Como preconizado, a antibioticoterapia combinada minimiza a seleção de HPM (Burns *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 2004; Maciá *et al.*, 2005).

A hipermutabilidade é um fenômeno em que se observa um aumento aleatório e espontâneo na taxa de mutação, devido, principalmente, a defeitos em genes envolvidos no sistema de reparo do DNA “*mismatch repair*” (MMR). Em *P. aeruginosa* muitos trabalhos corroboram com essa afirmativa (Oliver *et al.*, 2000; Ciofu *et al.*, 2005). O fenótipo HPM tem sido observado repetidamente e em uma alta proporção em isolados de pacientes com FC, em contraste com o que é observado em amostras procedentes de processos agudos (Gutiérrez *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2000), sugerindo que este mecanismo pode desempenhar um papel crucial na patogênese da infecção pulmonar crônica.

Devido a baixa frequência de amostras HPM em nosso estudo, e à facilidade na execução da técnica, decidimos pelo sequenciamento dos genes envolvidos no reparo do DNA das amostras que exibiram alguma frequência de mutação com a metodologia empregada, independente da sua categorização (amostras: 52, 60, 93, 95, 100, 101, 127, 186 e 199).

Todas as amostras HPM apresentaram mutações por substituição no gene *mutS* (Tabela 13). A amostra 52 apresentou mutação no nucleotídeo 2343, que resultou em substituição de aminoácidos. As amostras 93 e 95 exibiram substituição de aminoácido no mesmo ponto (aminoácido 768).

Oliver, Baquero & Blázquez (2002) apontaram a relação dos genes do sistema de reparo do DNA (MMR) (*mutS*, *mutL* e *urvD*) com aumento na frequência de mutação em isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com FC. Em 7 dos 11 mutantes estudados foram encontrados defeitos no MMR (quatro *mutS*, dois *mutL* e um *urvD*). Em quatro casos (três *mutS* e um *mutL*), os genes continham mutação do tipo *frameshift*, isto é, mutações que alteram o modo de leitura devido à inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos. O sequenciamento do gene *mutS* mostrou uma inserção de 3,3 kb após o 10º nucleotídeo e uma deleção de 2 a 8 nucleotídeos na posição 54. Essa deleção foi responsável pela inativação do gene *mutS*. A mutação do gene *urvD* apresentou 3 substituição de aminoácidos.

A mutação pontual observada nas amostras 52 e 60 que resultaram na substituição do aminoácido na posição 781, já havia sido descrita por Hogardt *et al.* (2005). A amostra 60, embora não tenha exibido uma frequência de mutação que pudesse classificá-la em HPM, apresentou dois pontos de mutação *missense*, isto é, mudança no aminoácido devido à alteração no código genético. Uma possível explicação para a não classificação em HPM é a possibilidade da mutação não causar mudança na estrutura 3D da proteína (mutação neutra) e consequentemente não causar alteração funcional da proteína. Essa possibilidade também foi sugerida por Kenna e colaboradores (2007). Em seu trabalho, mutações no gene *mutS* também

foram observadas em amostras com baixa frequência de mutação, levantando questões sobre o que define hipermutabilidade.

Este aspecto foi discutido, em profundidade, por Hall & Henderson-Begg (2006) em uma revisão sobre fenótipo mutante. Embora, inicialmente, em seu estudo objetivasse classificar como HPM cepas com frequência de mutação superior a 20 vezes às detectadas na cepa PAO1, o número de colônias resistentes de PAO1 encontradas no meio com rifampicina foi variável, o que dificulta a comparação entre as diferentes frequências de mutação. Assim, é possível que o número de hipermutantes em nosso estudo possa ter sido subestimado, fato destacado pela cepa 127, considerada não HPM, mas que apresentou uma deleção de 11 nucleotídeos, o que levou a uma interrupção da proteína resultante.

A semelhança do descrito anteriormente por Kenna *et al* (2007), após o alinhamento com os respectivos genes da cepa padrão PAO1, não observamos mutações nos genes *mutM*, *mutT* e *mutY* que pudessem alterar os aminoácidos sintetizados. Entretanto, Oliver (2000), explorando os resultados obtidos por PCR, observou a presença de grandes mudanças genéticas em amostras hipermutantes. Dois isolados de um mesmo paciente, obtidas dentro de um intervalo de 4 anos, tinham um perfil idêntico; 1.5 - kb deleção na região do gene *mutS*. Quatro isolados apresentaram falha para amplificar o gene *mutY*.

Observamos uma alta taxa de mutação no gene que codifica a enzima helicase II, o *urvD*. Mutações nesse gene também já haviam sido relatadas em trabalhos anteriores, embora essas mutações tenham ocorrido em pontos distintos (Oliver, Baquero & Blázquez, 2002; Watson & Robertson, 2006). A mutação nos nucleotídeos responsáveis pelo aminoácido na posição 666, códon PAO1 AAC, foi a mesma observada em todas as amostras, exceto a 186. Foram mutações pontuais, por substituição de nucleotídeos, por transição, isto é, quando a substituição ocorre por nucleotídeos de mesmo tipo de base, no caso de purina para purina (AAC→AGC).

A análise das sequências gênicas das nossas amostras revelou grande heterogeneidade de mutações nos genes responsáveis pela MMR, com maior frequência em *urvD* e *mutS*, e raras mutações em *mutD*. A mutação visivelmente mais significativa ocorreu com o gene *mutS*, observada na amostra 127 (deleção de 11 nucleotídeos). Kenna e colaboradores (2007) já apontaram em seu estudo que as altas frequências de mutação em isolados de pacientes recém colonizados não pode ser explicado por mutação no gene *mutS*.

P. aeruginosa tem uma ampla gama de hospedeiros e uma complexa fisiopatologia das infecções. As razões pelo qual esse microrganismo tem sido um formidável adversário incluem sua intrínseca capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos e a produção de um grande arsenal de fatores de virulência, como: exoprodutos, incluindo elastase, protease alcalina, a LasA, hemolisinas, ramnolipídios e piocianina

Alguns fatores de virulência foram testados nas amostras selecionadas para a segunda fase deste estudo (n= 81). Como poucos são os relatos que descrevem a possível influência da hipermutabilidade em alterações fenotípicas, diferentes da resistência a antimicrobianos, comparamos os resultados obtidos nas populações selvagens e subpopulações.

Em relação ao estudo de exigência nutricional, não observamos isolados auxotróficos na nossa amostragem. Estudos mostram que o auxotrofismo em cepas de *P. aeruginosa* são significativamente associados com exacerbações de infecções respiratórias agudas em pacientes com FC, e estes são frequentemente mais resistentes aos agentes antipseudomonas que cepas prototróficas (Taylor, Hodson & Pitt, 1993; Barth & Pitt, 1999; Agarwal *et al.*, 2005).

Não podemos afirmar categoricamente a ausência de cepas auxotróficas em nossos pacientes, uma vez que não temos dados clínicos indicativos de exacerbações durante o momento da coleta dos espécimes clínicos. Por outro lado, Thomas *et al.*,

(2000) demonstram que *P. aeruginosa* auxotrófica é comumente observada no escarro de pacientes FC. Entretanto, não observaram aumento da frequência de cepas auxotróficas durante os quadros de exacerbação de pacientes FC.

Barth & Pitt (1995) mostraram, em seu estudo, a presença de subpopulações auxotróficas dentro de uma população prototrófica, bem como uma elevada relação clonal entre as duas populações bacterianas demonstrada pela técnica de PFGE. Este estudo mostrou que populações da mesma estirpe de *P. aeruginosa* com diferentes requisitos nutricionais podem coexistir nos pulmões de pacientes FC.

É sabido que a mobilidade bacteriana é exigida tanto para a formação do biofilme (em superfícies bióticas e abióticas) como para patogênese bacteriana (Körber *et al.*, 1994, Simpson *et al.*, 1995). Em nosso estudo, observamos que todas as amostras apresentaram mobilidade do tipo *swimming*. Entretanto algumas amostras foram negativas na pesquisa da mobilidade do tipo *swarming*. Quando comparamos os resultados das populações selvagens e mutantes, não observamos diferenças significativas entre elas.

O fato de não termos encontrado mobilidade do tipo *swarming* em alguns casos deve-se, possivelmente, à própria alteração que ocorre na célula para que essa atividade ocorra. Além de toda alteração celular que se observa, os microrganismos exigem um aumento da produção de certos componentes extracelulares que reduzem o atrito superficial e permitem a migração de um bom grupo de células em superfícies viscosas (Harshey, 2003).

Inoue, Ryuji & Fukui (2008) investigaram os efeitos de ácidos graxos na mobilidade da cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Concluíram que a presença de ácido graxo de cadeia ramificada, em especial o ácido 12-metiltetradecanoico, apresenta pouca ação na atividade flagelar tipo *swimming*, mas é capaz de inibir completamente a mobilidade tipo *swarming*. Além disso, verificaram que a presença de determinados ácidos graxos, foi capaz de reduzir em 30% a capacidade de PAO1 de formar biofilme.

Biofilmes são comunidades bacterianas aderidas a uma superfície e embebidas por uma matriz extracelular polimérica secretada pelos seus componentes. Podem causar problemas significativos em diversas áreas: industrial, sistema de distribuição de água e processamento de alimentos. Na área médica estima-se que os biofilmes estejam envolvidos em 65 a 80% das infecções microbianas (Donlan & Costerton, 2002; Flemming, 2002; Fux *et al.*, 2005; Wagner & Iglewski, 2008).

A formação *in vitro* de biofilme por *P. aeruginosa* foi demonstrada em diversos trabalhos. A maioria desses trabalhos mostrou que 100% das amostras formaram biofilme, embora tenham sido detectadas variações na eficiência de formação (Head & Yu, 2004). Todas as amostras por nós estudadas foram capazes de formar biofilme sendo três delas fortes produtoras. Lee *et al.* (2005) ao estudarem a formação de biofilme em 20 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, encontram diferentes níveis de formação não só entre amostras de pacientes distintos, mas também entre isolados obtidos de um mesmo paciente.

É importante ressaltar que a maioria das metodologias para a análise da formação de biofilme se baseia no uso de cristal violeta, um corante básico que se liga a moléculas de superfície carregadas negativamente e que, portanto afere apenas a biomassa do biofilme, não fornecendo nenhuma informação sobre os componentes da matriz extracelular (Peeters, Nelis & Coenye, 2008).

Não observamos diferenças na formação do biofilme quando comparamos as populações selvagens e subpopulação. Entretanto ressaltamos que só verificamos a frequência de mutação em células planctônicas e não naquelas envolvidas na formação de biofilmes. Em um trabalho recente publicado por Driffield *et al.* (2008), em que foram comparadas as taxas de mutação na população planctônica e no biofilme, foi observado um aumento na taxa de mutação de até 105 vezes na formação do biofilme.

Uma característica central da doença pulmonar na FC é o recrutamento precoce de neutrófilos e sua persistência nas vias aéreas dos pacientes. A morte maciça dos neutrófilos nos pulmões dos pacientes com FC resulta na liberação de DNA, agravando a hiperviscosidade do escarro, bem como liberação de grande quantidade de proteases neutrofílicas que exacerbam a lesão pulmonar (Allen *et al.*, 2005).

Em *P. aeruginosa*, a enzima LasA pode lisar células de *S. aureus* por clivagem da pentaglicina (peptideoglicano). Pode também degradar elastina do tecido conjuntivo pulmonar, contribuindo para a patogênese das infecções por *P. aeruginosa*. Essa atividade proteásica pode ser um meio pelo qual bactérias patogênicas podem tirar partido para promover sua patogênese. Neste contexto, é interessante notar que a *P. aeruginosa* e *S. aureus* são patógenos comumente isolados das secreções respiratórias de pacientes com FC (Usher *et al.*, 2002). Esses microrganismos podem coexistir no ambiente pulmonar e, fica claro, que *P. aeruginosa*, pela atividade de LasA, dentre outros benefícios, leva vantagem sobre as cepas de *S. aureus*.

Observamos que a maioria das amostras apresentou atividade de LasA. Curiosamente, de uma forma geral, observamos uma diminuição dessa atividade nas subpopulações quando comparadas com a população selvagem. Como já é descrito, a presença de cepas HPM ocorre principalmente em pacientes crônicos onde se observa uma deterioração no ambiente pulmonar. Com isso, sugerimos que a diminuição na produção de LasA ocorra por pressão, onde o microrganismo selecionado (subpopulação) não mais necessitaria de LasA como fator de permanência no pulmão, uma vez que esse local já se encontra comprometido.

O escarro de pacientes fibrocísticos normalmente contém quantidades abundantes de toxinas produzidas por *P. aeruginosa*, dentre elas a piocianina. Na amostragem estudada, 93,9% dos isolados foram capazes de produzir piocianina e, para a maioria, foi observada uma hiperprodução desse exoproduto. É sabido que a piocianina tem ação apoptótica, dentre outras atividades tóxicas. À semelhança do que foi por nós encontrado, Fothergill *et al.* (2007) observaram um aumento na produção de

piocianina entre cepas epidêmicas em pacientes FC, sugerindo que esse fenótipo incomum poderia ter um papel importante no sucesso dessas cepas, devido aos efeitos tóxicos que são extremamente relevantes na infecção pulmonar dos pacientes com FC.

Quando comparamos as subpopulações com suas respectivas populações selvagens, observamos um aumento na produção de piocianina para a maioria das subpopulações. Mesmo nos dois casos (186 e 199) em que não observamos esse fenômeno, ressaltamos que a população selvagem já era forte produtora de piocianina. Esses dados sugerem que a produção de piocianina possa ter um papel muito importante na patogênese bacteriana, devido aos efeitos tóxicos promovidos pelo exoproducto. Dwight *et al.* (2005) demonstraram, em seu estudo, que a piocianina leva ao aumento da secreção de interleucina 8 e da expressão de ICAM-1 em células do epitélio respiratório, o que reforça nossa hipótese que células mutantes teriam uma vantagem no ambiente pulmonar de pacientes, principalmente pela produção de piocianina.

Como mencionado por Smania e colaboradores (2004), variantes que tiveram alterações em *mutS* apresentaram diferenças fenotípicas significativas, como o aumento da produção de pigmentos, aumento na produção de ramnolipídios, alteração da motilidade e redução na atividade de protease LasB. Estas observações suportam a ideia de que alterações no sistema de reparo podem resultar em mutações importantes em genes que determinam características de virulência bacteriana.

Apesar dos inquestionáveis avanços no conhecimento da FC, com conseqüente aumento da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes, muitas questões relacionadas à microbiologia permanecem sem resposta. Poucos são os estudos realizados no Brasil e muitas vezes os protocolos adotados no manejo dos pacientes são internacionais. Várias questões podem ser levantadas: será que podemos nos basear nos dados internacionais? Será que as características dos microrganismos isolados em nossos pacientes são semelhantes às dos microrganismos isolados em outros países? Será que as cepas brasileiras são idênticas nas diferentes regiões do Brasil? Assim, estudos

científicos nas mais variadas áreas da microbiologia devem ser encorajados em nosso país, para que possamos agregar conhecimentos que, por mais singelos que possam parecer, trarão benefícios enormes aos pacientes e a comunidade científica nacional.

REFERÊNCIAS

Adal KA, Farr BM. Central venous catheter-related infections: a review. *Nutrition*. 1996; 12:208-13.

Adodi A, Sciacca A, Campanile F, Messina C, Barchitta M, Sciacca S, Stefani S. *New Microbiol*. 2000; 23:319-27.

Agarwal G, Kapil A, Kabra DK, Das BK, Dwivedi SN. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in India. *BMC Microbiol*. 2005; 21:5-43.

Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MKJ. *Immunol*. 2005; 174:3643-49.

Arakawa Y, Shibata K, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, *et al*. Convenient test for screening metallo- β -lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38:40-3.

Archibald LK, Gaynes RP. Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. *Nosocom Infect*. 1997; 11:245–55.

Armstrong DS, Nixon GM, Carzino R, Bigham A, Carlin JB, Robins-Browne RM, Grimwood K. Detection of widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166:983-7.

Atkinson RM, Lipuma JJ, Rosenbluth DB, Dunne WMJr. Chronic colonization with *Pandora* *apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR. J Clin Microbiol. 2006; 44:833-6.

August MJ, Hindler JA, Huber TW, Sewel DL. Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology. Coord. Ed. A.S. Wessfeld. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1990.

Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β lactamases and alginate production. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:1175-87.

Barnini S, Dodi C, Campa M. Enhanced resolution of random amplified polymorphic DNA genotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. Lett Appl Microbiol. 2004; 39:274-7.

Barth AL, Pitt TL. Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1995; 33:37-40.

Barth AL, Pitt TL. The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 1996; 45:110-119.

Barth AL, Silva FAA, Hoffmann A, Vieira MI, Zavaski AP, Ferreira AG, *et al.* Cystic fibrosis patient with *Burkholderia pseudomallei* infection acquired in Brazil. J Clin Microbiol. 2007; 45:4077-80.

Belkum AV, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. Clin Microbiol Rev. 2001; 6:547-60.

Beringer PM, Appleman MD. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiology and clinical features. *Curr Op Pulm MEd*. 2000; 6:545-50.

Bjarnsholt T, Jenses PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Høiby N. *Pediatr Pulmonol*. 2009; 44: 547-58.

Bieber D, Ramer SW, Wu CY, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, Schoolnik GT. *Science*. 1998; 280:2114-18.

Blásquez J. Hypermutaciones a factor contribuyendo to the acquisition of antimicrobial resistance. *Antimicrob Resist*. 2003; 37:1201-09.

Boukadida J, De Montalembert M, Lenoir G, Scheinmann P, Véron M, Berche P. Molecular epidemiology of chronic pulmonary colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol*. 1993; 38:29-33.

Bradbury R, Champion, Reid DW. Poor clinical outcomes associated with a multi-drug resistant clonal strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the Tasmanian cystic fibrosis population. *Respirology*. 2008; 78:21-8.

Bregeon D, Matic I, Radman M, Taddei F. Inefficient mismatch repair: genetic defects and down regulation. *J Genet*. 1999; 78:21-28.

Burns JL, Saiman L. *Burkholderia cepacia* infections in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis*. 1999; 18:155-6.

Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, *et al*. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 2001; 183: 444–52.

Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, *et al.* Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1818-22.

Bush K. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1995; 39:1211-33.

Bush K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:1085-9.

Butler SL, Doherty CJ, Hughers JE, Nelson JW, Govan JRW. *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard? *J Clin Microbiol.* 1995; 33:1001-4.

Caporale LH. Natural selection and the emergence of a mutation phenotype: an update of the evolutionary synthesis considering mechanisms that affect genome variation. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57:467-85.

Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Teixeira LM, Marques E de A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist.* 2006; 12:103-8.

Carvalho GM, Carvalho AP, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, *et al.* Transient isolation of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* from a Brazilian cystic fibrosis patient chronically colonized with *Burkholderia vietnamiensis*. *J Cyst Fibros.* 2005; 4:267-70.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt JF, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2004; 48:4654-61.

Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, van Saene H, Hart CA. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet*. 1996; 348:639-42.

Chopra I, O'Neill AJO, Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat*. 2003; 3:137-45.

Christensen BB, Sternberg C, Andersen JB, Palmer RJ, Nielsen AT, Givskow M. *et al*. Molecular tools study of biofilm physiology. *Methods Enzymol*. 1999; 310:20-42.

Chiron R, Marchandin H, Counil F, Jumas-Bilak E, Freydière AM, Bellon G, *et al*. Clinical and microbiological features of *Inquilinus* sp. Isolates from five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:3938-43.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement (*M100-S17*). 2006.

Coenye T, Gillis M, Vandamme P. *Pseudomonas antimicrobica* Attafuaah and Bradbury 1990 is a junior synonym of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi. 1993. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000; 6:2135-39

Comer JE, Marshall MA, Blanch VJ, Deal CD, Castric P. Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycosylation site. *Infect Immun*. 2002; 70:2837-45.

[Cornaglia G](#), [Mazzariol A](#), [Lauretti L](#), [Rossolini GM](#), [Fontana R](#) . Hospital Outbreak of Carbapenem - Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1 a Novel Transfrable Metallo- β -lactamase. Clin Infec Dis. 2000; 31:1119-1125.

Damas C, Amorim A, Gomes I. Cystic Fibrosis: Review. Rev Port Pneumol. 2009; 1:89-112.

Davies J, Stern M, Dewar A. CFTR gene transfer reduces the binding of *Pseudomonas aeruginosa* to cystic fibrosis respiratory epithelial cells. Am J Res Cell Mol Biol. 1997; 16:657-66.

Davies JC, Rubin BK. Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis. Semin Respir Care Med. 2007; 28:312-21.

Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Clin. Epidemiol. 1995; 48: 1041–49.

Denamur E, Picard B, Gouillet P, Bingen E, Lambert N, Elion J. Complexity of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: combined results from esterase electrophoresis and rDNA restriction fragment length polymorphism analysis. Epidemiol Infect. 1991; 106:531-9.

Denning GM, Lyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE. Phenazin-I-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway cells. Am Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003; 285:584-92.

Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM, Littlewood JM. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. J Clin Microbiol. 1998; 36:1953-8.

Déziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. J Bacteriol. 2001; 183:1195-204.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15:167-93.

Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Microbes. Infection. 2003; 5:1213-9.

Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature 2002; 416:740-743.

[Dubois V](#), [Arpin C](#), [Melon M](#), [Melon B](#), [Andre C](#), [Frigo CC](#), [Quentin C](#). Nosocomial Outbreak Due to a Multiresistant Strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: Efficacy of Cefepime-Amikacin Therapy and Analyses of β -lactam Resistance. J Clin Microbiol. 2001; 39:2072-8.

Dunne WMJr, Maisch S. Epidemiological investigation of infection due to *Alcaligenes* species in children and patients with cystic fibrosis: use of repetitive-element-sequence polymerase chain reaction. Clin Infect Dis. 1995; 20:836-41.

Elachouni A, Verschraegen G, Claeys G, Devleeschuwer M, Godard C, Vaneechoutte M. *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. J Clin Microbiol. 1994; 32:666-71.

Elborn JS. Identification and management of unusual pathogens in cystic fibrosis. J R Soc Med. 2008;101:Suppl1:S2-5.

Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5783-92.

Flemming HC. Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 59:629-40.

Forbes BA, Granato PA. Processing specimens for bacteria. In: Murray PR; Baron EJ; Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds) Manual of Microbiology 6th, ed. Washinton DC. ASM, Press,1995,509-19.

Fothergill JL, Panagea S, Hart CA, Walshaw MJ, Pitt TL, Winstanley C. Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. BMC Microbiol. 2007; 7:45-46.

Foweraker JE, Laughton CK, Brown DF, Bilton D. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. J Antimicrob Chemother. 2005; 55:921-7.

Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2006; 44:3139-44.

Fraser GM, Hughes C. Swarming motility. Curr Opin Microbiol. 1999; 2:630-5.

Flux CA, Stroodley P, Hall L, Costerton W. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. Expert Rev Anti Infect Ther. 2005; 1:667-83.

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

Garcia AD, Ibarra A, Rodrigues FC, Casal M. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from patients with cystic fibrosis. Rev Esp Quimioter. 2004; 17:332-5.

Goldman DA, Klinger JD. *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. J Pediatr. 1986; 108:806-12.

Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell. 1997; 88:553-60.

Govan JRW, Brow PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, *et al.* Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. Lancet. 1993; 342:15-9.

Grande, K. K., Gustin, J.K., Kessler, E. and Ohman, D. E. Identification of critical residues in the propeptide of LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* involved in formation of a stable mature protease. J. Bacteriol. 2007; 189:3960-68.

Gutiérrez O, Juan C, Pérez L, Oliver A. Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients. Antimicrob Agent Chemother. 2004; 48:3573-5.

Hall LMC, Henderson-Begg, SK. Hypermutable bacteria isolated from humans – critical analysis. Microbiol. 2006; 152:2505-14.

Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*; mechanisms and impact on treatment. Drug Res Updates. 2000; 3:247-55.

Harshey, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003; 57:249-273.

Hauber S. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Env Microbiol.* 2004; 6:546-51.

Head NE, Yu H. Cross sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Biofilm formation, virulence and genome diversity. *Infection Immunity.* 2004; 72:133-44.

Heijerman H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: A short review. *J Cystic Fibrosis.* 2005; 4: 3-5.

Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:4062-70.

Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek Mr. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol.* 2001; 183:5395-401.

Herman GE, Modrich P. *Escherichia coli* K12 clones that overproduce dam methylase are hypermutable. *J Bacteriol.* 1981; 45:644-6.

Hotgardt M, Hoboth C, Schmoldt S, Henke C, Bader L, Heesemann J. Stage-specific adaptation on hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2007; 195:70-80.

Hotgardt M, Schubert S, Adler K, Gotzfried M, Heeseman J. *Int. J Med Microbiol.* 2005; 296:313-20.

Inoue T, Shingaki R, Fukui K. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. FEMS Microbiol Lett. 2008; 281:81-6.

Jalat S, Ciofu O, Hoiby N, Gato N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:710-2.

Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thøgersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagenen JA, Høiby N, Molin S. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. Infect Immun. 2007; 75:2214-24.

Jensen ET, Giwecman B, Ojenyi B, Bangsberg JM, Hansen A, Koch C, Fiehn NE, Høiby N. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment. J Hosp Infect. 1997; 36:117-22.

Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Weeb AK. Spread of mutirresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. Lancet. 2001; 358:557-8.

Kanthakumar, K., Taylor, G., Tsang, K. W., Cundell, D. R., Smith, S., Jeffery, P. K., Cole, P. J. and Wilson, R. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro. Infect. Immun. 1993; 61:2848-53.

Kenna DT, Doherty CJ, Fawcaker J, Mascaskill L, Barcus VA, Govan JRW. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. Microbiol 2007; 153:1852-9.

Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. J Biol Chem. 1993; 268:7503-8.

- Kernen Y, Sauty A, Roulet M. Detection and management of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. Rev Med Suisse. 2005; 1:637-40.
- Kessler E, Safrin M, Abrams WR, Rosenbloom J, Ohman OJ. Biol Chem. 1997; 272:9884-9.
- Khadori N, Elting L, Wong E, Schable B, Bodey GP. Nosocomial infections due to *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) in patients with cancer. Rev Infect Dis 1990; 12:997-1003.
- Kidd TJ, Ramsay KA, Hu H, Bye PT, Elkins MR, Grimwood K, et al. Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2009; 47:1503-9.
- Kim W, Killam T, Sood V, Surette MG. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. J Bacteriol. 2003; 185:3111-7.
- King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med. 1954; 44:301-7.
- Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Manual of Clinical Microbiology (Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.C., Tenover, M.A. Eds.), 2001. Vol. 1, pp. 517-525. ASM Press, Washington, D.C, USA.
- Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Epp SF, Pechere JC. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43:424-7.

Korber DR, James GA, Costerton HW. Evaluation of fleroxacin activity against established *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Appl Environ Microbiol. 1994; 60:1663-9.

Laffleur K, Janssens M, Charlier J. Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting Gram-negative rods. J Clin Microbiol. 2002; 40:1085-7.

Lahue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correlation in a defined system. Science. 1989; 245:160-4.

Leão RS, Pereira RHV, Ferreira AG, Lima AN, Albano RM, Marques EA. First report of *Paenibacillus cineris* from a patient with cystic fibrosis. Diag Microbiol Infect Dis. 2009 (accepted for publication)

Lee B, Haagensen JAJ, Ciofu O, Anderson JB, Hoiby N, Molin S. Heterogeneity of biofilm formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005; 43:5247-55.

Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and Imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2003; 41:4623-9.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1, in class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:4485-91.

Lewin LO, Byard PJ, Davis B. Effect of *Pseudomonas cepacia* colonization on survival and pulmonary function of cystic fibrosis patients. J Clin Epidemiol 1990; 43:125-31.

Lewis DA, Jones A, Parkhill J, Speert DP, Govan JR, Lipuma JJ, Lory S, Webb AK, Mahenthiranlingam E. Identification of DNA markers for a transmissible *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strain. *Am J Respir.* 2005; 33:56-64.

Lyczak BJ, Cannon LC, Pier BG. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol. Rev.* 2002; 15:194-222.

Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36:2046-8.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 634-40.

Li Puma JJ, Osen JE, Dasen SE, Edlind D, Schidlow DV, Burns JL, Stull TL. Ribotype analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centers. *J Pediatr.* 1998; 113: 859-62.

Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25 :11-25.

Li XZ, Barre N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-OprM Multidrug Efflux System on Expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN Multidrug Efflux Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46:885-93.

Look DC, Stoll LL, Romig SA, Humlicek A, Britigan BE, Denning GM. *J Immunol.* 2005; 22:4017-23.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis.* 2002; 15:194-222.

Maciá MD, Borrell N, Perez JL, Oliver A. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the *Etest* and disk diffusion. *Antimicrobial Agent Chemoth.* 2004; 48:2665-72.

Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrobial Agent Chemoth.* 2005; 49: 3382-6.

Maciá MD, Mena A, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Increased susceptibility to colistin in hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains from chronic respiratory infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:4531-2.

Mahenthalingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun.* 1994; 62:596–605.

Mahenthalingam E, Campbell ME, Foster J, Joseph SL, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:1129-35.

Mahenthalingam E, Vandamme P. Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. *Chron Respir Dis.* 2005; 2:209-17.

Mandsberg LF, Ciofu O, Kirkby N, Christiansen LE, Poulsen HE, Hoiby N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:2483-91.

Manno G, Cruciani M, Romano L, Scapolan S, Mentasti M, Lorini R, Minicucci L. Antimicrobial use and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 25: 193-7.

Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:1129-35.

Marshall WF, Keating MR, Anhalt JP, Stechelberg JM. *Xanthomonas maltophilia*: an emerging nosocomial pathogen. *Mayo Clin Proc*. 1989; 64:1097-1104.

Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JRW, Holloway BW, Deretic V. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90:8377-81.

Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agent Chemother*. 2000; 6:1771-77.

Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. Outer Membrane Proteins Responsible for Multiple Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39:645-49.

Matson SW, Robertson AB. The *UrvD* helicase and its modulation by the mismatch repair protein MutL. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34:4089-97.

May TB, Shinabargar D, Mahara JR. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* : a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev*. 1991; 4:191-206.

McCallum SJ, Corkill J, Gallagher M, Ledson MJ, Hart CA, Walshaw MJ. Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonized by *P. aeruginosa*. *Lancet*. 2001; 358:558-60.

McMenamin JD, Zacccone TM, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Misidentification of *Brudholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1,051 recent sputum isolates. *Chest*. 2000; 117:1661-5.

Merino S, Shaw JG, Tomás JM. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 263:127-35.

Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi, R, Lee, *et al*. Simple microdilution test for detection of metallo- β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:4388-90.

Milagres L, Garcia D, Castro T, Tavares K, Leão RS, Folescu T, Higa L, Marques EA. Infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística: diagnóstico sorológico e conduta. *Pediatrics (USP)*. 2008; 30:56-65.

Miralles IS, Maciel Mdo C, Ângelo MR, Gondini MM, Frota LH, dos Reis CM, Hofer E. *Burkholderia pseudomallei*: a case report of a human infection in Ceará, Brazil. *Ver Inst MEd Trop São Paulo*. 2004; 46:51-4.

Montanari S, Oliver A, Salerno P, Mena A, Bertoni G, Tummler B, Cariani L, Conese M, Doring G, Bragonzi A. Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strain from patients with cystic fibrosis. *Microbiology*. 2007; 153:1445-54.

Moskowitz SM, Fostes JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:1915-22.

Moskowitz SM, Fostes JM, Emerson J, Gibson RL, Burns JL. Use of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. J Antimicrob Chemother. 2005; 56:879-86.

Moss R B. Cystic fibrosis: pathogenesis, pulmonary infection and treatment. Clin Infect Dis. 1995; 21:839-51.

Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47:582-7.

Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol. 1990; 28:2059-63.

Normark HB, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. J Internal Medicine 2002; 252:91-106.

Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science. 2000; 288:1251-3.

Oliver, A., Baquero, F. and Blázquez, J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. Molecular Microbiol. 2002; 43:1641-1650.

Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blázquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infection. Antimicrobial Agent Chemoth. 2004; 48:4226-33.

O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 1998; 30:295-304.

O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:49-79.

Pacheco ABF, Soares KCC, Almeida DF, Viboud GI, Binsztein N, Ferreira LCS. Clonal nature of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O6: H16 revealed by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:2099-102.

Panagea S, Winstanley C, Walshaw ML, Ledson MJ, Hart CA. Environmental contamination with an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* in a Liverpool cystic fibrosis centre, and study of its survival on dry surfaces. *J Hosp Infect.* 2005; 59:102-7.

Parad RB, Gerard CJ, Zurakowski D, Nichols DP, Pier GB. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect Immun.* 1999; 67:4744-50.

Pedersen SS, Hoiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax.* 1992; 47:6-13.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* 2008; 72:157-65.

Pegues DA. *Burkholderia cepacia* in; *Antimicrobial Therapy and Vaccines.* Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1999; 2:89-93.

Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho Md Mda G, Aranha Nouér S, Pinto De Oliveira M, Mello Sampaio JM, D'Avilla Freitas A, Ferreira AL, Amorim Ed Ede L, Riley LW, Moreira BM. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2005; 40:2420-4.

Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- β -lactamase detection: Comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:2028-37.

Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Goldberg JB. How mutant CFTR may contribute to *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154:175-182.

Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6:84-5.

Pontes HER, Aguiar MCF, Mesquita RA, Pontes FSC, Jr Silveira JB. Imunoexpressão da proteína de reparo hMSH2 em queilite actínica e mucosa labial normal. *Rev Bras Canc.* 2005; 51:23-30.

Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T, *et al.* Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros.* 2008; 7:15-22.

Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrobiol Agents Chemother.* 1997; 41:223-32.

Ratjen F & Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2003; 22:681-689.

Ratjen F, Doring G, Nikolaizik W. Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonization in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 2001; 22:983-4.

Renders N, Miling U, Verbrugh H, Van Belkum A. Comparative Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:3190-5.

Renders N, Verbrugh EH, Belkum AV. Dynamics of bacterial colonization in respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Infect Genet Evol Elsevier*. 2001; 1: 29-39.

Riodan JR, Rommmsens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989; 245:1066-73.

Römling U, Fiedler B, Bosshammer J, Grothues D, von der Hardt H, Tümmler B. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1994; 170:1616-21.

Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microb*. 2007; 10:644-8.

Sader HS, Huynh HK, Jones RN. Contemporary in vitro synergy rates for aztreonam combined with newer fluoroquinolones and beta-lactams tested against gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47:547-50.

Saiman L, Chen Y, Tabibi S, Gabriel PS, Zhou J, Liu Z, Lai L, Whittier S. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3942-45.

Saiman L, Garber E. Infection control in cystic fibrosis: barriers to implementation and ideas for improvement. *Curr Opin Pulm Med*. 2009. (accepted for publication).

Saiman L, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest*. 1993; 92: 1875–80.

Saiman L, Siegel J. The Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. *Suppl. Am J Infect Control* 2003; 31:S1-62.

Smania AM, Segura I, Pezza RJ, Becerra C, Albesa I, Argarana CE. Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2004; 150:1327-38.

Salunkhe P, Smart CHM, Morgan JAW, Panagea S, Walshaw MJ, Hart CA, *et al.* A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. *J Bacteriol*. 2005; 187:4908-20.

Santos GP, Domingos MT & Witting EO. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. *J Pediatr. (Rio J)*. 2005; 81:240-4.

Santos F^o L, Santos IB, Assis AML, Xavier DE, Menezes LC. Tipagem molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo β lactamases isoladas em João Pessoa /PB. *Rev. Bras Anal Clin*. 2003; 35:127-31.

Scott FF, Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol*. 2004; 53:609-15.

Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanebe N, Okazaki M, Myoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 4194-7.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2099-13.

Seno Y, Kariyama R, Mitsuhata R, Monden K, Kumon H. Clinical implication of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Act Med Okayama*. 2005; 59:79-87.

Sener B, Koseoglu O, Ozcelik U, Kocagoz T, Gunalp A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol.* 2001; 291: 387–93.

Sermet-Gaudelus I, Castanet M, Restsch-Bogart G, Aris RM. Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. 2009; 10:134-42.

Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, *et al.* PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:5407-13.

Silbert S, Barth AL, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3976-81.

Smania AM, Segura I, Pezza RJ, Becerra C, Albesa I, Argaraña CE. Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2004; 150:1327-38.

Smith AL, Fiel SB, Mayer-Hamblett N, Ramsey B, Burns JL. Lack of association between in vitro antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parental antibiotic administration in cystic fibrosis. *Chest.* 2003; 123:1495-1502.

Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio A *et al.* Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *PNAS.* 2006; 103:8487-92.

Smyth E, David TJ, Patel L, Ashcroft P, Sanyal D, Vyas J. Prevalence of resistant *Pseudomonas aeruginosa* with elective and rescue intravenous antibiotic regimens in children with cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 26:95-6.

Sniegowski PD, Gerrish PJ, Lenski RE. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature*. 1997; 387:703-5.

Spangenberg C, Fislage R, Sierralta W, Tummler B, Romling U. Comparison of type IV-pilin genes of *Pseudomonas aeruginosa* of various habitats has uncovered a novel unusual sequence. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 125:265-73.

Speert DP, Campbell ME. Hospital epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Hosp Infect*. 1987; 9:11–21.

Strait C, Bulamarque NAC, Abreu e Silva F, Giugliani R, Saraiva PML. CFTR gene: molecular analysis in patients from the South Brazil. *Mol Gen Metabol*. 2003; 78:259-64.

Struelens MJ, Schwan V, Deplano A, Baran D. Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas* strains infecting cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2320-6.

Struelens MJ. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93:581-5.

Taddei F, Radman M, Maynard-Smith J, Toupance B, Gouyon PH, Godelle B. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature*. 1997; 387:700-2.

Tagle MS. Epidemiología de la fibrosis quística del pancreas en Chile. Revisión de 60 pacientes. *Rev. Pediatr. (Santiago)*. 1988; 31:212-7.

Taylor RF, Hodson ME, Pitt TL. Adult cystic fibrosis: association of acute pulmonary exacerbations and increasing severity of lung disease with auxotrophic mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax*. 1993; 48:1002-5.

Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AI, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun*. 1999; 67:2371-6.

Thomas SR, Ray A, Hodson ME, Pitt TL. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy lung disease. *Thorax*. 2000; 55:795-7.

Thomassen MJ, Denko CA, Doershuk CF, Stern RC, Klinger J. D. *Pseudomonas cepacia*: decrease in colonization in patients with cystic fibrosis, *Ann Rev Resp Dis* 1986; 134: 669-71.

Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, AlNassafi K, *et al*. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:1697-1704.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN *et al*. Molecular characterization of SPM-1 a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobiol surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50:673-9.

Tramper-Sanders GA, Van der Ent CK, Wolfs TFW. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J. Cystic Fibrosis* 2005; 237: 1-7.

Usher LR, Lawson RA, Geary I, Taylor CJ, Bingle CD, Taylor GW, *et al*. Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: A potential mechanism of persistent infection. *J Immunol*. 2002; 168:1861-8.

Van Daele S, Verhelst R, Claeys G, Verschraegen G, Franckx H, Van Simaey L, de Ganck C, De Baets, Vaneechoutte M. Shared genotypes of *Achromobacter xylosoxidans* strains isolates from patients at a cystic fibrosis rehabilitation center. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:2998-3002.

Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, *et al.* Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. Nov. and *Burkholderia lata* sp. Nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009; 59:102-11.

Vieira MI, Alves DM, Willers DMC, Andrade EF, Hoffmann A, Scattolin I, Leão RS, Ferreira AG, Albano RM, Marques EA, Barth AL. Isolamento de *Pandoraea* spp em pacientes com fibrose cística no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). In: I Congresso Brasileiro de Fibrose Cística. J Bras Pediatría. 2006; 32:57.

Vinon-Dubiel AD, Spilker T, Dean CR, Monteil H, Lipuma JJ, Goldberg JB. Correlation of *wbiI* genotype, serotype, and isolate source within species of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4121-26.

Waine DJ, Honeybourne D, Smith G, Whitehouse JL, Dowson CG. Association between hypermutator phenotype, clinical variables, mucoid phenotype and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2008; 46:3491-3.

Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. Clin Rev Allergy Immunol. 2008; 35:124-31.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann T. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005; 18:306-25.

Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol Microbiol. 1999; 34:586–95.

Wellinghausen N, Kothe J, Wirths B, Sigge A, Poppert S. Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including

morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005; 43:4070-5.

Wiegand I, Marr AK, Breidenstein EB, Schurek KN, Taylor P, Hancock RE. Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:3810-3.

Woods DE, Strauss DC, Johanson WG, Berry VK, Bass JA. Role of pili in adherence to buccal epithelial cells. Infect Immun. 1980; 29:1146-51.

Yagci A, Yagci A, Sener B, Suziki Y, Ahmed K. S. Sulfatide mediates attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to human pharyngeal epithelial cells. New Microbiol. 2007; 30:167-71.

Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{IMP-8} in a university medical center in Taiwan. J Clin Microbiol. 2001; 39:4433-9.

Yong DK, Lee JH, Shin HB, Rosoolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2002; 40:3798-801.

Anexo A: Alinhamento da seqüência de nucleotídeo do gene *mutS* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1

```

100           10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutS   ATGACCGACCTCTCCCAGCACACGCCGATGATGCAGCAGTACTTCAAACCTGAAGCATCAGCACCCCGACCAATTGATGTTCTATCGCATGGGCGACTTCT
52M mutS    .....A.....
52 mutS     .....A.....
60M mutS    .....A.....
60 mutS     .....A.....
93M mutS    .....
93 mutS     .....
95M mutS    .....
95 mutS     .....
100M mutS   .....
100 mutS    .....
101M mutS   .....
101 mutS    .....
127M mutS   .....
127 mutS    .....
186M mutS   .....
186 mutS    .....
199M mutS   .....
199 mutS    .....

200           110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutS   ACGAGCTGTTCTACGAGGACGCGAAGAAGGCCCAAACTGCTCGACATCACCCCTGACCGCACGGCCAGTCCGGCGGCAAGGCGATCCCATGGCAGG
52M mutS    .....G.....G.....
52 mutS     .....G.....G.....
60M mutS    .....G.....G.....
60 mutS     .....G.....G.....
93M mutS    .....
93 mutS     .....
95M mutS    .....
95 mutS     .....
100M mutS   .....
100 mutS    .....
101M mutS   .....
101 mutS    .....
127M mutS   .....G.....G..GC.G..AGG..ATCC.G.T.GC.GG.ATTCCCTTCC
127 mutS    .....G.....G..GC.G..AGG..ATCC.G.T.GC.GG.ATTCCCTTCC
186M mutS   .....
186 mutS    .....
199M mutS   .....G.....G.....
199 mutS    .....G.....G.....

300           210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1 mutS   CATTCCCTTCCATTTCGGCGGAGGGCTACCTGGCCAAGCTGGTCAAGCTCGGCGAGTCGGTGGCGATCTGCGAGCAGATCGGCGACCCGGCCACCAGCAAG
52M mutS    .....
52 mutS     .....
60M mutS    .....
60 mutS     .....
93M mutS    .....C.....T.....
93 mutS     .....C.....T.....
95M mutS    .....C.....T.....
95 mutS     .....C.....T.....
100M mutS   .....C.....A.....
100 mutS    .....C.....A.....
101M mutS   .....C.....A.....
101 mutS    .....C.....A.....
127M mutS   AT.CGG.GGAGGGCTAC.T.GCCAAGCTGGTCAAGCT.G.CGAGTCGGT.....TCT.CGA..AGATC.GCGA.CCGG.CA.C.G.AA.GGG..G.TGGA
127 mutS    AT.CGG.GGAGGGCTAC.T.GCCAAGCTGGTCAAGCT.G.CGAGTCGGT.....TCT.CGA..AGATC.GCGA.CCGG.CA.C.G.AA.GGG..G.TGGA
186M mutS   .....C.....T.....
186 mutS    .....C.....T.....
199M mutS   .....
199 mutS    .....

```

```

400          310      320      330      340      350      360      370      380      390
PAO1 mutS   GGGCCGGTGGAGCGCCAGGTGGTGC GGATCATCACCCCGGCACGGTGAGCGACGAGGCGCTGCTCGACGAAACCCGCGACAACCTGCTGGCGGCGATCC
52M mutS   .....
52 mutS     .....
60M mutS   .....
60 mutS     .....
93M mutS   .....
93 mutS     .....
95M mutS   .....
95 mutS     .....
100M mutS  .....
100 mutS    .....
101M mutS  .....
101 mutS    .....
127M mutS  .C...A.GT.GTGCGG.TCATCAC.CCCGGCA.GGTGAGC.ACGA.GCGCT.CTCGACGAAAC..CGCGAC...CTGCT.G.GG.GAT.CTCG.CGACGAG
127 mutS   .C...A.GT.GTGCGG.TCATCAC.CCCGGCA.GGTGAGC.ACGA.GCGCT.CTCGACGAAAC..CGCGAC...CTGCT.G.GG.GAT.CTCG.CGACGAG
186M mutS  .....
186 mutS   .....
199M mutS  .....
199 mutS   .....

500          410      420      430      440      450      460      470      480      490
PAO1 mutS   TCGGCGACGAGCGCCTGTTTCGGCCTCGCCGTGCTGGACATCACACGCGCCGCTTCAGCGTCCAGGAGATAAAAAGGCTGGGAAACCTGCTGGCCGAAC
52M mutS   .....
52 mutS     .....
60M mutS   .....
60 mutS     .....
93M mutS   .....
93 mutS     .....
95M mutS   .....
95 mutS     .....
100M mutS  .....
100 mutS    .....
101M mutS  .....
101 mutS    .....
127M mutS  CGCCT.TTCG..CT.GCCGT.CTGGACATCAC.A.CGGCCGCTTCAGC.T.CAGGAGATAAAAAG.CT.GG...CCCTGCT.GCCGAACTGGA..GCCT.A
127 mutS   CGCCT.TTCG..CT.GCCGT.CTGGACATCAC.A.CGGCCGCTTCAGC.T.CAGGAGATAAAAAG.CT.GG...CCCTGCT.GCCGAACTGGA..GCCT.A
186M mutS  .....
186 mutS   .....
199M mutS  .....
199 mutS   .....

600          510      520      530      540      550      560      570      580      590
PAO1 mutS   GGAGCGCCTCAACCCGGCCGAGCTGCTGATTCCAGACGACTGGCCACAGGGCCTGCCGGCGGAGAAAGCGCCGCGGCGTACGTCGCCCGCGCCATGGGAC
52M mutS   .....
52 mutS     .....
60M mutS   .....
60 mutS     .....
93M mutS   .....
93 mutS     .....
95M mutS   .....
95 mutS     .....
100M mutS  .....
100 mutS    .....
101M mutS  .....
101 mutS    .....
127M mutS  ACCCG...GAGCTG.T.ATTCC.GA.GAC.GG.CACA.GGCCTG.CGGC..AGAAG..C..CG.CGTACGTCGCCCGCGCCGCTGG.ACTT.G..C.CGA
127 mutS   ACCCG...GAGCTG.T.ATTCC.GA.GAC.GG.CACA.GGCCTG.CGGC..AGAAG..C..CG.CGTACGTCGCCCGCGCCGCTGG.ACTT.G..C.CGA
186M mutS  .....
186 mutS   .....
199M mutS  .....
199 mutS   .....

610          620      630      640      650      660      670      680      690

```


700

```

PAO1 mutS TTCGATCGCGACTCGGCGCACAAGACCTCTGCCAGCAATTCCGGCACCCAGGACCTGAAAGGCTTCGGCTGCCAGAACCTGACCCTGGCCATCGGCGCCG
52M mutS .....
52 mutS .....
60M mutS .....
60 mutS .....
93M mutS .....
93 mutS .....
95M mutS .....
95 mutS .....
100M mutS .....
100 mutS .....
101M mutS .....
101 mutS .....
127M mutS C...GCGCAC.AGA.C.T.TGCCAGCAA.TC.G..C.C.GGACCTGAAAG.CTT.G.CTGCCAGAACCTGA..CTGG..ATCGG.GCCG.CGGCTGC.T.
127 mutS C...GCGCAC.AGA.C.T.TGCCAGCAA.TC.G..C.C.GGACCTGAAAG.CTT.G.CTGCCAGAACCTGA..CTGG..ATCGG.GCCG.CGGCTGC.T.
186M mutS .....
186 mutS .....
199M mutS .....
199 mutS .....

```

710 720 730 740 750 760 770 780 790

800

```

PAO1 mutS CCGGCTGCCTGCCTCGCCTACGCCAAGGAAACCCAGCGTACCGCCCTGCCGCACCTGCCGACCTGCCGACCTGCCCCACGACCCGCTCGATGACACGGGTGATCCTCGA
52M mutS .....
52 mutS .....
60M mutS .....
60 mutS .....
93M mutS .....C.....
93 mutS .....C.....
95M mutS .....C.....
95 mutS .....C.....
100M mutS .....
100 mutS .....
101M mutS .....
101 mutS .....
127M mutS .TC..CTA.GC.AA.GAA..C.AGC.T.CCG..CTGCCG.AC.TGC..A..CTGC..CAC.A.C..CT.GATGA.A.GGT...CCTCGACG.CG..AGCC
127 mutS .TC..CTA.GC.AA.GAA..C.AGC.T.CCG..CTGCCG.AC.TGC..A..CTGC..CAC.A.C..CT.GATGA.A.GGT...CCTCGACG.CG..AGCC
186M mutS .....
186 mutS .....
199M mutS .....
199 mutS .....

```

810 820 830 840 850 860 870 880 890

900

```

PAO1 mutS CCGTGCCAGCCGCGCAACCTGGAGCTGGATATCAACCTCAGCGGTGCCCGGAGAACACCTGCAATCGGTGGTCGACCGCTGCCAGACCGCCATGGCC
52M mutS ...C.....
52 mutS ...C.....
60M mutS .....
60 mutS .....
93M mutS .....T.....
93 mutS .....T.....
95M mutS .....T.....
95 mutS .....T.....
100M mutS .....
100 mutS .....
101M mutS .....
101 mutS .....
127M mutS GCCGCAACCTG.AGCTGGATATC.A.CTC.GCGGTGG.CGC.A.AACA..CT.CA.T.GGTGGT.G.C..C..CCA.....CATGCCAGC.GCCT.AT
127 mutS GCCGCAACCTG.AGCTGGATATC.A.CTC.GCGGTGG.CGC.A.AACA..CT.CA.T.GGTGGT.G.C..C..CCA.....CATGCCAGC.GCCT.AT
186M mutS .....T.....
186 mutS .....T.....
199M mutS ...C.....
199 mutS ...C.....

```

910 920 930 940 950 960 970 980 990

1000

```

PAO1 mutS AGCGCCTGATGAGCCGCTGGCTGAACCGTCCGTTGCGTGACCGCGCGGTACTGGAAGCCCGCCAGGAGTCCATCGCCTGCCTGCTGGAACGCTACCGCT
52M mutS .....C.....G.....T.....
52 mutS .....C.....G.....T.....
60M mutS .....
60 mutS .....
93M mutS .....C.....
93 mutS .....C.....
95M mutS .....C.....
95 mutS .....C.....
100M mutS .....
100 mutS .....

```

101M mutS
101 mutS
127M mutS GAG.CG...GCTGAA.CG.CCGCTGCGT.A...CGCG..ACTG.AAGCCCG.CA.G..T..AT.GCCT.C.TGCT.GAACG..A.C.CTT..AG.A.CTG
127 mutS GAG.CG...GCTGAA.CG.CCGCTGCGT.A...CGCG..ACTG.AAGCCCG.CA.G..T..AT.GCCT.C.TGCT.GAACG..A.C.CTT..AG.A.CTG
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

1100 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090

PA01 mutS TCGAGAACCTGCAACCGCAGCTCAAGGAAATCGGGACCTCGAACGCATCCTCGCCCGCATCGGCCTGCGCAACGCCCGCCCTCGCGACCTGGCGCGCCT
52M mutST.....
52 mutST.....
60M mutST.....
60 mutST.....
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS CAACCGCAGCT...GGAA.T.GGCGACCTCGAACGC.T.CTCGC.CGCAAT.GGC.TGCGCAAC...C..C.TCGCA.CTGGCGCGCCTGC.CGA...GC
127 mutS CAACCGCAGCT...GGAA.T.GGCGACCTCGAACGC.T.CTCGC.CGCAAT.GGC.TGCGCAAC...C..C.TCGCA.CTGGCGCGCCTGC.CGA...GC
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

1200 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

PA01 mutS GCGCGACGCGCTGGCGGCGCTGCCGACCTGCAGAACGCCATGACCGAACCTGGAAGCGCCGACCTGCAGGCGCTGGCCACCACCATCGGCACCTATCCC
52M mutST.....
52 mutST.....
60M mutS
60 mutS
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS TG...G...TGCC.GAC.TGCAGAACG..ATG.CCGAA.TGGA.G..CCGCACCT..AGGCGCTGGC..CCAC.ATCGGCA.CTATC.C.A..TCGC.GA
127 mutS TG...G...TGCC.GAC.TGCAGAACG..ATG.CCGAA.TGGA.G..CCGCACCT..AGGCGCTGGC..CCAC.ATCGGCA.CTATC.C.A..TCGC.GA
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

1300 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290

PA01 mutS GAACTCGCCGAACCTGCTGGCCAAAGCGATCATCGACAACCCGCCAGCGGTGATCCGCGACGGTGGCGTGATCAAGACCGGCTATGACGCCGAGCTGGAGC
52M mutSG.....
52 mutSG.....
60M mutS
60 mutS
93M mutSG.....
93 mutSG.....
95M mutSG.....
95 mutSG.....
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS ACTGCT.G.C..GGCGATCATCGACAACC.GC..G.GGTGAT..GCGACG.TGG..T..TCAA.A.CG.C.ATGACG.C.AGC..GACGA.CTGCA.G..
127 mutS ACTGCT.G.C..GGCGATCATCGACAACC.GC..G.GGTGAT..GCGACG.TGG..T..TCAA.A.CG.C.ATGACG.C.AGC..GACGA.CTGCA.G..
186M mutS
186 mutS
199M mutSG.....
199 mutSG.....

1400 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390

PA01 mutS AGCTGACGGCGCTGAGCGAAAACGCCGGGCAATTCTGATGGACCTGGAAGCGCGGAGAAAGGCCGACCGGCGCTGCCAACCTGAAGGTGGCTACAA

52M mutS
52 mutS
60M mutS
60 mutS
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS CTGA..GAAAA.GCC.G.C..TTC.T.ATGG.CCTGGA.GC.CG.GA...GC.CGC.CCG.C.TGC.CAACCTGAAGGTCGG..AC.ACCGCATCCATG
127 mutS CTGA..GAAAA.GCC.G.C..TTC.T.ATGG.CCTGGA.GC.CG.GA...GC.CGC.CCG.C.TGC.CAACCTGAAGGTCGG..AC.ACCGCATCCATG
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490

1500
PAO1 mutS CCGCATCCATGGCTACTTCATCGAGCTGCCACGGGTGCAGGCCGAACAGGGCCCGCCGACTACATCCGCGGCAGACCCTGAAAAGGCGCCGAGCGCTTC
52M mutS
52 mutS
60M mutS C A
60 mutS C A
93M mutS A A T
93 mutS A A T
95M mutS A A T
95 mutS A A T
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS G.TAC.T...C.AGCTGC..CG.GTGCAGGC..AACAGGC...GC.GACTA.ATC.GCCGGCAGA..CTGAAAG.CG..GAGCGCTTCATC.CGC.GGA
127 mutS G.TAC.T...C.AGCTGC..CG.GTGCAGGC..AACAGGC...GC.GACTA.ATC.GCCGGCAGA..CTGAAAG.CG..GAGCGCTTCATC.CGC.GGA
186M mutS C
186 mutS C
199M mutS
199 mutS

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

1600
PAO1 mutS ATCACGCCGGAACCTGAAGGCCCTTCGAGGACAAGGCGCTGTCCGCCAGAGCCCGCCCTGGCCCGCAGAAAGGCGCTCTACGAAGAGCTGCTGGAACGCC
52M mutS A A
52 mutS A A
60M mutS
60 mutS
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS .CTGAAGGCCTT.GAGGACAAGG..CT.T.GGCC.AGA.C..CG..CTG...CGCGAGAA.G.GCTCTACGAAGAGCTGCT.G.AC..CTGATCGG.CAT
127 mutS .CTGAAGGCCTT.GAGGACAAGG..CT.T.GGCC.AGA.C..CG..CTG...CGCGAGAA.G.GCTCTACGAAGAGCTGCT.G.AC..CTGATCGG.CAT
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690

1700
PAO1 mutS TGATCGGCCACCTCGCTCCGCTCCAGGACAGCGCCTCGGCGCTGGCGGAACCTGGACGTGCTGGCGAATCTCGCCGACGCGCGCTGAACCTCGACCTGAA
52M mutS G C
52 mutS G C
60M mutS
60 mutS
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS CTCG.TC.GCT.CA.GA.A..G..TC.G.GCT.G.GGA..TGGACGT.CTGGC..ATCT.GCCGA.CG.G...T...CTCGA.CTG.ATCGCC.GC.GT

```

127 mutS   CTCG.TC.GCT.CA.GA.A..G..TC.G.GCT.G.GGA..TGGACGT.CTGGC..ATCT.GCCGA.CG.G..T...CTCGA.CTG.ATCGCC.GC.GT
186M mutS .....
186 mutS .....
199M mutS .....
199 mutS .....
          1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790
1800
PAO1 mutS  TCGCCCGGGTTCGTTCGAACACACCTGCCTGCACATCGAGCAGGGCCGCCATCCGGTGGTTCGAGCAGGTGCTGGAGACACCGTTCGTGGCCAACGACCTG
52M mutS .....
52 mutS .....
60M mutS .....
60 mutS .....
93M mutS .....
93 mutS .....
95M mutS .....
95 mutS .....
100M mutS .....
100 mutS .....
101M mutS .....
101 mutS .....
127M mutS ..T.GAACACA.C.GCCTGCACATC.AGCAGGGCCGCCATCC..TG.T.GAG.A.GT.CT.GAG.CACCG.TCGTGGC.AACGACCT.G.GCT.GATGC
127 mutS ..T.GAACACA.C.GCCTGCACATC.AGCAGGGCCGCCATCC..TG.T.GAG.A.GT.CT.GAG.CACCG.TCGTGGC.AACGACCT.G.GCT.GATGC
186M mutS .....
186 mutS .....
199M mutS .....
199 mutS .....
          1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890
1900
PAO1 mutS  GCGCTGGATGCCGACACCCGGATGCTGGTGCATCACCAGTCCGAACATGGGCGGTAATCCACCTACATGCGGCAACCCGCGCTGATCGTCTGCTGGCGC
52M mutS .....
52 mutS .....
60M mutS .....
60 mutS .....
93M mutS .....
93 mutS .....
95M mutS .....
95 mutS .....
100M mutS .....
100 mutS .....
101M mutS .....
101 mutS .....
127M mutS CGA.ACCCG.AT.CTGGTGATCAC.G.TCCGAACAT..G.G.T.A..CCA.CTAC.TG.GG.AA..CGCGCTG.TCGT..TGCTTG..CA.AT.GGCA..
127 mutS CGA.ACCCG.AT.CTGGTGATCAC.G.TCCGAACAT..G.G.T.A..CCA.CTAC.TG.GG.AA..CGCGCTG.TCGT..TGCTTG..CA.AT.GGCA..
186M mutS .....
186 mutS .....
199M mutS .....
199 mutS .....
          1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990
2000
PAO1 mutS  ACATCGGCAGCTTCGTTCGGCTGCACGCTGCGAGCTGTCCCTGGTGGACCGCATCTTCACCCGCATCGGCTCGTCCGACGACCTTGCCGGCGGCCGCTC
52M mutS ..T.....G.....
52 mutS ..T.....G.....
60M mutS .....
60 mutS .....
93M mutS .....
93 mutS .....
95M mutS .....
95 mutS .....
100M mutS .....
100 mutS .....
101M mutS .....
101 mutS .....
127M mutS TTCGTTT.C.G...G..CG.T.CGA..TGT.CCT.GTGAC.G.ATC.TC...CGCATCGGCT.GT.CGAC.AC.T.G.CGCGG.CGCT..A.CTT.ATGG
127 mutS TTCGTTT.C.G...G..CG.T.CGA..TGT.CCT.GTGAC.G.ATC.TC...CGCATCGGCT.GT.CGAC.AC.T.G.CGCGG.CGCT..A.CTT.ATGG
186M mutS .....
186 mutS .....
199M mutS .....
199 mutS .....
          2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080      2090
2100
PAO1 mutS  GACCTTCATGGTGGAGATGAGCGAAACCGCAACATCCTGCACAACGCCACCGACAAGAGCCTGGTGTGATGGATGAGTTCGGCCGGCCACCGACCC
52M mutS .....
52 mutS .....
60M mutS .....

```

60 mutS
 93M mutS
 93 mutS
 95M mutS
 95 mutS
 100M mutS
 100 mutS
 101M mutS
 101 mutS
 127M mutS TGGAGATGA. CGAA. CCGCCAAC. TC. T. .AC. ACG. . ACTGAC. A. AGC. T. GTGCTGATGGATGAGGTCG. CCGCG. CA. CAG. A. CTTCGAC. GC. T
 127 mutS TGGAGATGA. CGAA. CCGCCAAC. TC. T. .AC. ACG. . ACTGAC. A. AGC. T. GTGCTGATGGATGAGGTCG. CCGCG. CA. CAG. A. CTTCGAC. GC. T
 186M mutS
 186 mutS
 199M mutS T
 199 mutS T

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190

2200
 PAO1 mutS TTGACGGCCTGTCGCTGGCCTGGGCAGCGGCCGAGGACCTGGCCCGGACTCGCGCCTTCACCCTGTTCGCCACCCACTATTTGGAAGTACCGTACTGC
 52M mutS C. . . . G. . . .
 52 mutS C. . . . G. . . .
 60M mutS A. . . . C. . . . G. . . .
 60 mutS A. . . . C. . . . G. . . .
 93M mutS
 93 mutS
 95M mutS
 95 mutS
 100M mutS
 100 mutS
 101M mutS
 101 mutS
 127M mutS G. . . CT. GGCAGC. G. C. A. G. C. T. G. CC. . . . TC. CG. . TTCAC. CT. TTCG. CA. . CAC. ACTTCGAGCTG. CCGTACTGCCGAAAG. CAG
 127 mutS G. . . CT. GGCAGC. G. C. A. G. C. T. G. CC. . . . TC. CG. . TTCAC. CT. TTCG. CA. . CAC. ACTTCGAGCTG. CCGTACTGCCGAAAG. CAG
 186M mutS
 186 mutS
 199M mutS C. . . . G. . . .
 199 mutS C. . . . G. . . .

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290

2300
 PAO1 mutS CGGAAAGCCAGCCCGCGGTAGCCAACGTGCACCTGAACCGGACCGAGCACAATGAACGCATCGTGTTCCTGCACCATGTACTGCCGGGACCGCGAGCCA
 52M mutS
 52 mutS
 60M mutS A. . . .
 60 mutS A. . . .
 93M mutS
 93 mutS
 95M mutS
 95 mutS
 100M mutS
 100 mutS
 101M mutS
 101 mutS
 127M mutS . CCGCG. TAGC. AACGT. C. C. TG. ACGCG. . . GAGCACAATGAAC. . . TCG. . TT. CTGCACCA. G. TACTGC. GGGACCGGCGA. CC. GA. CTAC. G. C
 127 mutS . CCGCG. TAGC. AACGT. C. C. TG. ACGCG. . . GAGCACAATGAAC. . . TCG. . TT. CTGCACCA. G. TACTGC. GGGACCGGCGA. CC. GA. CTAC. G. C
 186M mutS
 186 mutS
 199M mutS
 199 mutS

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390

2400
 PAO1 mutS GAGCTACGGCCTCGCGGTGGCCAGTTGGCCGGCGTGCCGGCCCGGTAATCCAGCGCGCCGCGAACACCTCAAGCGCCTGGAAACCACCGCCTGCGCG
 52M mutS A. T
 52 mutS A. T
 60M mutS A. T
 60 mutS A. T
 93M mutS
 93 mutS
 95M mutS
 95 mutS
 100M mutS
 100 mutS
 101M mutS
 101 mutS
 127M mutS TC. . GGT. . . . CA. TT. GCCGG. GTGCC. G. CC. . GTAATC. AG. . CGCCCG. GAACAC. T. AA. CG. CTGGA. . C. A. . A. CCTG. . G. AC. AGATG. C
 127 mutS TC. . GGT. . . . CA. TT. GCCGG. GTGCC. G. CC. . GTAATC. AG. . CGCCCG. GAACAC. T. AA. CG. CTGGA. . C. A. . A. CCTG. . G. AC. AGATG. C
 186M mutS
 186 mutS

Anexo B: Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene *mutD* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutD   ATGCGTAGCGTCGTACTGGATACCGAAACCACCGGCATGCCGGTGACCGATGGTCACCGGATCATCGAGATCGGCTGTGTCGAGCTGGAGGGGCGCCGCC
52M mutD   .....
52 mutD     .....
60M mutD   .....
60 mutD     .....
93M mutD   .....
93 mutD     .....
95M mutD   .....
95 mutD     .....
100M mutD  .....
100 mutD    .....
101M mutD  .....
101 mutD    .....
127M mutD  .....
127 mutD    .....
186M mutD  .....
186 mutD    .....
199M mutD  .....
199 mutD    .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutD   TGACCGGTCGCCACTTCCACGTCTACCTGCAACCCGATCGCGAGGTCGACGAAGGGGCGATCGCCGTCCACGGCATCACCAACGAATACCTGAAGGACAA
52M mutD   .....
52 mutD     .....
60M mutD   .....
60 mutD     .....
93M mutD   .....
93 mutD     .....
95M mutD   .....
95 mutD     .....
100M mutD  .....
100 mutD    .....
101M mutD  .....
101 mutD    .....
127M mutD  .....
127 mutD    .....
186M mutD  .....
186 mutD    .....
199M mutD  .....
199 mutD    .....

210          210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1 mutD   GCCGCGCTTCCGCGAGGTCGCCAACGATTTCTTCGAATTCATCCGCGGCCAGCTGATCATCCACAACGCGCGTTTCGATATCGGCTTCATCAACAAC
52M mutD   .....
52 mutD     .....
60M mutD   .....
60 mutD     .....
93M mutD   .....
93 mutD     .....
95M mutD   .....
95 mutD     .....
100M mutD  .....
100 mutD    .....
101M mutD  .....
101 mutD    .....
127M mutD  .....
127 mutD    .....
186M mutD  .....
186 mutD    .....
199M mutD  .....
199 mutD    .....

```

310 320 330 340 350 360 370 380 390

400

PAO1 mutD GAGTTCGCCCTGCTGGGCCAGCAGGACCGCTCGGACGTGACCGAGTACTGCTCGGTGCTGGATACCTGCTGATGGCCCGGAGCGCCATCCGGGCCAGC

52M mutD

52 mutD

60M mutD

60 mutD

93M mutD

93 mutD

95M mutD

95 mutD

100M mutD

100 mutD

101M mutD

101 mutD

127M mutD

127 mutD

186M mutD

186 mutD

199M mutD

199 mutD

410 420 430 440 450 460 470 480 490

500

PAO1 mutD GCAAACAACCTCGATGCGTTGTGCAAGCGCTACGGCGTGGACAACGCCGTCGGACCTGCACGGCGCGTTGCTCGACGCCGAGATCCTCGCCGACGTCCTA

52M mutD

52 mutD

60M mutD

60 mutD

93M mutD

93 mutD

95M mutD

95 mutD

100M mutD

100 mutD

101M mutD

101 mutD

127M mutD

127 mutD

186M mutD

186 mutD

199M mutD

199 mutD

510 520 530 540 550 560 570 580 590

600

PAO1 mutD CCTGGCGATGACCGCGGCCAGACCAGCCTGTCGCTGGCCGGCAGCGGCCGGAAGGCCAGCGGAGCGGCCGCGGATGGTCAGCCCGATCCGTTCGGCTC

52M mutD

52 mutD

60M mutD

60 mutD

93M mutD

93 mutD

95M mutD

95 mutD

100M mutD

100 mutD

101M mutD

101 mutD

127M mutD

127 mutD

186M mutD

186 mutD

199M mutD

199 mutD

610 620 630 640 650 660 670 680 690

700

```

PAO1 urvD CTCTGGCGCGACCATCCCAGGCGTGCCTCGAGCACTACCAGCGCGCTTCGGCCATATCCTGGTGGACGAGTTCAGGACACCAACGCGTGAATACGCT
52M urvD .....G.....
52 urvD .....G.....
60M urvD .....G.....
60 urvD .....G.....
93M urvD .....
93 urvD .....
95M urvD .....
95 urvD .....
100M urvD .....G.....
100 urvD .....
101M urvD .....G.....
101 urvD .....G.....
127M urvD .....G.....
127 urvD .....G.....
186M urvD .....G.....
186 urvD .....G.....
199M urvD .....G.....
199 urvD .....G.....

```

800

```

PAO1 urvD GGCTGCGGATTCTCGCCAAGGGCGGCGACAGCCTGATGGTGGTTCGGCGACGACGACCAGTCGATCTACGGTGGCGTGGCGCACGGATCGAGAATCCCA
52M urvD .....G.....
52 urvD .....G.....
60M urvD .....A.....
60 urvD .....A.....
93M urvD .....T.....T.....
93 urvD .....T.....T.....
95M urvD .....T.....T.....
95 urvD .....T.....T.....
100M urvD .....A.....
100 urvD .....
101M urvD .....
101 urvD .....A.....
127M urvD .....
127 urvD .....
186M urvD .....
186 urvD .....
199M urvD .....
199 urvD .....

```

900

```

PAO1 urvD GCAGTTCAGCGACGACTTCGCCGATGCCGAGGTGATCCGCCCTGGAGCAGAACTACCGTTCCACCGCGTCGATCCTCAAGGCCGCCAACGCCCTGATCGCC
52M urvD .....C.....C.....
52 urvD .....C.....C.....
60M urvD .....C.....C.....
60 urvD .....C.....C.....
93M urvD A.....C.....
93 urvD A.....C.....
95M urvD A.....C.....
95 urvD A.....C.....
100M urvD .....
100 urvD .....
101M urvD .....
101 urvD .....
127M urvD A.....C.....
127 urvD A.....C.....
186M urvD .....C.....
186 urvD .....C.....
199M urvD A.....C.....
199 urvD A.....C.....

```

1000

```

PAO1 urvD AACAAACCAGGGACGCCTGGGCAAGGAGTTGTGGACCGACGGCGAGGACGGCGAGTCGCTGAGCCTGTACGCCCGCTTCAACGAGCACGACGAGGCGCGCT
52M urvD .....
52 urvD .....
60M urvD .....
60 urvD .....
93M urvD .....T.....
93 urvD .....T.....
95M urvD .....T.....
95 urvD .....T.....
100M urvD .....T.....

```

100 urvDT.....
101M urvDT.....
101 urvDT.....
127M urvDC.....
127 urvDC.....
186M urvDC.....
186 urvD
199M urvD
199 urvD

1100
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090
PAO1 urvD ACGTGGTCGAGTCGATCGAGAGCGCGCTCAAGGGCGGCCTGGCGCGCAGCGAGATCGCCATCCTCTACCGCTCCAACGCCAGTCGCGGGTGCTGGAGGA
52M urvDGA.....
52 urvDGA.....
60M urvDA.....
60 urvDA.....
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD
186 urvD
199M urvD
199 urvD

1200
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
PAO1 urvD AGCCCTGCTGCGGGAGAAGATTCCCTACCGCATCTACGGCGGCCAGCGCTTCTTCGAGCGTGCCGAGATCAAGAACGCCATGGCCTACCTGCGCCTGCTC
52M urvD
52 urvD
60M urvD
60 urvD
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD
186 urvD
199M urvD
199 urvD

1300
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290
PAO1 urvD GACGGCCGCGGCAACGACGCGCGCTGGAACGGGTGGTCAACGTGCCGGCACGCGGCATCGGCGAGAAGACCGTGGAGAGCATCCGCGAATTCGCCCGCG
52M urvD
52 urvD

60M urvD
60 urvD
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD
186 urvD
199M urvD
199 urvD

1400 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390

PAO1 urvD GCAACGATGTGTCGATGTGGGAGGCGATCCGCCTGATGATCGCCAACAAGGTCTGCCCGGCCGCGCCGAGCCCTGACCGGCTTCGTCGAGCTGAT
52M urvD
52 urvD
60M urvD
60 urvD
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD
186 urvD
199M urvD
199 urvD

1500 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490

PAO1 urvD CGAGAACTTTTCGGCGAAGGTGATGGACATGCCGCTGCACCTGATGACCCAGACGGTGATCGAGCAGTCCGGACTGATCAGCTACCACAAGGAAGAAAA
52M urvD
52 urvD
60M urvD
60 urvD
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD
186 urvD
199M urvD
199 urvD

1600 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

PAO1 urvD GGCGAGAAAGGCCAGGCCCGGGTGGAGAACCCTCGAGGAACCTGGTCAGCGCCGCCCGCCCTTCGAGAACAGCGAGGAAGAGGAAACCTCACCCCGCTGC
52M urvD
52 urvD
60M urvD
60 urvD
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD

186 urvD
199M urvD
199 urvD

1700
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690
PAO1 urvD AGGCCTTCCTCAGCCACGCCTCCCTGGAGGCCGGGAAACCCAGGCCGACGCCACGAGGACAGTGTCAGCTGATGACCTGCACAGGCCAAGGGCCT
52M urvD
52 urvD
60M urvD
60 urvD
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD
186 urvD
199M urvD
199 urvD

1800
1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790
PAO1 urvD GGAGTTCCCGCTGGTGTTCCTGGTCGGCATGGAGGAAGGGCTGTTCCCGCACAGATGAGCCTGGAGGAATCCGGCCGCCTGGAAGAGGAACGCCGCCTG
52M urvD
52 urvD
60M urvD
60 urvD
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD
186 urvD
199M urvD
199 urvD

1900
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
PAO1 urvD GCCTACGTCGGCGTCACCCGCGCCATGCAGCGACTGGTCTGACCTACGCGGAGACCCGCGGCTCTACGGTAGCGAGACCTACAACAAGGTTTCGCGCT
52M urvD
52 urvD
60M urvD
60 urvD
93M urvD
93 urvD
95M urvD
95 urvD
100M urvD
100 urvD
101M urvD
101 urvD
127M urvD
127 urvD
186M urvD
186 urvD
199M urvD
199 urvD

2000
1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990
PAO1 urvD TCATCCGCGAGATCCCGCGGCGCTGATCCAGGAAGTGGCCTGTCCAATACCGTTCAGCCGCCCTACGGCGGCACCTCGCGCAGTGCCGGCGGCAACCT
52M urvD
52 urvD
60M urvD
60 urvD
93M urvD

```

93 urvD .....AC.....G...
95M urvD .....AC.....G...
95 urvD .....AC.....G...
100M urvD .....
100 urvD .....
101M urvD .....
101 urvD .....
127M urvD .....T.....AC.....G...
127 urvD .....T.....AC.....G...
186M urvD .....C.....
186 urvD .....C.....
199M urvD .....T.....AC.....G...
199 urvD .....T.....AC.....G...

```

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090

2100

```

PAO1 urvD CTTTCAGCGGCGCCGGGGTGCCTGAGACGCCCTTCTCCCTCGGCCAGCGGGTGCGCCACGCGCTGTTTCGGCGAAGGGACTATCCTCAACTTCGAAGGCGCC
52M urvD G.....
52 urvD G.....
60M urvD G.....
60 urvD G.....
93M urvD G.....
93 urvD G.....
95M urvD G.....
95 urvD G.....
100M urvD .....
100 urvD .....
101M urvD .....
101 urvD .....
127M urvD G.....T.....
127 urvD G.....T.....
186M urvD .....
186 urvD .....
199M urvD G.....T.....
199 urvD G.....T.....

```

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180

```

PAO1 urvD GCGCCCCAGCCCCGGGTGCAGGTGAATTCGAGAGCGAAGGCAGCAAGTGGCTGATGCTCGGCTACGCCAAGCTGGAAGCCCTGTAG
52M urvD .....
52 urvD .....
60M urvD .....
60 urvD .....
93M urvD .....
93 urvD .....
95M urvD .....
95 urvD .....
100M urvD .....
100 urvD .....
101M urvD .....
101 urvD .....
127M urvD .....C.....
127 urvD .....C.....
186M urvD .....
186 urvD .....
199M urvD .....C.....
199 urvD .....C.....

```


Anexo D: Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene *mutM* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutM   ATGCCCGAACTACCCGAAGTCGAAACACCCGCCGGGGCATCGCCCCCTACCTCGAAGGCCAGCGCGTCGAGCGCGTGATCGTGCCGCGAGCGGCGCCTGC
52M mutM   .....
52 mutM     .....
60M mutM     .....
60 mutM     .....
93M mutM     .....
93 mutM     .....
95M mutM     .....
95 mutM     .....
100M mutM    .....
100 mutM     .....
101M mutT    .....
101 mutM     .....
127M mutM    .....
127 mutM     .....
186M mutM    .....
186 mutM     .....
199M mutM    .....
199 mutM     .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutM   GCTGGCCGATTCCCGAAGACCTGGACGTGCGCCTGTCCGGACAACGCATCGTCAGCGTCGAGCGCCGCGCCAAGTACCTGCTGCTGGGCGCCGAGGCCGG
52M mutM   .....
52 mutM     .....
60M mutM     .....
60 mutM     .....
93M mutM     .....
93 mutM     .....
95M mutM     .....
95 mutM     .....
100M mutM    .....
100 mutM     .....
101M mutT    .....
101 mutM     .....
127M mutM    .....
127 mutM     .....
186M mutM    .....
186 mutM     .....
199M mutM    .....
199 mutM     .....

300          210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1 mutM   TACGCTGATCAGCCACCTGGGCAATGTCCGGCAGCCTGAGGCTGGTGGAGAGCGGCACCCCGGCCAGTCCGCCACGAGCACGTGACATCGAGCTGGCCTCG
52M mutM   .....
52 mutM     .....
60M mutM     .....
60 mutM     .....
93M mutM     .....
93 mutM     .....
95M mutM     .....
95 mutM     .....
100M mutM    .....
100 mutM     .....
101M mutT    .....
101 mutM     .....
127M mutM    .....
127 mutM     .....
186M mutM    .....
186 mutM     .....
199M mutM    .....
199 mutM     .....

```

| | | | | | | | | | | |
|-----------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| PAO1 mutM | GGCATGGCCCTGCGCTACACCGATCCGCGGCGCTTCGGCGCCATGCTCTGGAGCCTGGCGCCACTGGAAACACGAGTTGCTGCGCAACCTCGGCCCGGAAC | | | | | | | | | |
| 52M mutM | | | | | | | | | | |
| 52 mutM | | | | | | | | | | |
| 60M mutM | | | | | | | | | | |
| 60 mutM | | | | | | | | | | |
| 93M mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 93 mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 95M mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 95 mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 100M mutM | | | | | | | | | | |
| 100 mutM | | | | | | | | | | |
| 101M mutT | | | | | | | | | | |
| 101 mutM | | | | | | | | | | |
| 127M mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 127 mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 186M mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 186 mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 199M mutM |C..... | | | | | | | | | |
| 199 mutM |C..... | | | | | | | | | |
| | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | |
| 500 | | | | | | | | | | |
| PAO1 mutM | CGCTGACCGACGCTTTCGCGGCGCCAGCGTCTGTTTCGAGCTGTCGCGCGGGCGGAGCATGGCGGTCAAGCCGTTTCATCATGGACAACGCGGTGGTGGTTCGG | | | | | | | | | |
| 52M mutM | | | | | | | | | | |
| 52 mutM | | | | | | | | | | |
| 60M mutM | | | | | | | | | | |
| 60 mutM | | | | | | | | | | |
| 93M mutM | | | | | | | | | | |
| 93 mutM | | | | | | | | | | |
| 95M mutM | | | | | | | | | | |
| 95 mutM | | | | | | | | | | |
| 100M mutM | | | | | | | | | | |
| 100 mutM | | | | | | | | | | |
| 101M mutT | | | | | | | | | | |
| 101 mutM | | | | | | | | | | |
| 127M mutM |A..... | | | | | | | | | |
| 127 mutM |A..... | | | | | | | | | |
| 186M mutM | | | | | | | | | | |
| 186 mutM | | | | | | | | | | |
| 199M mutM |A..... | | | | | | | | | |
| 199 mutM |A..... | | | | | | | | | |
| | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | |
| 600 | | | | | | | | | | |
| PAO1 mutM | GGTCGGCAACATCTACGCCAGCGAAGCGCTGTTTCGCGCGCGGCATCGATCCGCGCAAGCCCGCGGGAGCATCTCCAAGCGCGCTACCTGCGCCTGGCG | | | | | | | | | |
| 52M mutM | | | | | | | | | | |
| 52 mutM | | | | | | | | | | |
| 60M mutM | | | | | | | | | | |
| 60 mutM | | | | | | | | | | |
| 93M mutM | | | | | | | | | | |
| 93 mutM | | | | | | | | | | |
| 95M mutM | | | | | | | | | | |
| 95 mutM | | | | | | | | | | |
| 100M mutM | | | | | | | | | | |
| 100 mutM | | | | | | | | | | |
| 101M mutT | | | | | | | | | | |
| 101 mutM | | | | | | | | | | |
| 127M mutM | | | | | | | | | | |
| 127 mutM | | | | | | | | | | |
| 186M mutM | | | | | | | | | | |
| 186 mutM | | | | | | | | | | |
| 199M mutM | | | | | | | | | | |
| 199 mutM | | | | | | | | | | |
| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | |
| 700 | | | | | | | | | | |

Anexo E: Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene *mutY* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutY   ATGACACCTGAAGGCTTCAACGGCGCGGTCCCTCGACTGGTACGACCGTCACGGTCGCAAGGATCTGCCCTGGCAGCAGGGCATCACCCCTACCGGGTGT
52M mutY   .....
52 muY     .....
60M muY     .....
60 mut Y    .....
93M mutY    .....
93 muY      .....
95M mutY    .....
95 muY      .....
100M mutY   .....
100 mutY    .....
101M mutY   .....
101 mutY    .....
127M mutY   .....
127 mutY    .....
186M mutY   .....
186 mutY    .....
199M mutY   .....
199 mutY    .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutY   GGGTCTCGGAAATCATGCTGCAGCAGACCCAGTCCAGCACCGTGTCTCGGTTACTTCGACCGTTTCATGGCAGCGTTGCCCGACGTCGAGGCACTGGCCCG
52M mutY   .....
52 muY     .....
60M muY     .....
60 mut Y    .....
93M mutY    .....
93 muY      .....
95M mutY    .....
95 muY      .....
100M mutY   .....
100 mutY    .....
101M mutY   .....
101 mutY    .....
127M mutY   .....
127 mutY    .....
186M mutY   .....
186 mutY    .....
199M mutY   .....
199 mutY    .....

300          210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1 mutY   GGGCGCCGAGGACGAAGTCCTGCACCTGTGGACCGGGCTCGGCTACTACAGCCGTGCGCGCAACCTGCACAAGACCGCGCAGATCGTGGTCGAGCGGCAT
52M mutY   .....
52 muY     .....
60M muY     .....
60 mut Y    .....
93M mutY    .....
93 muY      .....
95M mutY    .....
95 muY      .....
100M mutY   .....
100 mutY    .....
101M mutY   .....
101 mutY    .....
127M mutY   .....
127 mutY    .....
186M mutY   .....
186 mutY    .....
199M mutY   .....
199 mutY    .....

```

```

310      320      330      340      350      360      370      380      390
400
PAO1 mutY GCGGGGAGTTCCTCCCGCGACGTCGAGCAACTCGCCGAAC TGCCCGGCATCGGCCGCTCCACCGCTGGAGCCATCGCCAGCCTGTGCGATGGGCCTGCGCG
52M mutY .....
52 muY .....
60M muY .....
60 mut Y .....
93M mutY .....
93 muY .....
95M mutY .....
95 mutY .....
100M mutY ..... T ..... T .....
100 mutY ..... T ..... T .....
101M mutY ..... T ..... T .....
101 mutY ..... T ..... T .....
127M mutY .....
127 mutY .....
186M mutY ..... T .....
186 mutY ..... T .....
199M mutY .....
199 mutY .....

410      420      430      440      450      460      470      480      490
500
PAO1 mutY CACCGATCCTCGACGGCAACGTCAGCGGCTACTGGCGGCTACCTGGCGCAGGACGGCTATCCCGCGAACC GAAGGTGGCCAGGGCGCTGTGGGAAGC
52M mutY .....
52 muY .....
60M muY .....
60 mut Y .....
93M mutY .....
93 muY .....
95M mutY .....
95 mutY .....
100M mutY .....
100 mutY .....
101M mutY .....
101 mutY .....
127M mutY .....
127 mutY .....
186M mutY ..... T .....
186 mutY ..... T .....
199M mutY .....
199 mutY .....

510      520      530      540      550      560      570      580      590
600
PAO1 mutY CGCCGAACGCTTCACCCCGCACGCACGGGTCAACCACTACACCCAGGCGATGATGGACCTCGGCCACCCCTCTGCACGCGCAGCAAGCCAGTTGCCTG
52M mutY .....
52 muY .....
60M muY .....
60 mut Y .....
93M mutY .....
93 muY .....
95M mutY .....
95 mutY .....
100M mutY .....
100 mutY .....
101M mutY .....
101 mutY .....
127M mutY .....
127 mutY .....
186M mutY .....
186 mutY .....
199M mutY .....
199 mutY .....

610      620      630      640      650      660      670      680      690
700

```

```
PAO1 mutY CTTTGGCCCGCTGGTCTCGGGCTGCCGCGGCACCTGCTCGGCCGCGAAGCCGATTATCCGCAGCCCAAGCCGCGCAAGGCGTTGCCACAGAAGCGCACGC
52M mutY .....C.....G.....
52 muY .....G.....
60M muY .....C.....G.....
60 mut Y .....G.....
93M mutY .....G.....
93 muY .....C.....
95M mutY .....C.....
95 mutY .....C.....
100M mutY .....
100 mutY .....
101M mutY .....C.....
101 mutY .....C.....
127M mutY .....
127 mutY .....C.....
186M mutY .....C.....
186 mutY .....C.....G.....
199M mutY .....
199 mutY .....
```

710 720 730 740 750 760 770 780 790

```
800
PAO1 mutY TGATGCCGATCCTGGCCAACCGCGACGGCGCCATACTGCTCTACCGGGCGCCTTCCAGCGGACTCTGGGGCGGGCTCTGGAGCCTCCCGAACTGGAGCA
52M mutY .....
52 muY .....
60M muY .....
60 mut Y .....
93M mutY .....
93 muY .....
95M mutY .....
95 mutY .....
100M mutY .....
100 mutY .....
101M mutY .....
101 mutY .....
127M mutY .....
127 mutY .....
186M mutY .....
186 mutY .....
199M mutY .....
199 mutY .....
```

810 820 830 840 850 860 870 880 890

```
900
PAO1 mutY CCTCGACGGCCTCGAACCGCTCGCCGCGGCCATTCCCTGGCCCTCGGCAGCGCCGCGAACTGAGCGGCCTGACCCATACCTTCAGTCATTCCAGCTC
52M mutY .....
52 muY .....
60M muY .....
60 mut Y .....
93M mutY .....
93 muY .....
95M mutY .....
95 mutY .....
100M mutY .....
100 mutY .....
101M mutY .....
101 mutY .....
127M mutY .....
127 mutY .....
186M mutY .....
186 mutY .....
199M mutY .....
199 mutY .....
```

910 920 930 940 950 960 970 980 990

```
1000
PAO1 mutY GCCATCGAGCCCTGGCTGGTGGCGGTGGAAGGCGCTCCGCGCGCCGTGGCCGAGGGCGACTGGCTCTGGTATAACCTCGCCACCCCGCCGCGCTGGGCC
52M mutY .....
52 muY .....
60M muY .....
60 mut Y .....
93M mutY .....
93 muY .....
95M mutY .....
95 mutY .....
100M mutY .....
100 mutY .....
101M mutY .....
```

101 mutY
127M mutY
127 mutY
186M mutY
186 mutY
199M mutY
199 mutY

 1010 1020 1030 1040 1050 1060
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
PA01 mutY TCGCCGCTCCGGTGAAGAAGCTGCTCAAGCGCGCAGAACAGGAACTCGGACGGGCACGGCCGCGTGA
52M mutY
52 muY
60M muY
60 mut Y
93M mutY
93 muY
95M mutY
95 mutY
100M mutY
100 mutY
101M mutY
101 mutY
127M mutY
127 mutY
186M mutY
186 mutY
199M mutY
199 mutY

Anexo F: Alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene *mutT* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutT   GTGAAACGAGTACATGTCGCCGCGGCCGTGATTCGTGGCTCCGATGGCCGGGTGCTGATCGCCCGCGGCCGGAAGACAAGCACCAGGGCGGCCTGTGGG
52M mutT   .....
52 mutT     .....
60M mutT   .....
60 mutT     .....
93M mutT   .....
93 mutT     .....
95M mutT   .....
95 mutT     .....
100M mutT  .....
100 mutT    .....
101M mutT  .....
101 mutT    .....
127M mutT  .....
127 mutT    .....
186M mutT  .....
186 mutT    .....
199M mutT  .....
199 mutT    .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutT   AGTTTCCCGGGGCAAGGTGGAGGACGGCGAGCCGGTGC CGCGCGGCTTGGCCCGTGAGCTGGAAGAGGAAGTGGGCATCCGTGTCGAGCGGGCCGGCC
52M mutT   .....
52 mutT     .....
60M mutT   .....
60 mutT     .....
93M mutT   .....
93 mutT     .....
95M mutT   .....
95 mutT     .....
100M mutT  .....
100 mutT    .....
101M mutT  .....
101 mutT    .....
127M mutT  .....
127 mutT    .....
186M mutT  .....
186 mutT    .....
199M mutT  .....
199 mutT    .....

300          210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1 mutT   GCTGATCCAGGTCCGGCAGGACTATGCCGACAAGCACGTCCTGCTCGATGTCTGGGAGGTCGACGGGTTTCCGGCGAAGCCACGGCGCCGAGGGCCAA
52M mutT   .....
52 mutT     .....
60M mutT   .....
60 mutT     .....
93M mutT   .....
93 mutT     .....
95M mutT   .....
95 mutT     .....
100M mutT  .....
100 mutT    .....
101M mutT  .....
101 mutT    .....
127M mutT  .....
127 mutT    .....
186M mutT  .....
186 mutT    .....
199M mutT  .....
199 mutT    .....

```


127M mutT
127 mutT
186M mutT
186 mutT
199M mutT
199 mutT

Anexo G: Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene *mutS* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutS   MTDLSQHTPMMQQYFKLKHQHPDQLMFYRMGDFYELFYEDAKKAAKLLDITLTARGQSGGKAIPMAGIPFHS AEGYLAKLVKLGESVAICEQIGDPATSK
52M mutS   .....
52 mutS    .....
60M mutS   .....
60 mutS    .....
93M mutS   .....
93 mutS    .....
95M mutS   .....
95 mutS    .....
100M mutS  .....
100 mutS   .....
101M mutS  .....
101 mutS   .....
127M mutS  .....
127 mutS   .....
186M mutS  .....
186 mutS   .....
199M mutS  .....
199 mutS   .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutS   GPVERQVVRIITPGTVSDEALLDERRDNLLAAILGDERLFLGLAVLDITSGRFVQEIKGWETLLAELERLNPAELLIPDDWPQGLPAEKRRGVRRRAPWD
52M mutS   .....
52 mutS    .....
60M mutS   .....
60 mutS    .....
93M mutS   .....
93 mutS    .....
95M mutS   .....
95 mutS    .....
100M mutS  .....
100 mutS   .....
101M mutS  .....
101 mutS   .....
127M mutS  A.GGADHHPRHGERRGAARRTPROPAGGDPRRRAPVRRPRRAGHHQRP LQRPDKKRLGNPAGRTG.PQPGRADSRRLATGPAG.EAPRRTSPRAVGLRSR
127 mutS   A.GGADHHPRHGERRGAARRTPROPAGGDPRRRAPVRRPRRAGHHQRP LQRPDKKRLGNPAGRTG.PQPGRADSRRLATGPAG.EAPRRTSPRAVGLRSR
186M mutS  .....
186 mutS   .....
199M mutS  .....
199 mutS   .....

300          210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1 mutS   FDRSAHKSICQQQFGTQDLKFGCQNLTLAIGAAGCLLAYAKETQRTALPHLRSLRHDRLLDDTVILDGASRRNLELDINLSGGRENTLQSVVDRCCQTAMA
52M mutS   .....
52 mutS    .....
60M mutS   .....
60 mutS    .....
93M mutS   .....
93 mutS    .....
95M mutS   .....
95 mutS    .....
100M mutS  .....
100 mutS   .....
101M mutS  .....
101 mutS   .....
127M mutS  LGAQEP LPAIRHPGPERLRLPEPDGHRRLP .RLRQGNPAYRPAAPAQPAPRPPR*HG.PRRRQPPQPGAGYQQRWPREHPAIGGRPLP .HGQPPD
127 mutS   LGAQEP LPAIRHPGPERLRLPEPDGHRRLP .RLRQGNPAYRPAAPAQPAPRPPR*HG.PRRRQPPQPGAGYQQRWPREHPAIGGRPLP .HGQPPD
186M mutS  .....
186 mutS   .....
199M mutS  .....
199 mutS   .....

```

310 320 330 340 350 360 370 380 390
400
PAO1 mutS
52M mutS
52 mutS
60M mutS
60 mutS
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS EP.AEPSAA*.RGTGSPPGVHRLPAGT.PL.EPATAA.GNRRPRTHPRPHRPAQRPPSRPGAPAR.AGG.AGPAERHVRTGSAAP.GAGHHHRHLSR.RR
127 mutS EP.AEPSAA*.RGTGSPPGVHRLPAGT.PL.EPATAA.GNRRPRTHPRPHRPAQRPPSRPGAPAR.AGG.AGPAERHVRTGSAAP.GAGHHHRHLSR.RR
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

410 420 430 440 450 460 470 480 490
500
PAO1 mutS ELAELLAKAIIDNPPAVIRDGGVIKTGYDAELDELQALSENAGQFLMDLEAREKARTGLPNLKVGNRIHGYFIELPRVQAEQAPADYIRROTLKGAERF
52M mutS
52 mutS
60M mutS
60 mutS
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS TAGQGDHRQPAGGD.RRW.QDRL*RRAGRAAGAERKRRRAIPDGPGSAR.GPHRPAQPEGR.QPHPWLL.RAATGAG.TG.GRLHPPADPERRRALHHAG
127 mutS TAGQGDHRQPAGGD.RRW.QDRL*RRAGRAAGAERKRRRAIPDGPGSAR.GPHRPAQPEGR.QPHPWLL.RAATGAG.TG.GRLHPPADPERRRALHHAG
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

510 520 530 540 550 560 570 580 590
600
PAO1 mutS ITPELKAFEDKALSAQSRLAREKALYELLERLIGHLAPLQDSASALAEVDLANLAERALNLDLNRPRFVEHTCLHIEQGRHPVVEQVLETPFVANDL
52M mutS
52 mutS
60M mutS
60 mutS
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS TEGLRGQAVGPEPRPGPREGALRRAAGTPDRPSRSAPQRLGAGG.GRAGESRTR.PRPESPAV.RTHLPAHRAGPPS.GRAGAGDTVRGQRPAGC
127 mutS TEGLRGQAVGPEPRPGPREGALRRAAGTPDRPSRSAPQRLGAGG.GRAGESRTR.PRPESPAV.RTHLPAHRAGPPS.GRAGAGDTVRGQRPAGC
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

610 620 630 640 650 660 670 680 690
700
.....

PAO1 mutS ALDADTRMLVITGPNMGGKSTYMRQTALIVLLAHIGSFVPAARCELSLVDRIFTRIGSSDDLGGRRSTFMVEMSETANILHNATDKSLVLMDEVGRGTST
52M mutS
52 mutS
60M mutS
60 mutS
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS RHPDAGDHRSEH . R*IHLHAANRADR . ACAHRQLRSGCALR . VPGGPHLHPHRLVRRPCRRPLDLHGGDERNRQHP . QRH*QEPGADG*GRPRHQHLRRP
127 mutS RHPDAGDHRSEH . R*IHLHAANRADR . ACAHRQLRSGCALR . VPGGPHLHPHRLVRRPCRRPLDLHGGDERNRQHP . QRH*QEPGADG*GRPRHQHLRRP
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

710 720 730 740 750 760 770 780 790

800
PAO1 mutS FDGLSLAWAAAEDLARTRAFITLTFATHYFELTVLPESQPAVANVHLNATEHNERIVFLHHVLPGPASQSYGLAVAQLAGVPAPVIQRAREHLKRETTSLP
52M mutS T
52 mutS T
60M mutS T T
60 mutS T T
93M mutS
93 mutS
95M mutS
95 mutS
100M mutS
100 mutS
101M mutS
101 mutS
127M mutS VA . GSGRGP . SRLHPVRHPLLRADRTAGKPARGSQAPERDRAQ*T . RVPAPCTAGTGEPELRPRG . PVGRRAGPGNPARPRTPOAPGNHQAARDA
127 mutS VA . GSGRGP . SRLHPVRHPLLRADRTAGKPARGSQAPERDRAQ*T . RVPAPCTAGTGEPELRPRG . PVGRRAGPGNPARPRTPOAPGNHQAARDA
186M mutS
186 mutS
199M mutS
199 mutS

810 820 830 840 850

PAO1 mutS HEMPSQSGKPASPMQSDLFASLPHFVIDELSRINPDDISPROALDILLYAWKMRV*
52M mutS *
52 mutS *
60M mutS *
60 mutS *
93M mutS *
93 mutS *
95M mutS *
95 mutS *
100M mutS *
100 mutS *
101M mutS *
101 mutS *
127M mutS EPAER . ARLAD . ERPVRQPA . PGDR*IVEDQ . RYQPAA . S . SVICMED . GL
127 mutS EPAER . ARLAD . ERPVRQPA . PGDR*IVEDQ . RYQPAA . S . SVICMED . GL
186M mutS *
186 mutS *
199M mutS *
199 mutS *

Anexo H: Alinhamento da seqüência de aminoácidos codificados pelo gene *mutD* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com seqüência padrão da amostra PAO1

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutD  MRSVLDTETTGMPVTDGHRRIEIGCVELEGRRLTGRHFHVYLQPDREVDEGAI AVHGITNEYLKDKPRFREVANDFEFIRGAQLIIHNAAFDIGFINN
52M mutD  .....
52 mutD    .....
60M mutD  .....
60 mutD    .....
93M mutD  .....
93 mutD    .....
95M mutD  .....
95 mutD    .....
100M mutD .....
100 mutD   .....
101M mutD .....
101 mutD   .....
127M mutD .....
127 mutD   .....
186M mutD .....
186 mutD   .....
199M mutD .....
199 mutD   .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutD  EFALLGQDRSDVTEYCSVLDTLLMARERHPGQRNLDALCKRYGVDNSGRDLHGALLDAEILADVYLAMTGGQTSLSLAGSGAEGDGSGRPMVSPIRRL
52M mutD  .....
52 mutD    .....
60M mutD  .....
60 mutD    .....
93M mutD  .....
93 mutD    .....
95M mutD  .....
95 mutD    .....
100M mutD .....
100 mutD   .....
101M mutD .....
101 mutD   .....
127M mutD .....
127 mutD   .....
186M mutD .....
186 mutD   .....
199M mutD .....
199 mutD   .....

210     220     230     240
PAO1 mutD  DPARVATPVL RANAEE LAHAARLAVIEKSAGGPSLWAQLEAPVGE*
52M mutD  .....
52 mutD    .....
60M mutD  .....
60 mutD    .....
93M mutD  .....
93 mutD    .....
95M mutD  .....
95 mutD    .....
100M mutD .....
100 mutD   .....
101M mutD .....
101 mutD   .....
127M mutD .....
127 mutD   .....
186M mutD .....
186 mutD   .....
199M mutD .....
199 mutD   .....

```

Anexo J: Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene *mutM* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1.

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutM  MPELPEVETTRRGIAPYLEGQRVERVIVRERRLRWPIPEDLDVRLSGQRIVSVERRAKYLLLGAEAGTLISHLGMSGSLRLVESGTPASRHEHVDIELAS
52M mutM  .....
52 mutM   .....
60M mutM  .....
60 mutM   .....
93M mutM  .....
93 mutM   .....
95M mutM  .....
95 mutM   .....
100M mutM .....
100 mutM  .....
101M mutT .....
101 mutM  .....
127M mutM .....
127 mutM  .....
186M mutM .....
186 mutM  .....
199M mutM .....
199 mutM  .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutM  GMALRYTDPRRFGAMLWSLAPLEHELRLNLCPEPLTDAFAGQRLFELSRGRSMVAKPFIMDNVAVVGVGNINYASEALFAAGIDPRKPAGSISKARYLRLA
52M mutM  .....
52 mutM   .....
60M mutM  .....
60 mutM   .....
93M mutM  .....
93 mutM   .....
95M mutM  .....
95 mutM   .....
100M mutM .....
100 mutM  .....
101M mutT .....
101 mutM  .....
127M mutM .....
127 mutM  .....
186M mutM .....
186 mutM  .....
199M mutM .....
199 mutM  .....

210     220     230     240     250     260     270
PAO1 mutM  EEIKRILAIATAIERGGTTLRDFVGGDGGPGYFQOELFVYGRGGEFCKVCGSTLREIRLGRASVYCPRCQR*
52M mutM  .....*
52 mutM   .....*
60M mutM  .....*
60 mutM   .....*
93M mutM  .....*
93 mutM   .....*
95M mutM  .....*
95 mutM   .....*
100M mutM .....*
100 mutM  .....*
101M mutT .....*
101 mutM  .....*
127M mutM .....*
127 mutM  .....*
186M mutM .....*
186 mutM  .....*
199M mutM .....*
199 mutM  .....*

```


Anexo K: Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene *mutY* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1.

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutY  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
52M mutY  .....
52 muY    .....
60M muY   .....
60 mut Y  .....
93M mutY  .....
93 muY    .....
95M mutY  .....
95 mutY   .....
100M mutY .....
100 mutY  .....
101M mutY .....
101 mutY  .....
127M mutY .....
127 mutY  .....
186M mutY .....
186 mutY  .....
199M mutY .....
199 mutY  .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutY  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
52M mutY  AGEFPRDVEQLAELPGIGRSTAGATAASLSMGLRAPILDGNVSRVLRARYLAQDGYPGEPKVARALWEAAERFTPHARVNHYTQAMMDLGATLCTRSKPSCL
52 muY    .....
60M muY   .....
60 mut Y  .....
93M mutY  .....
93 muY    .....
95M mutY  .....
95 mutY   .....
100M mutY .....
100 mutY  .....
101M mutY .....
101 mutY  .....
127M mutY .....
127 mutY  .....
186M mutY .....
186 mutY  .....
199M mutY .....
199 mutY  .....

300          210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1 mutY  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
52M mutY  LCPLVSGCRAHLLGREADYPOPKRKALPQKRTLMPILANRDGAILLYRRPSSGLWGGLWSLPELDDLDGLEPLAARHSLALGERRELSGLTHTFSHFQL
52 muY    .....
60M muY   .....
60 mut Y  .....
93M mutY  .....
93 muY    .....
95M mutY  .....
95 mutY   .....
100M mutY .....
100 mutY  .....
101M mutY .....
101 mutY  .....
127M mutY .....
127 mutY  .....
186M mutY .....
186 mutY  .....
199M mutY .....
199 mutY  .....

```

| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PA01 mutY | A | T | E | P | W | L | V | A | E | G | A | P | R | A | V | A | E | G | D | W | L | W | Y | N | L | A | T | P | P | R | L | G | L | A | A | P | V | K | K | L | K | R | A | E | Q | E | L | G | R | G | T | A | A | * |
| 52M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 52 muY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60M muY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 mut Y |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 93M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 93 muY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 95M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 95 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 100M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 100 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 101M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 101 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 127M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 127 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 186M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 186 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 199M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 199 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Anexo K: Alinhamento da sequência de aminoácidos codificados pelo gene *mutY* de *P. aeruginosa* isolados de pacientes fibrocísticos comparados com sequência padrão da amostra PAO1.

```

100          10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1 mutY  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
52M mutY  .....
52 muY    .....
60M muY   .....
60 mut Y  .....
93M mutY  .....
93 muY    .....
95M mutY  .....
95 mutY   .....
100M mutY .....
100 mutY  .....
101M mutY .....
101 mutY  .....
127M mutY .....
127 mutY  .....
186M mutY .....
186 mutY  .....
199M mutY .....
199 mutY  .....

200          110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1 mutY  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
52M mutY  AGEFPRDVEQLAELPGIGRSTAGATAISLSMGLRAPILDGNVSRVLRARYLAQDGYPGEPKVARALWEAAERFTPHARVNHYTQAMMDLGATLCTRSKPSCL
52 muY    .....
60M muY   .....
60 mut Y  .....
93M mutY  .....
93 muY    .....
95M mutY  .....
95 mutY   .....
100M mutY .....
100 mutY  .....
101M mutY .....
101 mutY  .....
127M mutY .....
127 mutY  .....
186M mutY .....
186 mutY  .....
199M mutY .....
199 mutY  .....

300          210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1 mutY  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
52M mutY  LCPLVSGCRAHLLGREADYPOPKRKALPQKRTLMPILANRDGAILLYRRPSSGLWGGLWSLPELDDLDGLEPLAARHSLALGERRELSGLTHTFSHFQL
52 muY    .....
60M muY   .....
60 mut Y  .....
93M mutY  .....
93 muY    .....
95M mutY  .....
95 mutY   .....
100M mutY .....
100 mutY  .....
101M mutY .....
101 mutY  .....
127M mutY .....
127 mutY  .....
186M mutY .....
186 mutY  .....
199M mutY .....
199 mutY  .....

```

| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PA01 mutY | A | T | E | P | W | L | V | A | E | G | A | P | R | A | V | A | E | G | D | W | L | W | Y | N | L | A | T | P | P | R | L | G | L | A | A | P | V | K | K | L | K | R | A | E | Q | E | L | G | R | G | T | A | A | * |
| 52M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 52 muY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60M muY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 mut Y |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 93M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 93 muY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 95M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 95 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 100M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 100 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 101M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 101 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 127M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 127 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 186M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 186 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 199M mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 199 mutY |* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ERROR: syntaxerror
OFFENDING COMMAND: --nostringval--

STACK:

/Title
(
/Subject
(D:20091130165517)
/ModDate
(
/Keywords
(PDFCreator Version 0.8.0)
/Creator
(D:20091130165517)
/CreationDate
(MICROBIO)
/Author
-mark-