



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE PESQUISA LEÔNIDAS E MARIA DEANE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE SOCIEDADE E
ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E SIMILARIDADE
GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa*
PROVENIENTES DE EFLUENTES HOSPITALARES E ÁGUA
SUPERFICIAL DO IGARAPÉ DO MINDU/MANAUS - AM

MARY JOYCE TARGINO LOPES MAGALHÃES

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE PESQUISA LEÔNIDAS E MARIA DEANE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE SOCIEDADE E
ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

MARY JOYCE TARGINO LOPES MAGALHÃES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E SIMILARIDADE
GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa*
PROVENIENTES DE EFLUENTES HOSPITALARES E ÁGUA
SUPERFICIAL DO IGARAPÉ DO MINDU/MANAUS - AM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas em parceria com Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz Amazônia e Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, área de concentração Biologia dos agentes infecciosos e parasitários.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira

MANAUS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

M188c

Magalhães, Mary Joyce Targino Lopes.

Caracterização fenotípica e similiaridade genética de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de efluentes hospitalares e água superficial do igarapé do Mindu/Manaus-AM. / Mary Joyce Targino Lopes Magalhães. - Manaus: UFAM/FIOCRUZ/UFPA, 2013.

76 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) – UFAM/FIOCRUZ/UFPA, 2013.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira.

1. Microbiologia médica 2. *Pseudomonas aeruginosa* I. Título

CDU 579.61(811.3)(043.3)

MARY JOYCE TARGINO LOPES MAGALHÃES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E SIMILARIDADE
GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa*
PROVENIENTES DE EFLUENTES HOSPITALARES E ÁGUA
SUPERFICIAL DO IGARAPÉ DO MINDU/MANAUS - AM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas em parceria com Instituto Leônidas e Maria Deane–ILMD/Fiocruz Amazônia e Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, área de concentração Biologia dos agentes infecciosos e parasitários.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira
Instituto Leônidas e Maria Deane

Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Ormezinda Fernandes
Instituto Leônidas e Maria Deane

Dedico este trabalho:

Ao meu esposo, Gustavo Magalhães, por sua existência, por estar sempre ao meu lado, pelo companheirismo, respeito e incentivo, e por representar o motivo de minhas vitórias.

Aos meus filhos, Sofia Lara e Gustavo Filho, pela oportunidade de experimentar a forma mais pura de amar e por fazerem parte da felicidade que sinto pela vida.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar, mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma
gota”. (Madre Teresa de Calcuta)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e forças para alcançar mais essa vitória;

A minha mãe, Rita Targino, que sempre me incentivou a crescer como ser humano;

A minha orientadora, Dra Patrícia, pelos ensinamentos;

Ao meu esposo, Gustavo, pelo amor e compreensão e por não medir esforços em fazer todo o possível e impossível para que eu alcance meus objetivos de vida;

A todos os meus professores e coordenadores do curso de pós-graduação pela oportunidade;

Ao Dr. Paulo e ao Dr. André pelas imensas contribuições;

As secretárias, Rose, Elen e Renata pela competência e disponibilidade;

Aos técnicos de laboratório, Dona Juracir e Davi, por todo o apoio e dedicação;

Aos meus amigos, Vani, Carol Nobre, Edilene, Luciana, Leidiane, Marcelo, Louzamira, Viviane, Luciana, Elizete e Rose, pela força, amizade e companheirismo;

Em especial, aos meus grandes amigos, Paula Taquita, Andréia Santa Rita e Diogo que sempre estiveram por perto tanto nos momentos de alegria como nos momentos difíceis, me incentivando e ajudando para que eu tivesse êxito em meu estudo.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma das principais bactérias causadora de infecções hospitalares, e por possuir habitat comumente aquático apresenta-se como boa indicadora de contaminação de águas, para verificar se essa espécie bacteriana representa uma fonte de contaminação em potencial para o igarapé do Mindu, o estudo se propôs a analisar os seguintes objetivos: identificar isolados de *P. aeruginosa* em amostras de efluentes hospitalares e água superficial do igarapé do Mindu; verificar se as cepas encontradas apresentavam fatores de virulência como, mobilidade ligada ao flagelo, “twitching motility”, formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos, e avaliar a similaridade genética entre os isolados. **Metodologia:** Para a identificação microbiológica foram realizados testes bioquímicos e o sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados encontrados; Para a caracterização fenotípica foram realizados os seguintes testes: teste de mobilidade ligada ao flagelo, teste “twitching motility”, teste de formação de biofilme e perfil de resistência aos antimicrobianos pela técnica de disco-difusão; A similaridade genética entre os isolados de encontrados no estudo foi determinada por PFGE. **Resultados:** Foram identificados 17 isolados de *P. aeruginosa* em efluentes hospitalares e 8 isolados da mesma espécie na água superficial do igarapé do Mindu; Todas as cepas estudadas apresentaram mobilidade ligada ao flagelo; 100% das cepas encontradas na água do Mindu e 88% das cepas encontradas em amostras de efluentes hospitalares apresentaram “twitching motility” positivo; todos os 25 isolados estudados apresentaram formação de biofilme; mais de 70% das cepas encontradas nos efluentes hospitalares (brutos e tratados) apresentaram o fenótipo da multirresistência e 100% dos isolados de *P. aeruginosa* encontrados na água do Mindu apresentaram resistência à Ampicilina e 50% dessas cepas apresentaram resistência intermediária a Ceftriaxona; houve similaridade genética entre isolados encontrados em efluente hospitalar bruto e efluente hospitalar tratado, entre isolados encontrados em diferentes períodos sazonais e entre isolados encontrados em efluentes hospitalares e água superficial do Mindu. **Conclusão:** A presença de *P. aeruginosa* contendo fatores de virulência, em amostras de água superficial, é indicativo de disseminação de microrganismos de origem nosocomial no ambiente aquático estudado. Há fortes indícios de que o sistema de tratamento de efluentes do estudo não está sendo eficiente, já que foram encontradas cepas de *P. aeruginosa* contendo fatores de virulência, inclusive a multirresistência em amostras do efluente tratado; e foi observada alta similaridade genética entre isolados de *P. aeruginosa* oriundos de efluente bruto e efluente tratado. Por isso, se faz necessário maior fiscalização por parte dos órgãos de vigilância sanitária junto aos serviços de saúde para que sejam cumpridas as exigências das legislações vigentes a fim de preservar o meio ambiente e a saúde da população.

Palavras-Chave: Água Superficial; Antibiograma; Biofilme; Efluentes Hospitalares; Multirresistência; *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a leading bacterial cause of nosocomial infections. Possessing aquatic habitats, it presents a good indicator of water contamination. To verify that this bacterial species represents a potential source of contamination to the Mindu stream, we must carry out and analyze the following objectives: first, identify isolates of *P. aeruginosa* in samples of hospital effluent surface water obtained from the Mindu stream and second, to check whether the strains possess virulence factors as related mobility scourge, "twitching motility", biofilm formation and antimicrobial resistance, and finally, to assess the genetic similarity between isolates. Method: To identify the microbiological and biochemical composition, the 16S rRNA gene sequencing was used. For phenotype characterization we performed the following tests: first, we tested for mobility, using the scourge test "twitching motility", second we tested the biofilm formation and profile of antimicrobial resistance using the disk diffusion technique, the genetic similarity among isolates found was determined by PFGE. Results: We identified 17 isolates of *P. aeruginosa* in effluent water from the hospital. 8 isolates of the same species were in the surface water of the Mindu stream. The strains tested with mobility scourge; 100 % of the strains were found in water Mindu and 88 % of the strains were found in the hospital's effluent samples were positive for "twitching motility". All of the 25 isolates studied showed biofilm formation and more than 70 % of the strains found in hospital's effluent water (raw and treated) had the phenotype of multidrug resistance. 100 % of *P. aeruginosa* isolates found showed resistance to Ampicillin and 50 % of the strains were intermediately resistant to ceftriaxone. Among all the samples, there was genetic similarity; in the hospital's effluent water and the hospital's treated sewage, samples found in different seasonal periods, and among isolates found in hospital effluent and surface water of Mindu. Conclusion: The presence of *P. aeruginosa* containing virulence factors in surface water samples is indicative of the spread of nosocomial origin of microorganisms in the aquatic environment studied. There is strong evidence that the system of sewage treatment in the study is not efficient. Contaminants from *P. aeruginosa* containing multidrug resistance were in the samples of treated effluent water, and showed high genetic similarity among isolates of *P. aeruginosa* derived from raw wastewater. Therefore, it is necessary for action and more oversight on the part of health surveillance agencies with health services so that they meet the requirements of the laws in force in order to preserve the environment and people's health.

Keywords: Antibioqram; Biofilm; Effluent Hospital; Multidrug resistance; *Pseudomonas aeruginosa*; Surface Water.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificar o gene 16S rRNA	37
Tabela 2: Identificação molecular dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	42
Tabela 3: Diâmetro dos halos formados pelos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> visualizada por microscopia eletrônica.....	18
Figura 2: Fotografia em microscopia eletrônica de bactérias flageladas.....	21
Figura 3: Representação esquemática dos estágios do biofilme.....	25
Figura 4: Estação de tratamento de efluentes do HPS 28 de Agosto	29
Figura 5: Visão aérea do Igarapé do Mindu	29
Figura 6: Localização da Foz do Mindu.....	30
Figura 7: Pontos de coleta água superficial – HPS João Lúcio.....	31
Figura 8: Pontos de coleta água superficial – HPS 28 de Agosto	31
Figura 9: Garrafa Vandorn	31
Figura 10: Formação de biofilme em tubo falcon.....	34
Figura 11: Nascente do igarapé do Mindu.....	41
Figura 12: Amplificação do gene 16s rRNA.....	41
Figura 13: Aceitação dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> encontrados no estudo no Genbank..	43
Figura 14: Teste de mobilidade ligada ao flagelo.....	45
Figura 15: Imagens do teste Twitching Motility dos isolados do efluente hospitalar.....	46
Figura 16: Imagens do teste Twitching Motility dos isolados da água do Mindu	46
Figura 17: Formação de biofilme nos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	47
Figura 18: Perfil de resistência de <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos: Efluente hospitalar bruto.....	49
Figura 19: Teste de antibiograma em <i>P. aeruginosa</i> de efluente hospitalar bruto.....	49
Figura 20: Perfil de resistência de <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos: Efluente hospitalar tratado.....	50
Figura 21: Teste de antibiograma em <i>P. aeruginosa</i> de efluente hospitalar tratado	50

Figura 22: Perfil de resistência de <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos: Água superficial do Mindu	51
Figura 23: Teste de antibiograma em <i>P. aeruginosa</i> de água superficial.....	51
Figura 24: Dendograma do perfil de similaridade genética	54

LISTA DE SIGLAS

ISS - Infecções em serviços de saúde

CDC - Centro de controle de doenças

MIC – Concentração Inibitória Mínima

MBC – Concentração Bactericida Mínima

NaCl – Cloreto de Sódio

MBL - Isolados produtores de metalobetalactamase

OMP - Porinas de membrana externa

ETE – Estação de Tratamento de Efluentes

HPS – Hospital e Pronto Socorro

NCBI - BLAST do “National Center for Biotechnology Information”

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

NCCLS – National Commite for Clinical Laboratory Standards

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.2 Infecções em Serviço de Saúde.	19
3.3 Flagelo	20
3.4 Pili tipo IV	22
3.5 Biofilme	23
3.6 Resistência de <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Local de estudo 1: HPS 28 de Agosto	28
4.2 Local de estudo 2: Igarapé do Mindu	29
4.3 Transporte e armazenamento das amostras	31
4.4 Caracterização fenotípica de <i>P. aeruginosa</i>	32
4.4.1 Isolamento e identificação de <i>P. aeruginosa</i>	32
4.4.2 Teste de mobilidade ligada ao flagelo	33
4.4.3 Teste Twitching Motility	33
4.4.4 Teste de formação de biofilme	34
4.4.5 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	35
4.5 Caracterização genotípica de <i>P. aeruginosa</i>	36
4.5.1 Extração de DNA.....	36
4.5.2 Sequenciamento do gene 16s rRNA.....	37
4.5.3 Eletroforese em gel de campo pulsado	38
5 RESULTADOS	40
5.1 Identificação a nível de espécie	40
5.2 Teste de mobilidade ligada ao flagelo	43
5.3 Teste Twitching Motility	45
5.4 Teste de formação de biofilme	47
5.5 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	48

5.6 Similaridade genotípica dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	51
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	67
8 REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

O estudo que será apresentado partiu do pressuposto que as águas do igarapé do Mindu encontram-se contaminadas por bactérias patogênicas oriundas de efluentes hospitalares, já que a cidade de Manaus não possui programas eficientes de saneamento básico e, dessa forma, os rios (igarapés) que o cortam podem encontrar-se poluídos por receberem grande carga de resíduos sólidos, efluentes domésticos e hospitalares.

O Brasil possui 12% de toda a água do mundo, e 70% desse volume estão na Amazônia. A floresta Amazônica é drenada por uma notável rede de corpos d'água de variados tamanhos e estima-se que cada quilômetro quadrado da Amazônia Central contenha de 2 a 4 km de igarapés (riachos), o que torna essa rede hidrográfica a mais densa do mundo. Os elevados índices de chuvas na região (2 mil a 3,5 mil mm por ano) contribuem para a existência dessa teia de rios e riachos (CLETO FILHO, 2005).

Uma característica marcante da região Norte é possuir rios que geralmente margeiam ou cortam a maioria das cidades e povoados, dessa forma, a incidência de povoados ou comunidades “ribeirinhas” é alta, mesmo em áreas consideradas totalmente urbanas. Esses rios, muitas vezes, servem como ambiente de recreação e/ou fonte de captação de água para abastecimento da população, como também alvo preferencial para o despejo de resíduos, inclusive dejetos hospitalares.

A contaminação das águas por efluentes hospitalares é um problema de saúde pública de extrema importância no Brasil. Estudos têm demonstrado que esses efluentes apresentam níveis elevados de bactérias entéricas, metais pesados, desinfetantes e antibióticos, por esse motivo, quando não tratados, caracterizam-se como possíveis veículos de disseminação de inúmeros microrganismos patogênicos e importantes contaminantes de águas superficiais e subterrâneas, podendo representar sério risco à população, principalmente se atingirem o

sistema de abastecimento de água do município (FUENTEFRIA *et al*, 2008; VECCHIA *et al*, 2009).

A *Pseudomonas aeruginosa* foi o microrganismo escolhido nesse projeto por ser considerada boa indicadora de contaminação de águas, pois possui habitat comumente aquático, é capaz de sobreviver por longos períodos de tempo na natureza e formar rotas de disseminação de genes de virulência (VALLET, 2003). No ambiente hospitalar essa bactéria, juntamente com *Estafilococos aureus*, são as principais causadoras de infecção hospitalar (SCHEFFER *et al*, 2010), e é amplamente pesquisada por possuir grande facilidade para adquirir resistência aos antimicrobianos (SAMPAIO, 2008).

Nesse sentido, o estudo foi importante por investigar a presença de *Pseudomonas aeruginosa* como fonte de contaminação em potencial para o igarapé do Mindu, já que essa bactéria pode exercer forte pressão seletiva nesse manancial que é de fundamental importância para a hidrografia do município por possuir 21 km de extensão na área urbana de Manaus (Cavalcante, 2003). Este trabalho foi importante também, pois serviu de alerta para os órgãos de vigilância sanitária do Estado quanto ao problema da contaminação dos rios por efluentes hospitalares não tratados e contribuir para a elaboração de programas de saneamento básico que visem à obrigatoriedade da implantação de eficientes sistemas de tratamento de efluentes em todos os serviços de saúde.

O trabalho se adequa ao programa de pós-graduação em saúde, sociedade e endemias da Amazônia porque o tema abordado é de extrema importância para a melhoria da qualidade de vida das pessoas, tendo como foco principal a preocupação com a qualidade da água do igarapé do Mindu e a saúde da população.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

- Caracterizar o fenótipo e verificar a similaridade genética de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados em efluentes hospitalares e água superficial do igarapé do Mindu.

2.2 Específicos

- Detectar a presença de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em efluentes brutos e tratados do Hospital e Prontos Socorro 28 de Agosto e em água superficial do igarapé do Mindu;
- Verificar se os isolados bacterianos apresentam os fatores de virulência típicos da *Pseudomonas aeruginosa*;
- Determinar o perfil de resistência dos isolados bacterianos;
- Avaliar a similaridade genética entre os isolados encontrados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1- *Pseudomonas aeruginosa*

A família Pseudomonadaceae é formada por diversos gêneros, dentre eles, o *Pseudomonas* sp. que atualmente é formado por espécies fluorescentes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*) e não fluorescentes (*Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas alcaligenes*) (HARRIS *et al*, 2002). Esses microrganismos são de vida livre e se apresentam como bacilos Gram-negativos, retos ou curvos, com aproximadamente 0,5 a 0,8µm de comprimento e 1,5 a 3,0µm de largura, móveis, apresentando flagelos polares que produzem antígenos termo-lábeis, estritamente aeróbios, ubiqüitários, hidrofílicos, não formadores de esporos, utilizam glicose e outros carboidratos pela via oxidativa e para o seu metabolismo utilizam um grande número de compostos orgânicos (PALLERONI, 1984; YAMAMOTO *et al*, 2000).

Dentro do gênero *Pseudomonas* sp. a espécie que tem emergido nas últimas décadas como a mais importante a nível hospitalar é a *Pseudomonas aeruginosa* por ser responsável por um número significativo de infecções notáveis, incluindo as oculares, auditivas, cutâneas, urogenitais, pulmonares e bacteremias do sangue e também por apresentar grande facilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos (BERTAND *et al*, 2011).

A maioria das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produz um ou mais pigmentos, os quais retardam o crescimento de outras bactérias facilitando sua colonização. Os quatro pigmentos mais conhecidos são: piocianina (azul), piomelanina (marrom), pioverdina (verde) e piorrubina (vermelho), porém o mais encontrado nos isolados clínicos é a piocianina, por esse motivo, a *Pseudomonas aeruginosa* é conhecida como o bacilo piociânico, do grego puon: pus e kuanos: azul escuro (VALLET, 2003).

Outras características importantes encontradas nas cepas de *P. aeruginosa* é a emissão de odor de fruta adocicado e a formação de colônias com diversos aspectos morfológicos, podendo ser diminutas ou até planas, difusas ou mucoides, com bordas serradas e brilho metálico (GILLARDI, 1980; SILVA, 1999).

Pseudomonas aeruginosa são bactérias não fermentadoras, ou seja, obtém sua energia pelos processos oxidativos de carboidratos ao invés de fermentação; apresentam como características para a sua identificação: oxidase positiva, β -hemólise em agar sangue, motilidade positiva; crescem em temperaturas que variam de 5°C a 42°C, sendo 37° C a temperatura ideal; reduzem nitrato a nitrito; são lisina descarboxilase negativo; acetamida positivo; malonato positivo; citrato positivo; indol negativo e são incapazes de oxidar maltose e lactose (RESENDE, 2009).

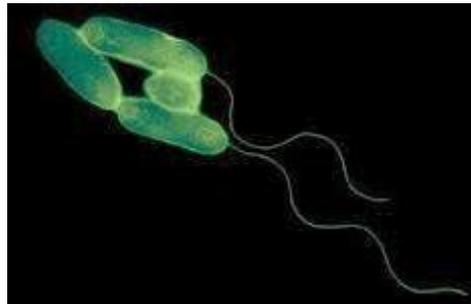


Figura 1: *Pseudomonas aeruginosa* visualizada por microscopia eletrônica (www.visualphotos.com).

Esse microrganismo sobrevive facilmente no ambiente, e seu reservatório natural é representado por solos, plantas e águas, especialmente água do mar, água doce ou residuária. Muitos estudos atribuem um papel importante da água sobre a incidência de colonização de seres humanos por *Pseudomonas aeruginosa*. Nos Estados Unidos, 1.400 mortes são estimadas por ano causadas por infecções de contaminação através da água por *Pseudomonas aeruginosa* (WEBB *et al*, 2004). Em Tehran, EUA, foram analisadas 11 piscinas no leste e nordeste da cidade, onde 81% dos microrganismos isolados eram *P. aeruginosa* e 18,2% eram bactérias do grupo coliformes (HAJJARTABAR, 2004).

No Brasil, estudo realizado por Coelho *et al* (2010) para avaliar a qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife-PE mostrou que das 10 marcas de água mineral pesquisadas, todas continham pelo menos uma amostra contaminada por *Pseudomonas aeruginosa*, o que as caracterizavam como impróprias para o consumo humano.

3.2- Infecções em serviços de saúde (ISS)

O centro de controle de doenças (CDC) define ISS como infecções causadas por variedade de bactérias comuns e incomuns, fungos e vírus durante os cuidados hospitalares (BARROS *et al*, 2012). Essas infecções podem ser adquiridas após 72 horas de internação do paciente ou mesmo após a alta, até 30 dias, quando puder ser relacionada com a hospitalização (SOUSA *et al*, 2009).

As infecções hospitalares são consideradas um problema de saúde pública de grande importância para a sociedade por acometer mais de 15% dos pacientes internados (BARROS *et al*, 2012; OLIVEIRA *et al*, 2010), aumentar em 3 vezes o custo com tratamento e diagnóstico de pacientes infectados (BARROS *et al*, 2012) e contribuir com a taxa de mortalidade que varia entre 10 a 80% (LIMA *et al*, 2007; PAULA, 2008). As condições nutricionais do paciente, o debilitamento do sistema imunológico, o tempo de internação, o uso prévio de antimicrobianos, a doença de base, dentre outros fatores contribuem para esse prognóstico (LIMA *et al*, 2007).

Não é comum a colonização de indivíduos saudáveis por *Pseudomonas aeruginosa*, com apenas 2-4% de portadores. No entanto, em pacientes hospitalizados, a taxa pode chegar a 50% ou 60% (BERTRAND *et al*, 2011). É por esse motivo, que esse patógeno é considerado oportunista e responsável por grande parte das infecções hospitalares em todo o mundo.

No ambiente hospitalar, uma das principais formas de disseminação e contaminação, por essa bactéria, se faz por aparelhos de respiração e nebulização, cateteres, endoscópios e equipamentos de diálise (VALLET, 2003). Alguns estudos mostram que artigos pessoais de médicos e pessoal de enfermagem também podem ser considerados potenciais reservatório e vetores de *P. aeruginosa*. MOOLENAAR *et al*, 2000 descreveram um foco de *P. aeruginosa* ligado a unhas artificiais e MCNEIL SA *et al*, 2001 relataram um foco ligado à colonização crônica de uma enfermeira.

A frequência das infecções causadas por materiais hospitalares e artigos pessoais contaminados varia consideravelmente entre os serviços de saúde. As diferenças entre os serviços podem ser explicadas pelo modo como é realizado os procedimentos de desinfecção e esterelização de materiais e equipamentos, por uso inadequado de antimicrobianos, pelos modos gerais de higienização dos profissionais de saúde e por diferenças no modo de admissões de pacientes (BARROS, 2012; BERTRAND *et al*, 2011).

Alguns fatores de virulência são de fundamental importância para promover a patogenicidade da bactéria *P. aeruginosa* podendo ser destacados os envolvidos na adesão, invasão, citotoxicidade e resistência à morte intracelular. Podemos citar como principais fatores de virulência, a presença de flagelo funcional, e Pili tipo IV, a formação de biofilme, e a resistência aos antimicrobianos (MATTICK, 2002).

3.3 Flagelo

P. aeruginosa possui um ou mais flagelos polares, constituídos de uma única subunidade protéica, a flagelina, produto do gene *fliC*. Os flagelos permitem a mobilidade da bactéria sob a forma de *swimming* (permite à bactéria se locomover em um meio aquoso) e *swarming* (concebe o movimento da bactéria sobre uma superfície semi-sólida) (RASHID & KORNEBERG, 2000).

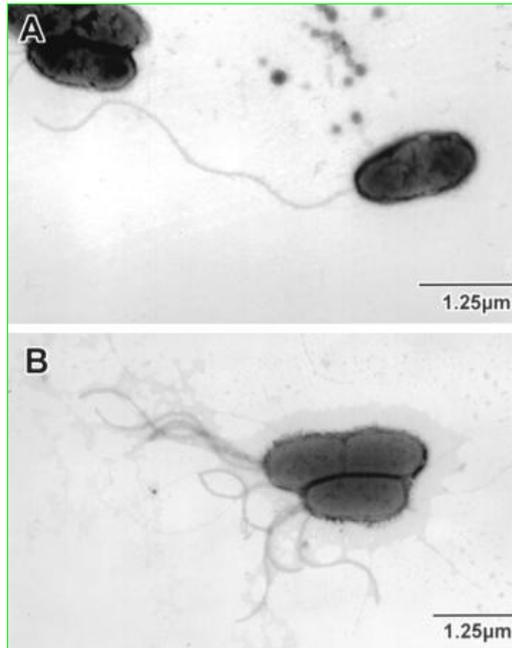


Figura2: Fotografia em microscopia eletrônica de bactérias flageladas (A e B) *P. aeruginosa* com um e mais flagelos polares respectivamente (DASGUPTA *et al*, 2000).

Estudos anteriores mostraram que o flagelo quando presente na estrutura da *P. aeruginosa* implica uma notável aderência dessa bactéria às células epiteliais respiratórias (FELDMAN *et al*, 1998) e que cepas não flageladas têm sua virulência atenuada (MONTIE *et al*, 1982). Desse modo, podemos observar a importância do flagelo na patogenicidade da bactéria em estudo.

O flagelo é de fundamental importância no estado precoce do desenvolvimento do biofilme bacteriano, estado fisiológico crucial na sobrevivência do patógeno, quando este se encontra no hospedeiro (O' TOOLE E KOLTER, 1998-A). Porém, a ausência do flagelo apesar de retardar a formação do biofilme, não afeta a estrutura do mesmo (SAUER *et al*, 2002).

3.4 Pili tipo IV

Pseudomonas aeruginosa possui dois tipos de pilis, os pilis polares, que vão de dois a doze por polo e os pilis não polares. Os pilis polares são estruturas filamentosas constituídas

de um empilhamento regular de uma única proteína, a pilina, produto do gene pilA (SASTRY *et al*, 1985). Os pilis polares encontrados nessa espécie pertencem à classe do tipo IV que é um importante fator de virulência nos primeiros estágios da infecção crônica, pois como o flagelo, estão implicados na adesão do patógeno às células epiteliais pulmonares do paciente e na formação do biofilme bacteriano (OTTOW, 1975; SANTOS, 2005).

Uma das formas de movimento bacteriano que a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta é conhecida como “Twitching Motility” o qual permite a bactéria mover-se rapidamente em uma superfície através de movimentos ondulatórios sem a presença de flagelo, porém totalmente dependente do pili tipo IV (CONRAD, 2012).

Esse tipo de movimento bacteriano foi proposto por BRADLEY, 1980 ao observar bactérias da espécie *P. aeruginosa* se propagarem em superfícies variadas, independentemente da presença de um flagelo. Ele observou ainda que para ser possível a bactéria mover-se dessa forma era necessário que a mesma apresentasse em sua composição pilis polares.

De acordo com Mattick (2002), o “Twitching Motility” pode ocorrer em superfícies orgânicas como as células epiteliais já mencionadas anteriormente, como também em superfícies inorgânicas como plásticos, vidros, aço inoxidável (BURROWS, 2012) e gel ágar. Esse tipo de movimento parece ser um meio adquirido pelas *P. aeruginosa* para fugir de um ambiente inadequado, quando necessário, ou para propagar-se em ambientes contendo baixa quantidade de água e/ou colonizar superfícies hidratadas ao invés de viver livre em fluídos.

A distância percorrida através do “Twitching Motility” depende de fatores extrínsecos e intrínsecos. Os fatores extrínsecos incluem tipo de nutrientes, viscosidade e hidrofobicidade e os fatores intrínsecos incluem a quantidade de pili produzido e suas taxas de retração e a produção de tensão superficial (BURROWS, 2012).

3.5 Biofilme

Em 1985, Costerton e colaboradores lançaram a teoria dos biofilmes, explicando os mecanismos pelos quais os organismos se aderem a materiais vivos e inanimados, bem como os benefícios que resultam deste nicho ecológico que denominaram Slime. O biofilme, formado por *Pseudomonas aeruginosa*, possui aspecto gelatinoso (CHAVES, 2004), é constituído por micro colônias hidrófilas rodeadas por polissacarídeos produzidos pela bactéria, e a água presente internamente é o constituinte predominante desse fator de virulência. As bactérias contidas na matriz do biofilme estão submetidas a um ambiente anaeróbico, porém os canais cheios de água contêm oxigênio dissolvido (HOIBY *et al*, 2001).

Hoiby e colaboradores (2001) descreveram em seu estudo a importância do biofilme para a patogenia das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, já que representa um mecanismo de sobrevivência para as bactérias por impedir a entrada de produtos químicos como antibióticos e dessa forma aumentar significativamente a resistência aos antimicrobianos. Nesse estudo, também foi observado que bactérias contidas em biofilmes “antigos” (7 dias de formação) são mais resistentes aos antimicrobianos que os biofilmes recém formados (2 dias), com valores do MIC e MBC compreendidos entre 100 a 1000 vezes maior em biofilmes antigos.

O biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* é comumente encontrado em materiais pobres em nutrientes como: tubulações da rede de distribuição de água potável, chuveiros, bebedouros, pias, equipamentos de ar condicionado, etc. Assim o microrganismo pode produzir limo e crescer bem protegido (OLIVEIRA *et al*, 2008; TRAUTMANN *et al*, 2001).

Os biofilmes são pouco espessos (VAN DER WENDE e CHARACKLIS, 1990), variando entre 13 a 60nm de espessura (HOIBY *et al*, 2001) e por esse motivo, não cobrem completamente a superfície. Podem ser constituídos de microrganismos patogênicos (WALKER *et al*, 1995), promover biocorrosão das tubulações, consumir o cloro residual da

água potável, produzir metabólitos que geram sabor e odor desagradáveis na água e contaminar a água quando houver desprendimento de porções de biofilme (CHAVES, 2004).

Estudos anteriores afirmam que para a formação do biofilme bacteriano são necessárias 5 etapas diferentes: 1) adesão inicial das bactérias, 2) adesão irreversível, 3) estado de maturação-1, 4) estado de maturação-2 e 5) mudança da estrutura do biofilme (SAUER, 2002; HOIBY, 2001).

Na primeira etapa as bactérias planctônicas começam a crescer em uma superfície sólida contendo líquido; em seguida, algumas bactérias conseguem aderir-se à superfície de maneira transitória. Esta adesão é reversível durante as primeiras horas.

Na segunda etapa a adesão torna-se irreversível devido à formação de grupos de células bacterianas, as quais se fixam a superfície não somente pelos polos, mas também há uma aglomeração uma ao lado da outra. Nessa etapa, as bactérias não se encontram mais móveis e todos os agrupamentos bacterianos formados ficam aderidos ao substrato.

A terceira etapa denominada estado de maturação-1 é caracterizada pelo crescimento dos grupos celulares, os quais são responsáveis pela formação das micro colônias. Nessa etapa, são importantes não somente as interações entre as células e a superfície, mas também as interações entre células e células. Alguns genes bacterianos são ativados pela alteração das condições ambientais, como por exemplo, falta de nutrientes, privação de nitrogênio, aumento da concentração de NaCl e desidratação.

No quarto estágio da formação do biofilme que é chamado de maturação-2, o crescimento das micro colônias atingem seu tamanho máximo e a maior parte das bactérias agora estão instaladas no meio dessas micro colônias as quais estão rodeadas por uma matriz de exopolissacarídeos.

No quinto e último estágio, a estrutura do biofilme pode alterar-se devido à dispersão de células bacterianas contidas no interior das micro colônias. Como o biofilme já formado é

constituído de várias camadas de células, a superfície irregular cria turbulência, e com isso certas bactérias ou placas bacterianas desprendem-se das micro colônias, tornam-se móveis, escapam do biofilme e vão colonizar novas superfícies por meio de um fluxo líquido.

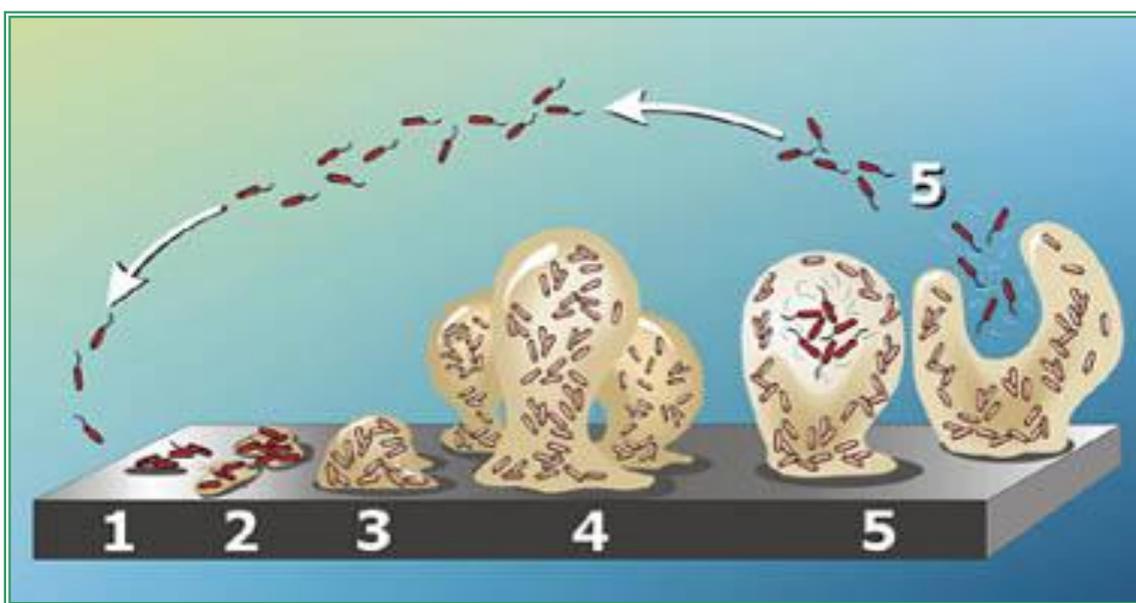


Figura 3: Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento de um biofilme formado por *P. aeruginosa*: Estágio (1) adesão inicial; Estágio (2) adesão irreversível; Estágio (3); maturação-1; Estágio (4) maturação-2; Estágio (5) dispersão do biofilme (STOODLEY *et al*, 2002 e SAUER *et al*, 2002).

3.6 Resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos

A resistência microbiológica é um problema de saúde pública descrito em todo o mundo e está intimamente relacionada à morbidade, mortalidade e elevação dos custos durante a assistência. Alguns fatores de risco favorecem o desenvolvimento de resistência bacteriana, por exemplo: uso indiscriminado de antimicrobianos; higienização e desinfecção inadequada nos serviços de saúde; ausência de técnica asséptica pelos profissionais de saúde; e mutação genética das bactérias (CARVALHO & GONTIJO FILHO, 2008).

Os antimicrobianos devem ser utilizados com cautela na terapêutica hospitalar e alguns fatores devem ser levados em consideração no ato da prescrição, a fim de prevenir a resistência dos patógenos. Podemos citar como fatores prioritários para uma boa prescrição

médica, o tempo de hospitalização, a gravidade da doença, a eficácia da droga, o uso prévio de antibióticos, o padrão de resistência dos microrganismos intra-hospitalares e custos (PAULA, 2008; CEZÁRIO *et al*, 2009).

Como a bactéria *P. aeruginosa* é uma das principais causadoras de infecção hospitalar em todo o mundo, a identificação de cepas multiresistentes dessa espécie é uma urgência clínica e epidemiológica. A resistência da *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos pode ocorrer por vários mecanismos, entre eles podemos citar, a produção de metalobetalactamase (MBL), perda de porinas, metilase do 16S rRNA, e superexpressão de bombas de efluxo (NEVES, 2011).

A partir de 2002, isolados produtores de metalobetalactamase (MBL) começaram a ser descritos no Brasil. Essas enzimas agem modificando quimicamente a estrutura do antibiótico, antes que este se ligue a seu alvo (subunidades do ribossomo) e dessa forma, degradam a maioria dos antibióticos betalactâmicos, incluindo aqueles associados a inibidores de betalactamases, como tazobactam, clavulanato e sulbactam (GALES, 2003; SADER, 2005).

A entrada de substâncias em bactérias gram-negativas é controlada por proteínas, denominadas de Porinas de Membrana Externa (OMP), capazes de formar canais constituídos de água em seu interior as quais permitem a difusão passiva de solutos hidrofílicos, como os antimicrobianos, pela membrana externa das bactérias (NIKAIDO, 1994).

Estudos anteriores afirmam que a ausência ou mesmo a expressão reduzida de genes codificadores dessas porinas, tem contribuído para a resistência aos betalactâmicos e carbapenêmicos que são atualmente os principais grupos de antimicrobianos utilizados na terapêutica de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (HUANG, 1996; LIVERMORE, 2002).

Para adquirir resistência aos antibióticos aminoglicosídeos, a *P. aeruginosa* utiliza como mecanismo a produção de metilase 16S rRNA. Esse mecanismo ocorre por intermédio de enzimas conhecidas como metilases 16S rRNA as quais agem conferindo a metilação sitio-específica do RNA ribossômico 16S e desse modo conseguem modificar quimicamente a estrutura do antibiótico, antes que este se ligue ao seu alvo (YAMANE, 2007).

Outro mecanismo desenvolvido pela bactéria *P. aeruginosa* com a finalidade de adquirir multiresistência é a superexpressão de bombas de efluxo. Esse mecanismo tem como função expulsar moléculas tóxicas para o exterior das células bacterianas e é mediado por um transporte ativo (LI E NIKAIIDO, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados, no estudo, isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de amostras de efluentes brutos e tratados do Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto e de água superficial do Igarapé do Mindu coletadas nos meses de fevereiro (período chuvoso) e julho (período não chuvoso) do ano 2012.

4.1 Local de Estudo 1: ETE do HPS 28 de Agosto

O Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto, localizado na zona centro-sul da cidade de Manaus, proporciona assistência à saúde em urgência e emergência e atendimento terciário às vítimas de trauma. Possui um total de 378 leitos distribuídos em sete pavimentos, totalizando 10 mil metros de área construída e de acordo com dados estatísticos, realiza cerca de 35.000 atendimentos mensais.

A estação de tratamento de efluentes (ETE) pertencente a essa instituição (Figura 4) realiza o tratamento classificado como terciário, ou seja, além de remover sólidos suspensos e dissolvidos, matéria orgânica e nutrientes, também consegue remover microrganismos patogênicos a partir da degradação do esgoto por bactérias anaeróbicas (que não necessitam de oxigênio para sobreviverem). Essa estação de tratamento tem capacidade para tratar 120mil litros de esgoto por dia, os quais são, posteriormente, lançados no Igarapé do Mindu.

No estudo atual, foram analisadas, em cada coleta, 6 amostras de efluentes hospitalares, sendo 3 amostras coletadas antes do esgoto passar pelo sistema de tratamento (efluente bruto) e as outras 3 amostras coletadas após o sistema de tratamento de esgotos (efluente tratado).



Figura 4: Vista Panorâmica da Estação de Tratamento de Efluentes do HPS 28 de Agosto

4.2 Local de Estudo 2: Igarapé do Mindu

O igarapé do Mindu é o mais expressivo corpo d'água de Manaus por percorrer a cidade de Leste a Oeste, perfazendo um total de aproximadamente 21 km de extensão na área urbana (Figura 5). Sua nascente (Figura 11) está localizada, em uma área de floresta primária de terra firme no setor leste da cidade, no bairro Cidade de Deus, próximo à Reserva Florestal Adolpho Ducke, e sua foz (Figura 6) está localizada nas proximidades da ponte do parque dos Bilhares no bairro Nossa Senhora das Graças (CAVALCANTE, 2003).

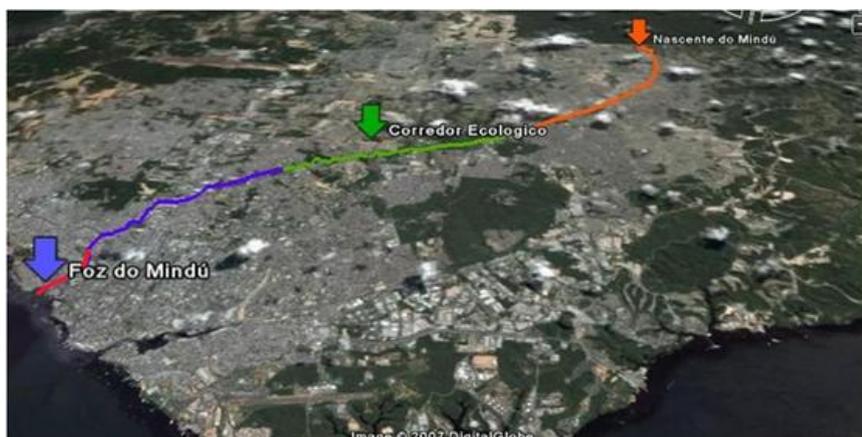


Figura 5: Visão aérea do Igarapé do Mindu (Zona leste a Oeste da Cidade de Manaus)

O encontro do igarapé do Mindu com o igarapé dos Franceses forma o igarapé da Cachoeira Grande (Figura 6) que deságua no igarapé do São Raimundo. Por esse motivo, o igarapé do Mindu está inserido na Bacia do São Raimundo (CAVALCANTE, 2007).



Figura 6: Localização da Foz do Mindu

O Rio Negro constitui o escoadouro final dos cursos de água que atravessam a cidade e o regime hidrológico desse rio apresenta dois períodos: o de cheia, de janeiro a junho, época chuvosa, com grande volume de água; e o de seca, de julho a dezembro, com pouca chuva e pequeno volume de água (CAVALCANTE, 2007).

As amostras de água superficial do Igarapé do Mindu foram coletadas em pontos estratégicos ao longo do curso d'água, começando da nascente (Figura 11), passando próximo a 2 grandes pontos socorros da cidade, terminando na foz (Figura 6). As amostras entre a nascente e a foz do Mindu foram coletadas à montante (antes) e à jusante (após) do HPS João Lúcio (Figura 7), à montante (antes) e à jusante (após) do HPS 28 de Agosto (Figura 8). Todas as amostras de água superficial do Mindu foram coletadas em triplicata, totalizando 18 amostras por coleta.



Figura 7: Localização dos pontos de coleta de água superficial do Mindu situados próximos ao HPS João Lúcio



Figura 8: Localização dos 2 pontos de coleta de água superficial do Mindu situados próximos ao HPS 28 de Agosto

4.3 Transporte e Armazenamento das Amostras

As amostras de efluentes (brutos e tratados) do HPS 28 de Agosto e de água superficial do igarapé do Mindu foram coletadas em garrafas tipo VanDorn (Figura 9), armazenadas em frascos estéreis com tampas à prova de vazamento e de material de vidro (capacidade para 250mL) e transportadas sob refrigeração (4-10°C) com intervalo entre a coleta e o início das análises de no máximo seis horas (NEUSELY *et al*, 2010). Todas as amostras de água superficial e efluentes hospitalares foram coletadas no mesmo dia para que os microrganismos encontrados estivessem nas mesmas condições climáticas.



Figura 9: Garrafa VanDorn utilizada na coleta das amostras de água e efluentes hospitalares

4.4 Caracterização Fenotípica de *Pseudomonas aeruginosa*

Técnicas fenotípicas são definidas como técnicas que analisam as características expressas pelos microrganismos, ou seja, resultam da expressão de genes que podem sofrer variações de acordo com o meio ambiente. Essas técnicas são baseadas em mudanças nas condições de crescimento, fase de crescimento e mutações espontâneas (LIPUMA, 1998; TENOVER *et al*, 1995).

As análises fenotípicas empregadas, no atual estudo, para caracterizar os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram, identificação a nível de espécie, mobilidade ligada ao flagelo, “Twitching Motility”, formação de biofilme e perfil de resistência aos antimicrobianos. Todas as análises laboratoriais, empregadas no trabalho, foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz Amazônia.

4.4.1 Isolamento e Identificação de *P. aeruginosa*

A determinação de *P. aeruginosa* em água superficial e efluentes hospitalares foi realizada pela técnica de membrana filtrante, a qual se baseia na filtração de 100mL da amostra por meio de um filtro contendo uma membrana de celulose com poros de 0,22µm. As bactérias cujas dimensões foram maiores que os poros, ficaram retidas na membrana e então transferidas para tubos contendo 3mL de caldo Luria Bertain Broth (LB) e incubadas à 37°C por 24h para crescimento bacteriano (NEUSELY *et al*, 2010).

Após o crescimento bacteriano, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura para isolamento de *Pseudomonas* com Agar (PIA) que é um meio seletivo e diferencial para bactérias do gênero *Pseudomonas*, em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após o crescimento em placas, foram selecionadas colônias

bacterianas que apresentaram brilho metálico, bordas irregulares, odor característico de frutas adocicadas como a uva e pigmentos como piocianina e pioverdina que são características típicas da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (TRABULSI e ALTHERTUN, 2004).

Para identificação, por metodologia clássica, os isolados selecionados foram submetidos à coloração de Gram e provas bioquímicas convencionais, como oxidase, motilidade, produção de H₂S e crescimento em caldo simples a 42°C. Para a análise dos testes bioquímicos foi utilizada a tabela de leitura descrita pela Probac do Brasil.

4.4.2 Teste de Mobilidade Ligada ao Flagelo

Este teste permite determinar a mobilidade de uma cepa, ligada à presença de um flagelo funcional. Para a realização desse teste, as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram inoculadas (com o auxílio de palitos de dentes autoclavados) em meio LB a 0,3% de ágar em placas de petri e incubadas a 37°C “Overnight”. Após o tempo de incubação, as colônias isoladas que apresentaram o flagelo funcional obtiveram halos característicos (visíveis a olho nu) em torno das colônias bacterianas (Figura 14).

4.4.3 Teste “Twitching Motility”

A partir desse teste foi possível observar quais as cepas de *P. aeruginosa* possuíam o pili do tipo IV funcional. Para esse teste, as cepas foram inoculadas (com o auxílio de palitos de dentes autoclavados) em placas de petri contendo meio LB 1% de ágar e em seguida incubadas a 37°C por 48h. Após o tempo de incubação, as colônias bacterianas foram submetidas à análise microscópica e visualizadas na objetivas de 40 (Figura 15).

4.4.4 Teste de Formação de Biofilme

A formação do biofilme foi analisada pela habilidade das células bacterianas aderirem em PVC (tubo falcon de 15mL) de acordo com o protocolo previamente descrito por O'Toole *et al* (1998). Em cada tubo falcon foi adicionado 2mL de meio de cultura enriquecido (LB) e 100µl de amostra contendo *P. aeruginosa*. Em seguida, os tubos falcon foram submetidos à incubação na estufa à 30°C por 24h. Após o crescimento bacteriano, acrescentou-se 40 µl de cristal violeta em cada tubo falcon, os quais ficaram por 30 minutos à temperatura ambiente. A formação do biofilme foi observada nas amostras em que o cristal violeta formou um halo azul onde as bactérias formadoras de biofilme encontravam-se (Figura 10). Como controle positivo foi utilizado a cepa padrão DH5- α , e como controle negativo foi utilizado a cepa PAOI.

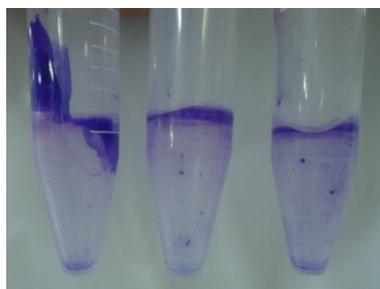


Figura 10: Formação de biofilme em tubo falcon

Para quantificar a formação de biofilme nos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, a densidade óptica (DO) das células aderidas foi dosada por espectrofotometria de massa à 600nm. As amostras de *P. aeruginosa* consideradas formadoras de biofilme foram aquelas que apresentaram absorvância acima da média aritmética obtida pelo controle positivo e o controle negativo.

4.4.5 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco-difusão (Figuras 18, 20 e 22) de acordo com as normas do Instituto laboratorial de normas clínica (CLSI, 2009), com discos comerciais (Oxoid) de 14 antibióticos diferentes incluídos nos seguintes grupos farmacológicos: Penicilinas antipseudomonas (Piperacilina associado ao Tazobactam - 100/10µg); Aminopenicilinas (Ampicilina-10µg); Monobactams (Aztreonam-30µg); Quinolonas (Norfloxacino-10µg, Levofloxacino-5µg, Ciprofloxacino-5µg); Cefalosponinas de terceira geração (Ceftriaxona-30µg, Ceftazidima-30µg), Cefalosponinas de quarta geração (Cefepime-30µg); Aminoglicosídeos (Amicacina-30µg, Gentamicina-10µg); Carbapenêmicos (Imipenem-10µg, Meropenem-10µg) e grupo das Polimixinas (Polimixina B-300UI). Estes antibióticos foram escolhidos por serem os mais utilizados para o controle de infecções causadas por *P. aeruginosa* nos hospitais e prontos socorros da cidade de Manaus.

Para a realização desse teste, colônias de *Pseudomonas aeruginosa* foram transferidas para um tubo contendo 3mL de caldo LB e incubadas à 37°C por cerca de 2 a 6 horas até alcançar a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) (ANVISA, 2004).

Após o período de incubação, as suspensões bacterianas foram transferidas para placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (AMH) e, com o auxílio de uma pinça estéril, foram adicionados discos impregnados com antibióticos. Ao término do experimento, as placas contendo as amostras bacterianas e discos de antibióticos foram submetidos à incubação a 35°C por 24 horas. Decorrido esse período, foram adicionados 10 ml de cloridato de trifetil tetrazólio (CTT) na superfície de cada placa para a leitura dos halos de inibição formados em torno dos antibióticos testados.

Os resultados foram expressos da seguinte forma: sensível (S) para os isolados que apresentaram sensibilidade aos antibióticos testados; intermediário (I) para os isolados que apresentaram resistência intermediária; e resistente (R) para os isolados que apresentaram resistência aos antibióticos testados. Para analisar os resultados, a leitura do teste foi comparada com a tabela padrão, segundo as recomendações do CLSI (2009).

4.5 Caracterização Genotípica de *Pseudomonas aeruginosa*

A confirmação dos resultados obtidos na identificação, por metodologia clássica, dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada a partir da extração do DNA e do sequenciamento do gene 16S de cada bactéria. Já a análise de similaridade genética, entre os isolados encontrados no estudo, foi feita pelo método de Biologia Molecular conhecido como Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

4.5.1 Extração do DNA

As culturas contendo *P. aeruginosa* foram transferidas para tubos contendo 3 mL de meio LB líquido e incubadas à 37°C por 24h para crescimento bacteriano. Em seguida, o crescido bacteriano foi transferido para um microtubo contendo 500µL de H₂O MilliQ autoclavada e ressuspensão vigorosamente em homogeneizador (tipo vórtex – Daigger Vortex Genie 2). A suspensão foi centrifugada em mini centrífuga (miniSpin-Eppendorf) a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 200µL de H₂O ultrapura. A suspensão foi fervida a 100°C por 10 minutos em banho seco (Dry Bath), e depois submetida à temperatura de -4°C para realização do choque térmico. Centrifugou-se novamente por mais 10 minutos, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e iniciou-se o processo de limpeza do DNA com etanol 70%. O pellet foi ressuspendido em TE (Tris-

EDTA) e congelado a -20°C em freezer, de acordo com método de Otsuki (1997) com algumas modificações.

4.5.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA

O gene 16S é universal, sensível e muito utilizado em estudos filogenéticos. Para o isolamento desse gene foram utilizados: 40 ng de DNA, 5,0 mM de tampão 10X (Invitrogen), 0,25 mM de dNTPs (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 10 mM de cada primer (Invitrogen), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água deionizada esterilizada para um volume total de 25 μL .

Antes do sequenciamento, foi realizada uma reação de PCR simplex em termociclador (Eppendorf Mastercycle gradient) composta pelos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos seguida de ciclo de 30 vezes com um passo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 59°C por 45 segundos e um passo de extensão das fitas a 72°C por 1,5 minutos, e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da reação da PCR foram analisados quanto a sua qualidade e concentração por eletroforese utilizando gel de agarose a 1% corado com brometo de Etídio (0,5 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta e foto documentado (OTSUKI *et al*,1997).

A purificação do DNA foi feita com Polietilenoglicol (PEG) de acordo com protocolo descrito por Lis (1980) modificado por Paithankar e Prasad, 1991. Em seguida, as amostras foram enviadas para o sequenciamento na plataforma da FIOCRUZ/CPqGM/Bahia, com os iniciadores descritos abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificar o gene 16S rRNA.

Iniciadores 5' – 3'	Tamanho (pb)
530F – TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC	
1492R – ACGTCATCCCCACCTTCCTC	856

As sequências obtidas foram processadas para remoção de sequências de baixa qualidade utilizando-se o programa “Phred/Phrap”. Cada sequência foi comparada com outras depositadas no “Genbank” (NCBI), BLAST do “National Center for Biotechnology Information” (Tabela 2) para confirmar se as cepas encontradas eram realmente da espécie *Pseudomonas aeruginosa* e, posteriormente, essas sequências foram lançadas no Genbank (Figura 13) para servirem como padrão para outros estudos filogenéticos.

4.5.3 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A técnica molecular conhecida como eletroforese em gel de campo pulsado é considerada o padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários, já que é um método apropriado para separar grandes fragmentos de DNA, com tamanhos moleculares variando entre 10 a 800kb, diferentemente de géis de agarose convencionais, os quais não permitem a separação de moléculas de DNA maiores que 40-50kb (SINGH *et al*, 2006).

O princípio desta metodologia determina que células bacterianas íntegras, embebidas em blocos de agarose estejam sujeitas à lise celular e à digestão com uma enzima de restrição de corte raro. Em seguida, a reação de macro-restrição é sujeita a eletroforese, onde a separação molecular é feita por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados, formando bandas ou faixas que reúnem fragmentos semelhantes, permitindo conhecer a origem de transmissão ou identidade dos microorganismos (MAGALHÃES *et al*, 2000; OLIVE & BEAN, 1999).

No presente estudo, o DNA cromossomal dos isolados bacterianos foi preparado de acordo com a técnica previamente descrita por NIKBIN *et al* (2007). A enzima de restrição utilizada no processo de digestão do DNA foi a XbaI e os fragmentos de DNA foram

separados em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1,0x com o sistema CHEF DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 6 Vcm^{-1} , Ângulo de 120° , com pulsos variando de 5-35 segundos e tempo de corrida de 20 horas. O gel foi corado com $2 \mu\text{g/ml}$ de brometo de Etidium (diluído em água destilada), visualizado em luz UV e foto documentado. Os perfis obtidos foram interpretados pelo coeficiente de similaridade de Dice e a análise de agrupamento foi realizada pelo UPGMA (Unweighted-Pair-Group Method), com o auxílio do programa GelCompar II (versão 6.5).

Os resultados foram analisados de acordo com as recomendações previamente descritas por Tenover (1995), onde isolados foram considerados idênticos quando seus perfis de restrição tiveram os mesmos números de bandas e as bandas correspondentes possuíram aparentemente os mesmos tamanhos, isto é, apresentaram 100% de similaridade; foram considerados isolados com alta similaridade genética, aqueles em que o padrão de PFGE apresentaram duas ou 3 bandas diferentes, isto é, valores entre 70 a 90% de similaridade genética; considerados isolados relacionados geneticamente aqueles os quais diferiram um dos outros por apresentarem, em seu padrão de PFGE, de 4 a 6 bandas, isto é, similaridade genética entre 50 a 69%; e considerados isolados independentes ou únicos àqueles que apresentaram similaridade genética menor que 50%.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação a nível de espécie

Durante o ano de 2012 foram realizadas 2 coletas de amostras de efluentes brutos e efluentes tratados no HPS 28 de Agosto e amostras de água superficial do Igarapé do Mindu. Nessas coletas, foram isoladas 191 bactérias, sendo 25 dessas, identificadas por metodologia clássica como *Pseudomonas aeruginosa*. As bactérias identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* foram aquelas que se apresentaram como bastonetes gram-negativos; formaram colônias com brilho metálico, bordas irregulares, odor de frutas adocicadas e pigmentos característicos como piocianina e pioverdina; e nas provas bioquímicas apresentaram positividade para oxidase, motilidade, produção de H₂S e crescimento à 42°C.

Dentre as 25 cepas de *P. aeruginosa* encontradas no estudo, 17 foram provenientes de efluentes hospitalares e 08 de água superficial do Mindu. Dos 17 isolados oriundos de efluentes hospitalares, 9 foram encontrados em efluentes brutos (5 no período chuvoso e 4 no período não chuvoso) e 8 encontrados em efluentes tratados (3 no período chuvoso e 5 no período não chuvoso).

Em relação às amostras de água superficial coletadas no Igarapé do Mindu, não foi encontrado nenhum isolado de *Pseudomonas aeruginosa* no período da cheia do Rio Negro, já no período da seca foram encontrados 8 isolados da mesma espécie nos seguintes pontos de coleta: 3 isolados à montante e 2 à jusante do HPS João Lúcio; 1 isolado à montante e 1 à Jusante do HPS 28 de Agosto; e 1 na Foz do Mindu.

Esses 8 isolados de *P. aeruginosa* encontrados ao longo do Igarapé do Mindu indica que essa espécie está sendo disseminada no ambiente aquático estudado e que são provenientes de instituições de saúde, já que *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria

comumente encontrada no ambiente hospitalar diferentemente da espécie *P. putida* que apesar de ser do mesmo gênero é uma bactéria ambiental e não causa doenças.

Nas 2 coletas foram retiradas amostras de água da nascente do Igarapé do Mindu (Figura 11), porém nenhum isolado de *Pseudomonas aeruginosa* foi encontrado, por isso ficou estabelecido, no estudo, que esse ponto de coleta seria designado como controle negativo.



Figura 11: Nascente do Igarapé do Mindu

Para confirmação dos resultados obtidos na identificação, por metodologia clássica, de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de efluentes hospitalares e água superficial do Igarapé do Mindu, todos os isolados encontrados foram submetidos à reação de PCR onde os produtos dessa reação foram analisados por eletroforese de gel de agarose visualizado sob luz ultravioleta e foto documentado (Figura 12) para posterior identificação molecular a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA.

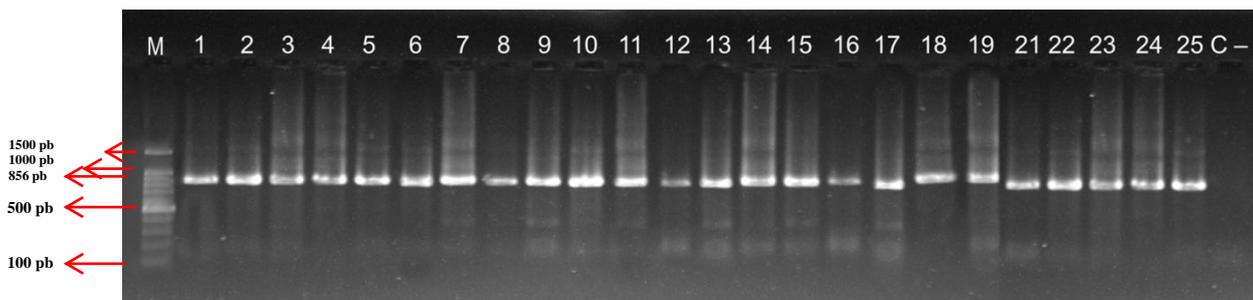


Figura 12: Amplificação do gene 16S rRNA agarose 1%. 110VTBE. Poço 1: Marcador 100pb Ludwing; Poços 2 a 26: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. Poço 27: Controle negativo.

Após o sequenciamento, as sequências dos isolados foram comparadas com os dados do GenBank, assumindo o índice de confiança para identificação bacteriana acima de 75%, como descreve a tabela 2.

Tabela 2. Comparação das sequências dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados no estudo com os dados do *GenBank*.

Isolados	Origem	Período	Espécie	Max ID	GenBank
160	Efluente Bruto	Cheia	<i>P. aeruginosa</i>	82%	HQ631966.1
161	Efluente Bruto	Cheia	<i>P. aeruginosa</i>	91%	HQ844440.1
162	Efluente Bruto	Cheia	<i>P. aeruginosa</i>	98%	JN600615.1
173	Efluente Bruto	Cheia	<i>P. aeruginosa</i>	78%	DQ201404.1
174	Efluente Bruto	Cheia	<i>P. aeruginosa</i>	93%	JF487789.1
176	Efluente Tratado	Cheia	<i>P. aeruginosa</i>	78%	KC293839.1
191	Efluente Tratado	Cheia	<i>P. aeruginosa</i>	98%	JF279962.1
192	Efluente Tratado	Cheia	<i>P. aeruginosa</i>	97%	HQ455029.1
213	H2O Montante H1	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	81%	HQ640430.1
217	H2O Montante H1	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	96%	JF487789.1
223	H2O Montante H1	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	95%	KC567886.1
226	H2O Jusante H1	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	92%	FJ788528.1
237	H2O Jusante H1	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	92%	FJ788528.1
239	H2O Montante H2	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	95%	HQ455034.1
251	H2O Jusante H2	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	96%	DQ201404.1
265	H2O Foz do Mindu	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	94%	HQ018743.1
275	Efluente Bruto	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	84%	HQ600430.1
276	Efluente Bruto	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	86%	KC305052.1
277	Efluente Bruto	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	86%	FJ556919.1
284	Efluente Bruto	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	93%	HQ844440.1
285	Efluente Tratado	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	78%	JQ783060.1
292	Efluente Tratado	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	86%	KC305052.1
293	Efluente Tratado	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	75%	JK783060
294	Efluente Tratado	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	86%	EU694102.1
296	Efluente Tratado	Seca	<i>P. aeruginosa</i>	97%	HQ455029.1

Após a identificação molecular dos isolados, as sequências foram lançadas no GenBank para servirem de padrão para outros estudos filogenéticos realizados no Brasil e no mundo. A figura 13 descreve o resultado da aceitação das 25 sequências dos isolados de *P. aeruginosa* selvagens encontradas no estudo, postadas no GenBank.

```

SOURCE mitochondrion Pseudomonas aeruginosa
ORGANISM Pseudomonas aeruginosa
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
AUTHORS Magalhaes,M.J.T.L., Nobre,C.B. and Orlandi,P.P.
TITLE Phenotypic and Genotypic Identification among isolates of Pseudomonas
aeruginosa found in hospital effluent and surface water of the affluent of Mindu -
Manaus Amazonas
JOURNAL Submitted (16-JUL-2013) Biodiversity in health, Instituto Leonidas e Maria
Deane FIOCRUZ, Rua Teresina 476, MANAUS, AMAZONAS 69057070, BRASIL
COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:patricia_orlandi@outlook.com.
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:25.
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
organism="Pseudomonas aeruginosa"/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"/isolation_source="Brasil:Hospital effluent and surface
water of the affluent of Mindu Manaus Amazonas"/db_xref="taxon:287"
/note="[cultured bacterial source]"
rRNA <1..>788 /product="16S ribosomal RNA"

```

Figura 13: Aceitação dos isolados de *P. aeruginosa* encontrados no estudo no GenBank

5.2 Teste de Mobilidade Ligada ao Flagelo

Utilizamos esse teste para analisar se os isolados de *P. aeruginosa* apresentavam a primeira característica bacteriana de aderência em superfície abiótica a partir da presença de um flagelo funcional em sua estrutura. Os isolados que apresentaram mobilidade ligada ao flagelo foram aqueles que formaram halos característicos (Figura 14) ao seu redor com tamanhos iguais ou maiores ao halo formado pela bactéria padrão (CHA) utilizada como controle positivo. Esses halos foram medidos em mm, como mostra a tabela 3.

Entre as 8 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* encontradas no Igarapé do Mindu no período da seca do Rio Negro, 8 (100%) apresentaram flagelo funcional. E das 17 cepas encontradas nos efluentes (brutos e tratados) do HPS 28 de Agosto nas duas coletas realizadas, 17 (100%) também apresentaram esse fenótipo (Tabela 3).

No presente estudo foram utilizados os seguintes padrões de *Pseudomonas aeruginosa*: PA103 (controle negativo) que apresentou um halo de 3mm de diâmetro (Figura 14: C) e CHA (controle positivo) que apresentou a formação de um halo de 7mm de diâmetro (Figura 14: A). A média aritmética dos tamanhos dos halos formados pelos isolados encontrados na água superficial do Igarapé do Mindu foi de 27mm e nos isolados encontrados nos efluentes hospitalares foi de 22mm, com isso observamos a produção exacerbada do fator de virulência mobilidade ligada ao flagelo nos isolados selvagens quando comparados com a bactéria utilizada como controle positivo (Tabela 3).

Tabela 3: Diâmetro dos halos formados pelos isolados de *P. aeruginosa* estudados

Isolados	Origem	Período de coleta	Diâmetro dos halos
160	Efluente Bruto	Cheia	30mm
161	Efluente Bruto	Cheia	25mm
162	Efluente Bruto	Cheia	35mm
173	Efluente Bruto	Cheia	17mm
174	Efluente Bruto	Cheia	8mm
176	Efluente Tratado	Cheia	19mm
191	Efluente Tratado	Cheia	23mm
192	Efluente Tratado	Cheia	20mm
213	H2O Montante H1	Seca	7mm
217	H2O Montante H1	Seca	32mm
223	H2O Montante H1	Seca	35mm
226	H2O Jusante H1	Seca	33mm
237	H2O Jusante H1	Seca	32mm
239	H2O Montante H2	Seca	31mm
251	H2O Jusante H2	Seca	35mm
265	H2O Foz do Mindu	Seca	9mm
275	Efluente Bruto	Seca	50mm
276	Efluente Bruto	Seca	55mm
277	Efluente Bruto	Seca	15mm
284	Efluente Bruto	Seca	7mm
285	Efluente Tratado	Seca	10mm
292	Efluente Tratado	Seca	15mm
293	Efluente Tratado	Seca	40mm
294	Efluente Tratado	Seca	12mm
296	Efluente tratado	Seca	9mm
Controle (+)			7mm
Controle (-)			3mm

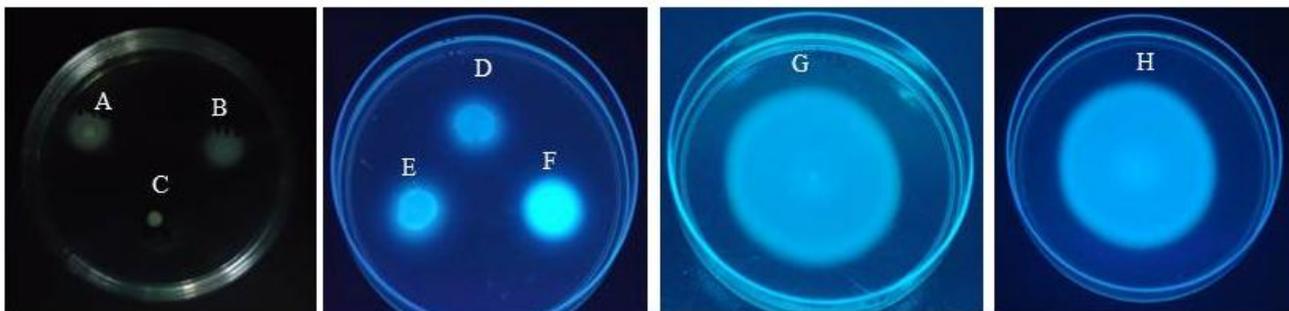


Figura 14: Teste de mobilidade ligada ao flagelo nos seguintes isolados: A- controle (+); C- controle (-); B- cepa de *P. aeruginosa* encontrada em amostras de água superficial do Mindu; D- cepa de *P. aeruginosa* encontrada em amostra de efluente hospitalar bruto; E, G- cepas de *P. aeruginosa* encontradas em efluente hospitalar tratado; F, H- cepas de *P. aeruginosa* oriundas de água superficial do Mindu (apresentando fluorescência).

5.3 Teste “Twitching Motility”

Nesse teste foi possível observar que as bactérias encontradas no estudo tinham a capacidade de se locomoverem em superfícies abióticas sem interferência do flagelo, isto é, locomoção flagelo-independente, se movimentando empurrando umas as outras para que haja a formação de macrocolônias dando início ao passo seguinte que é a formação do biofilme, que é um dos fatores de virulência mais importantes dessa bactéria.

Os isolados que apresentaram em sua estrutura a presença do pili tipo IV foram aqueles apresentando bordas onduladas e irregulares visualizadas por microscopia de contraste (Figuras 15: A; C; E e F) e, dessa forma, foram caracterizados como “Twitching motility” positivo. Já os isolados que apresentaram bordas sem ondulações como o controle negativo (Figura 15: B) não apresentaram pili tipo IV e consequentemente foram considerados “Twitching Motility” negativo.

De acordo com os resultados, podemos observar que nas amostras coletadas nos efluentes brutos e tratados do HPS 28 de Agosto 15 (88%) isolados de *P. aeruginosa* apresentaram “Twitching Motility” positivo e apenas 2 (12%) não apresentaram esse fator de virulência, os quais foram oriundos de amostras de efluentes brutos coletadas no período da cheia do Rio Negro.

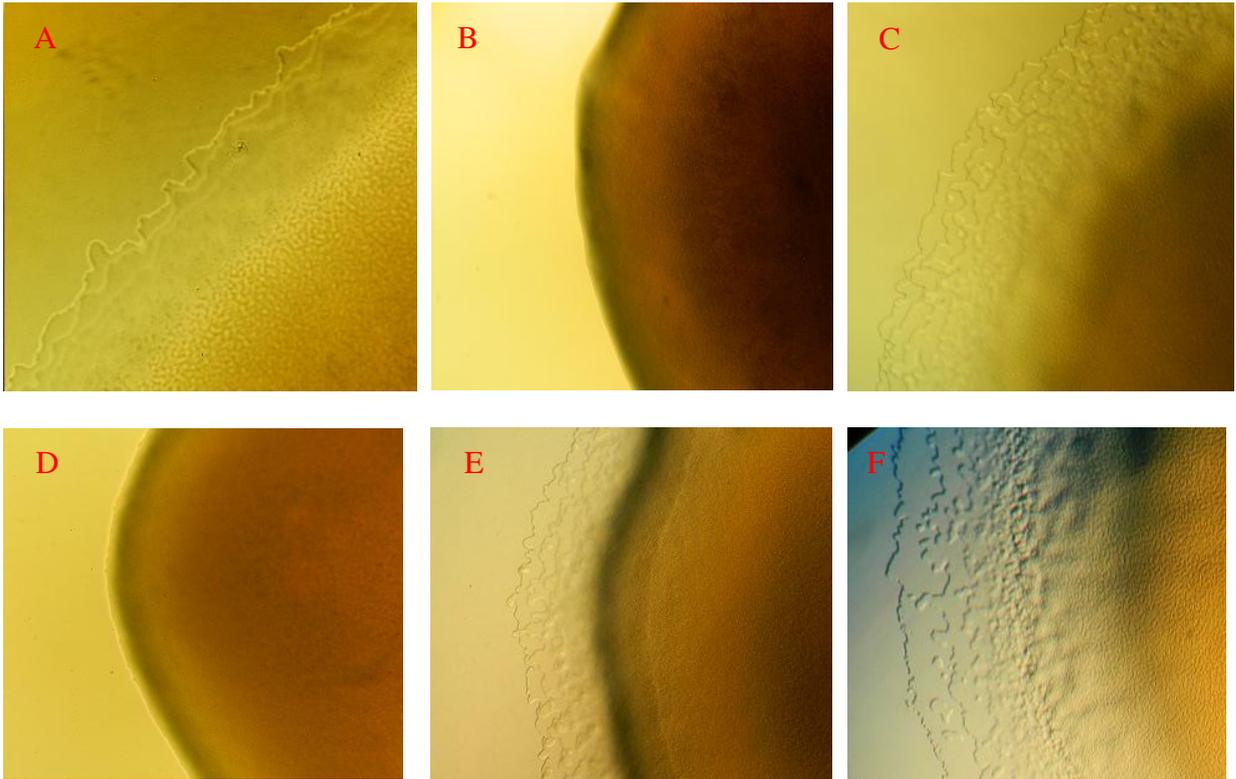


Figura 15: A- Bactéria padrão: CHA controle (+); B- Bactéria Padrão: PAOI controle (-); C- “Twitching Motility” positivo de cepa de *P. aeruginosa* isolada de amostra de efluente hospitalar (bruto); D- “Twitching Motility” negativo de cepa de *P. aeruginosa* isolada de amostra de efluente hospitalar (bruto); E, F- “Twitching Motility” positivo de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de amostras de efluente hospitalar (tratado).

Todos os isolados de *P. aeruginosa* provenientes de amostras coletadas no Igarapé do Mindu apresentaram bordas onduladas e irregulares como as mostradas nas Figuras 16: A e B, e dessa forma, apresentaram 100% de positividade para o fator de virulência “Twitching Motility”.

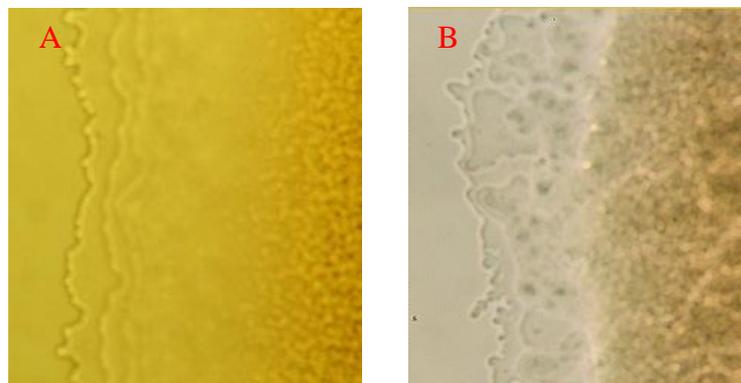


Figura 16: A e B- “Twitching Motility” positivo de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de água superficial do Igarapé do Mindu.

5.4 Teste de Formação de Biofilme

Este teste tem como objetivo medir a capacidade de cepas de *P. aeruginosa* desenvolverem biofilme em superfícies abióticas. As curvas do gráfico (Figura 17) representam as medições das absorvâncias obtidas a partir do biofilme formado pelas *Pseudomonas aeruginosa* do estudo. Os isolados bacterianos que apresentaram formação de biofilme foram aqueles, onde as medições da absorvância obtiveram valores iguais ou superiores à média aritmética (linha pontilhada da figura 17) encontrada entre o valor da absorvância obtida a partir do controle positivo e o valor da absorvância obtida pelo controle negativo.

No presente estudo, todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* encontradas nos efluentes hospitalares e na água superficial do igarapé do Mindu formaram biofilme (Figura 17), evidenciando a disseminação de bactérias de origem nosocomial no ambiente aquático. Os maiores picos apresentados na figura 17 representam as absorvâncias obtidas não somente por isolados (162 e 174) encontrados no efluente bruto, mas também por um isolado (293) encontrado no efluente hospitalar tratado, configurando a ineficiência do sistema de tratamento de esgotos envolvido no estudo.

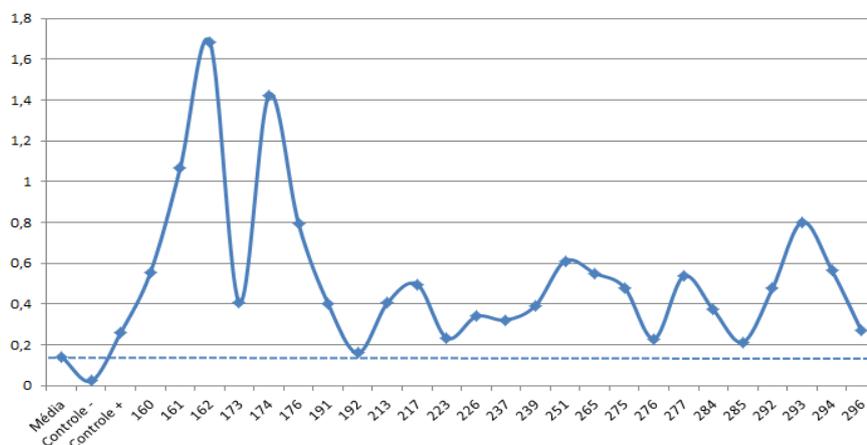


Figura 17: Formação de biofilme nos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

5.5 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Para analisar a sensibilidade microbiológica dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do presente estudo utilizamos os seguintes antibióticos: 1) Ampicilina (AMP); 2) Aztreonam (ATM); 3) Piperacilina associado ao Tazobactam (PTZ); 4) Norfloxacinó (NOR); 5) Levofloxacinó (LEV); 6) Ciprofloxacino (CIP); 7) Ceftriaxoná (CRO); 8) Ceftazidimá (CAZ); 9) Cefepimé (CPM); 10) Amicacina (AMI); 11) Gentamicina (GEN); 12) Imipeném (IMP); 13) Meropeném (MER) e 14) Polimixina B (POL).

Entre os 5 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* identificados no efluente bruto do HPS 28 de Agosto no período chuvoso, 5 (100%) apresentaram resistência à Ampicilina, Ceftriaxoná, Cefepimé, Norfloxacinó, Levofloxacinó, Ciprofloxacino e Gentamicina; 4 (80%) resistência à Imipeném e 1 (20%) resistência intermediária também ao Imipeném; 1 (20%) resistência ao Meropeném e 2 (40%) resistência intermediária ao mesmo antibiótico; 5 (100%) apresentaram sensibilidade à Polimixina, 4 (80%) sensibilidade à Aztreonam, Ceftazidimá e Piperacilina associada ao Tazobactam e 3 (60%) sensibilidade à Amicacina (Figura 18).

Nesse mesmo ponto de coleta, porém no período não chuvoso, dentre os 4 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados, 4(100%) apresentaram resistência à Ampicilina; 2 (50%) apresentaram resistência à Norfloxacinó, Levofloxacinó, Ciprofloxacino e Gentamicina; 4 (100%) apresentaram sensibilidade à Polimixina, Imipeném e à Piperacilina associada ao Tazobactam; 3 (75%) sensibilidade à Ceftazidimá, Cefepimé, Amicacina, Meropeném e Aztreonam; 2 (50%) sensibilidade à Ceftriaxoná (Figura 18).

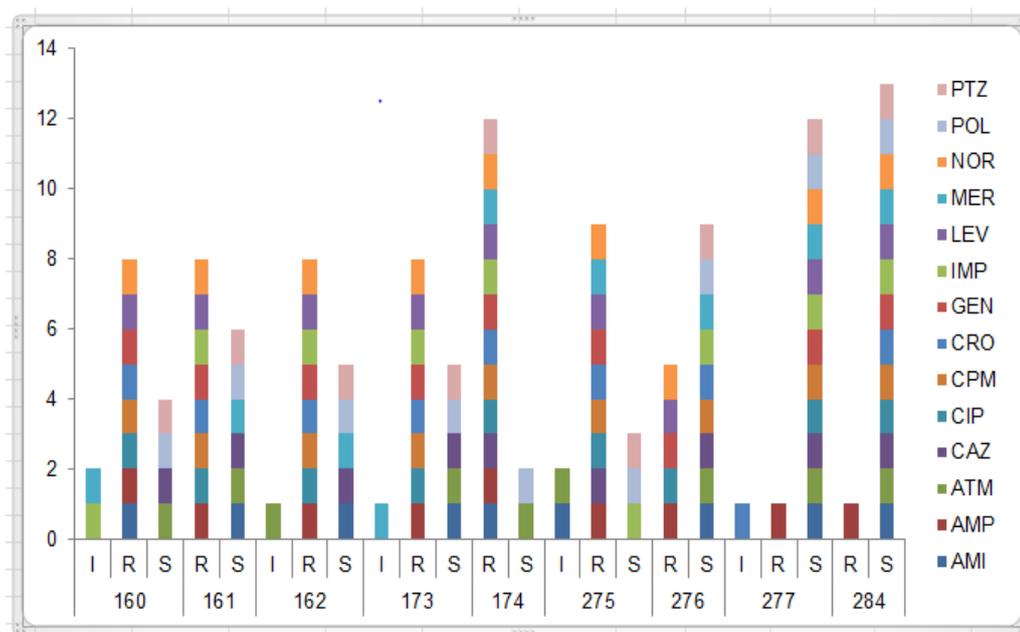


Figura 18: Perfil de resistência das *Pseudomonas aeruginosa*, encontradas em efluente hospitalar bruto, aos antimicrobianos testados.



Figura 19: Teste de antibiograma realizado em cepas de *P. aeruginosa* de efluente hospitalar bruto

De acordo com esses resultados (Figura 18) observamos que 78% dos isolados de *P. aeruginosa* encontrados em amostras de efluente hospitalar bruto apresentaram o fenótipo da multirresistência, incluindo o isolado 174 (Figuras 18 e 19) que apresentou resistência à 12 dos 14 antibióticos testados, os quais são atualmente os mais utilizados no controle de infecções hospitalares causadas por esse patógeno. Isso demonstra o grave problema de saúde pública que os grandes hospitais estão enfrentando com o advento da multirresistência microbiológica.

Já no efluente hospitalar tratado, dos 3 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados no período da cheia do Rio Negro, 3 (100%) foram resistentes à Ampicilina, Ceftriaxona, Cefepime, Norfloxacino, Levofloxacino, Ciprofloxacino e Gentamicina; 2 (67%) resistentes à Ceftazidima e Meropenem; 2 (67%) com resistência intermediária ao Aztreonam;

3 (100%) apresentaram sensibilidade à Polimixina e à Piperacilina associada ao Tazobactam e 2 (67%) apresentaram sensibilidade à Amicacina e ao Imipenem (Figuras 20 e 21).

E dos 5 isolados provenientes do mesmo ponto de coleta, porém encontrados no período da seca, 5 (100%) apresentaram resistência à Ampicilina; 3 (60%) resistência à Gentamicina; 2 (40%) resistência à Cefepime, Norfloxacino, Levofloxacino e Ciprofloxacino; 2 (40%) resistência intermediária à Ceftriaxona; 5 (100%) apresentaram sensibilidade à Polimixina e à Piperacilina associada ao Tazobactam; 4 (80%) sensibilidade à Ceftazidima, Imipenem e Aztreonam (Figuras 20 e 21).

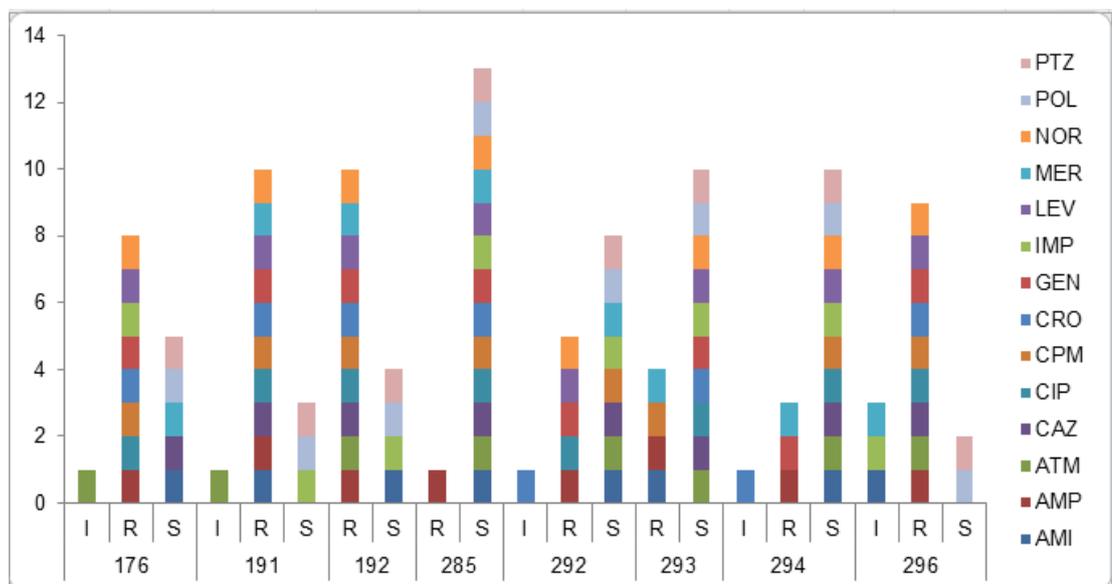


Figura 20: Perfil de resistência das *Pseudomonas aeruginosa*, encontradas em efluente hospitalar tratado aos antimicrobianos testados.



Figura 21: Teste de antibiograma realizado em cepas de *P. aeruginosa* de efluente hospitalar tratado

Podemos observar que 75% dos isolados encontrados nesse ponto de coleta apresentaram o fenótipo da multirresistência (Figura 20 e 21) e isso é extremamente preocupante por se tratar de amostras de efluente hospitalar tratado que poderá servir de veículo de disseminação de bactérias multirresistentes para o meio ambiente.

Os resultados obtidos no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos realizados nos isolados encontrados na água superficial do Igarapé do Mindu (Figura 22 e 23) também são preocupantes por confirmar a disseminação de *Pseudomonas aeruginosa* de origem nosocomial no corpo d'água estudado, já que todas as cepas encontradas nesse habitat apresentaram resistência ao antibiótico Ampicilina e que metade dessas cepas (incluindo o isolado 265 encontrado na foz do Mindu) apresentaram resistência intermediária à Ceftriaxona que atualmente é um dos antibióticos mais utilizados no Brasil para o controle de infecções hospitalares.

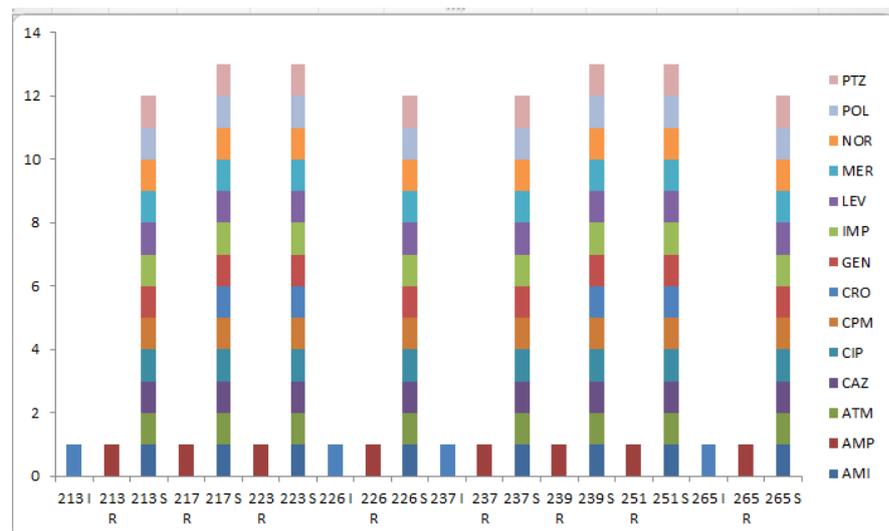


Figura 22: Perfil de resistência das *Pseudomonas aeruginosa*, encontradas em água superficial do Mindu, aos antimicrobianos testados.



Figura 23: Teste de antibiograma realizado em cepas de *P. aeruginosa* de água superficial do Mindu

5.6 Similaridade genética entre isolados de *P. aeruginosa*

Para analisar a similaridade genética entre os isolados estudados foi utilizado o método genotípico Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. A partir dessa metodologia, observou-se baixa diversidade genética entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados no

presente trabalho, já que o dendograma, descrito na figura 24, formou apenas 4 grupos distintos constituídos de 3 a 9 isolados bacterianos, e nenhum desses isolados apresentou independência no perfil genético em relação aos demais. Baseados nas recomendações descritas por Tenover (1995), obtivemos dentro dos grupos formados as seguintes correlações genéticas entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*:

O primeiro grupo do dendograma (Figura 24), formado por 9 isolados de *P. aeruginosa*, apresentou relação clonal entre cepas encontradas em efluente hospitalar bruto, coletado na cheia do Rio Negro; em efluentes brutos e tratados, coletados na cheia; em água superficial do Igarapé do Mindu, à jusante do Pronto Socorro 28 de Agosto; em água superficial do Mindu, à montante do Pronto Socorro João Lúcio; e em água superficial coletada na foz do Mindu.

Nesse grupo, podemos observar que os isolados 276 (efluente bruto) e 292 (efluente tratado) apresentaram alta similaridade genética (96%) indicando a ineficiência do sistema de tratamento de efluentes estudado. Observamos também que os isolados 160 e 161 (ambos encontrados em efluente hospitalar bruto) também apresentaram essa mesma correlação clonal indicando que cepas contendo o fenótipo da multirresistência (figura 18), como essas duas, estão circulando e persistindo nesse ambiente hospitalar. Outro resultado importante obtido nesse grupo foi a similaridade genética de 64% encontrada entre a cepa (162) proveniente de efluente hospitalar bruto, coletado no período de cheia e uma cepa (251) encontrada em água superficial do Mindu à jusante do HPS 28 de Agosto, coletada no período de seca do Rio Negro, indicando que cepas de origem nosocomial estão sendo recuperadas em amostras de água superficial do Mindu, mesmo em um intervalo de tempo, entre uma coleta e outra, de cinco meses (Figura 24).

O segundo grupo do dendograma (Figura 24) foi formado por isolados encontrados em efluente hospitalar tratado, coletado na cheia; em efluente hospitalar tratado, coletado na seca;

e em água superficial do Mindu à montante do HPS 28 de Agosto, coletada no período da seca do Rio Negro. Os isolados 191 e 296, provenientes de efluentes hospitalares tratados, encontrados em amostras coletadas no período da cheia e período da seca, respectivamente, são considerados geneticamente idênticos por apresentarem 100% de similaridade genética indicando que as mesmas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estão sendo encontradas, entre um intervalo de tempo de 5 meses, no efluente hospitalar tratado, desse modo fica evidente que o sistema de tratamento do HPS 28 de Agosto não estava sendo eficiente nos períodos em que foram realizadas as duas coletas do estudo.

Podemos observar também, nesse grupo (Figura 24), que o isolado 239, oriundo de água superficial do Mindu à montante do HPS 28 de Agosto, apresentou 78% de similaridade genética com dois isolados (191 e 296) encontrados em efluentes hospitalares tratado, mostrando mais uma vez, a partir dessa elevada relação clonal, a disseminação de *P. aeruginosa*, provenientes de contaminação hospitalar, no igarapé do Mindu, podendo exercer uma forte pressão seletiva nesse ambiente aquático (Figura 24).

Verificamos também que o terceiro grupo (Figura 24) apresentou dois isolados (226 e 237), ambos encontrados em amostra de água superficial do Mindu à jusante do HPS João Lúcio, geneticamente idênticos, mostrando que está havendo uma pressão seletiva no igarapé do Mindu, em relação à presença constante de *Pseudomonas aeruginosa* nesse habitat devido à contaminação por efluentes hospitalares não tratados. Isso fica evidente também com a alta similaridade genética (96%) encontrada, nesse mesmo grupo, entre o isolado (213) encontrado no igarapé do Mindu, à montante do HPS João Lúcio, e os dois últimos isolados (226 e 237) citados anteriormente. Esse resultado também evidencia que cepas de *P. aeruginosa* apresentando alta similaridade genética estão circulando nos mais diversos hospitais de Manaus, já que o isolado 213 foi encontrado próximo ao HPS João Lúcio e os isolados (226 e 237) foram encontrados após o HPS 28 de Agosto.

Observamos também no terceiro grupo do dendograma (Figura 24) a presença de 2 isolados (275 e 293) encontrados em efluente bruto e efluente tratado, respectivamente, ambos coletados na seca, também apresentando alta similaridade genética, mostrando mais uma vez a ineficiência do sistema de tratamento de efluentes hospitalares estudados.

O quarto e último grupo constituído por apenas 3 isolados bacterianos também apresentou dois isolados, o 277 oriundo de efluente hospitalar bruto e o 294 oriundo de efluente hospitalar tratado, contendo alta similaridade genética (94%), mostrando novamente que cepas de *P. aeruginosa* estão sendo continuamente recuperadas no efluente tratado, onde não poderia haver a presença de microrganismos patogênicos (Figura 24).

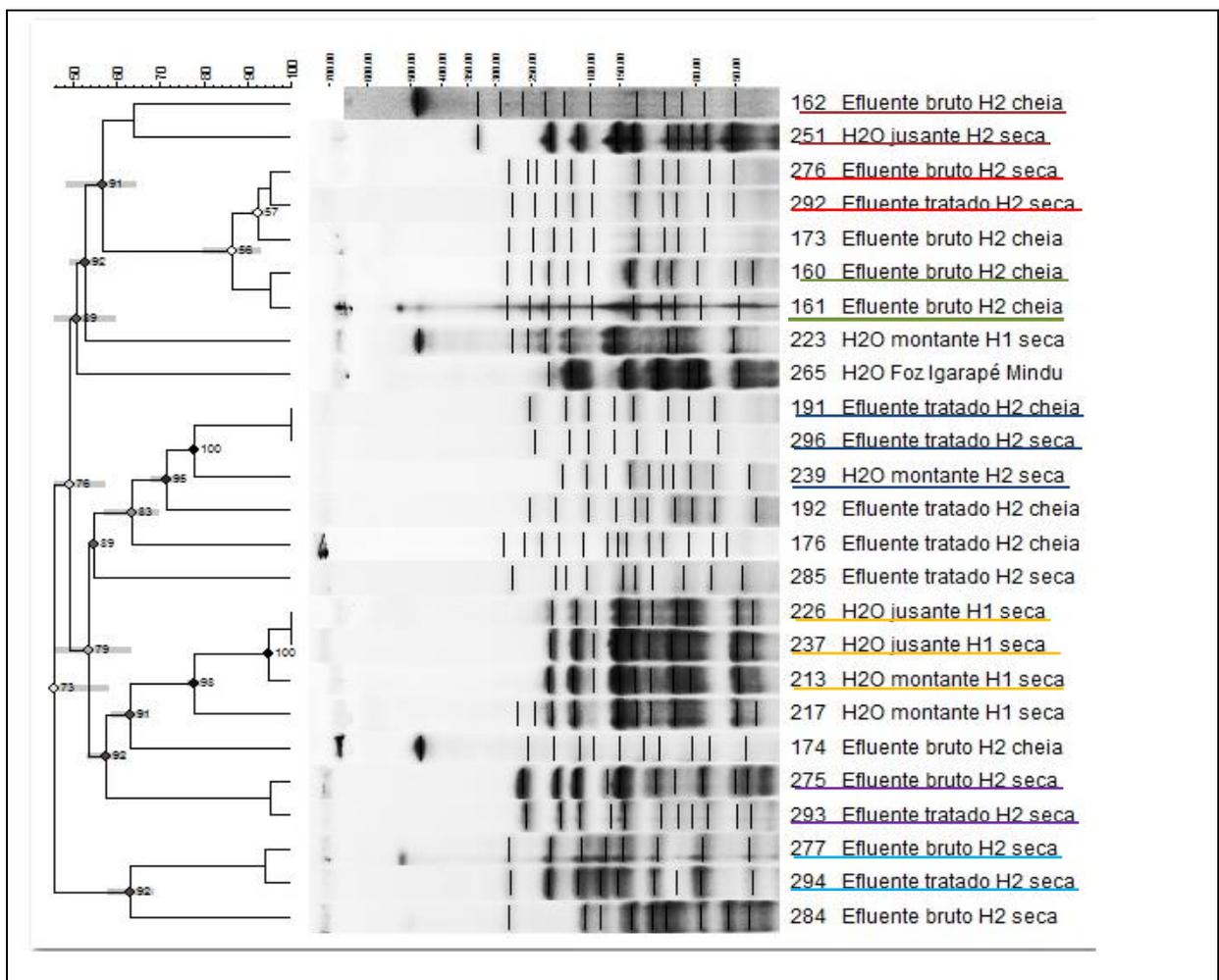


Figura 24: Dendograma, gerado por PFGE, de todos os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* identificados no presente estudo. Análise em GelCompar II, Versão 6.5, Coeficiente de Similaridade Dice, Tolerância 1%, Análise de Cluster UPGMA.

6. DISCUSSÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma das bactérias mais estudadas atualmente devido a sua importância para a saúde pública. No ambiente hospitalar, essa bactéria é fonte de vários tipos de infecções por apresentar fatores de virulência importantes como a formação de biofilme e grande facilidade em desenvolver resistência natural ou adquirida à maioria dos antimicrobianos disponíveis hoje no mercado, representando uma urgência clínica e epidemiológica em todo o mundo (BERTAND *et al*, 2011).

No Brasil, *Pseudomonas aeruginosa* é a principal bactéria causadora de infecções hospitalares e diversos estudos tem associado sua presença a uma disseminação clonal da espécie. Essa bactéria além de causar sérios danos aos pacientes, elevando os índices de morbidade e mortalidade, causa grande impacto nos custos dos hospitais brasileiros (BARROS *et al*, 2012; GALES, 2004; MENDES, 2005).

Estudos epidemiológicos nacionais realizados pelo MYSTIC, direcionados a pacientes hospitalizados em UTI's, no qual foram avaliados 1.550 amostras de bactérias Gram-negativas provenientes de 20 centros hospitalares brasileiros, mostrou a *P. aeruginosa* envolvida em 30,3% das infecções de corrente sanguínea/cateter, trato respiratório, trato urinário, pele e tecidos moles (KIFFER, 2005).

Apesar de ser um agente de contaminação comumente encontrado em ambientes hospitalares, a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em ambientes aquáticos é preocupante e tem sido demonstrada em vários estudos (COELHO *et al*, 2010; WEBB *et al*, 2004; HAJJARTABAR, 2004).

No Brasil, a região Amazônica é reconhecida mundialmente por sua abundância de rios, lagos e mananciais, além de amplo registro de lençóis freáticos. Muitos destes rios margeiam ou cortam as cidades servindo como ambiente de recreação e fonte de abastecimento de água. Porém, um dos aspectos socioeconômico marcante se caracteriza pela

inexistência ou ineficiência de saneamento básico, sendo estes rios alvos para o despejo de resíduos, inclusive dejetos hospitalares (CLETO FILHO, 2005).

A maioria dos estudos direcionados a elucidação das condições higiênicas das águas de consumo geral, água de consumo potável, contaminação de rios, lagos e lençóis freáticos, geralmente se limita à identificação de coliformes fecais e totais (ALVES *et al*, 2002). Nosso estudo propôs-se a verificar, a partir de técnicas fenotípicas e genotípicas, a possível contaminação do Igarapé do Mindu por *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de efluentes hospitalares, pela comparação de isolados encontrados em amostras de efluentes hospitalares e de água superficial do igarapé do Mindu durante os períodos de seca e cheia do Rio Negro.

A disseminação clonal dessa espécie nos mananciais da cidade de Manaus pode causar sérios riscos à saúde da população, principalmente quando as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* encontram-se associadas a fatores de virulência (MATTICK, 2002). Técnicas fenotípicas são utilizadas para detectar as características expressas pelos microrganismos, os quais podem sofrer variações genéticas baseadas em mudanças nas condições de crescimento do microrganismo e mutações espontâneas (TENOVER *et al*, 1997).

Neste estudo, para a comparação fenotípica dos isolados de *P. aeruginosa* utilizamos os testes de identificação a nível de espécie, mobilidade ligada ao flagelo, “Twitching Motility”, formação de biofilme e sensibilidade aos antimicrobianos. A presença deste conjunto de fatores de virulência é utilizada para caracterizar a patogenicidade da espécie de *P. aeruginosa* (BARROS, 2005).

Como resultados, os efluentes hospitalares não apresentaram diferenças nas frequências de isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* entre os períodos chuvoso e não chuvoso (Tabela 2). Porém, nas águas superficiais do Mindu a *P. aeruginosa* só foi encontrada no período não chuvoso (Tabela 2). Acreditamos que esta variação deve-se ao fato de que a quantidade de águas residuais geradas pelos serviços de saúde não estejam sujeitas as

modificações sazonais. Os rios, no entanto, aumentam seu volume em decorrência das chuvas que caracterizam o período da cheia, ocorrendo uma diluição da água e acúmulo de uma grande quantidade de lixo e produtos químicos que são arrastados pela água para o interior desses mananciais, dificultando o isolamento de microrganismos em água superficial neste período (CLETO FILHO, 2005).

A capacidade de formar biofilme é uma das características principais para o sucesso da *Pseudomonas aeruginosa* como patógeno (O' TOOLE e KOLTER, 1998-A). Para sua formação, é necessária a presença de dois outros fatores: a presença de flagelo funcional e o pili tipo IV como fator de adesão (DÉZIEL *et al*, 2001).

Dos 25 isolados encontrados no estudo, todos (17 isolados de efluentes e 8 das águas superficiais do Mundu) apresentaram a presença de flagelo funcional no teste mobilidade ligada ao flagelo (Tabela 3), não havendo distinção entre os isolados encontrados nos efluentes hospitalares (bruto e tratado) e os isolados do Mindu. Adicionalmente, quando comparados os tamanhos dos halos de motilidade com o controle positivo, grande parte dos isolados apresentou a produção exacerbada desse fator de virulência (Figura 14-G e Figura 14-H).

Um estudo proposto por Barros (2005) afirma que as cepas de *P. aeruginosa* que possuem o flagelo funcional mais eficiente são aquelas oriundas de contaminação hospitalar e encontradas em um grande fluxo de água, enquanto as cepas que possuem o flagelo menos funcional são normalmente isoladas de lugares menores e aprisionadas, possuindo assim mais nutrientes. Estes resultados corroboram com os encontrados em nosso estudo onde a funcionalidade do flagelo foi encontrada em ambos os casos.

Vários estudos examinaram a contribuição do flagelo na patogenicidade da *Pseudomonas aeruginosa*. Pier *et al*, (1994), com a inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* sem flagelo mutantes (Fla⁻) em mucosa de camundongos, atribuiu a ausência do flagelo à uma

colonização inefetiva do trato gastrointestinal. Landsperger *et al*, (1994) demonstrou que em ratos infectados com anticorpos monoclonais anti-flagelo em modelo de pneumonia induzida por *Pseudomonas aeruginosa* há a diminuição da habilidade de motilidade desta bactéria, reduzindo a área de inflamação.

A produção exacerbada deste fenótipo pelas cepas isoladas neste estudo representa um grande potencial de colonização caso venham a contaminar hospedeiros humanos, garantindo a rápida disseminação e grande potencial inflamatório (FELDMAN *et al*, 1998). Além disso, a maior expressão do flagelo contribui para uma maior aderência destas *Pseudomonas* aos diversos materiais e equipamentos hospitalares que podem servir de veículos de disseminação do patógeno.

Uma vez aderida a uma superfície, a *P. aeruginosa* move-se a partir do “Twitching Motility”. Esse fator de virulência é um indicativo da capacidade da bactéria locomover-se em superfícies úmidas sem interferência do flagelo (locomoção independente de flagelo). O Twitching tem a capacidade de mover as células bacterianas, linearmente, ao longo do eixo por meio da retração do pili tipo IV (O'TOOLE *et al*, 1998).

No presente trabalho, podemos observar que dos 25 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados, 23 apresentaram twitching motility positivo e apenas 2 tiveram ausência do pili tipo IV (Figura 15). Curiosamente, ambas as bactérias que foram negativas para este fator foram isoladas de efluentes brutos.

Esses resultados são bem distintos dos obtidos no estudo realizado por Barros (2008) que obteve apenas 56% de positividade no teste twitching motility em isolados de *P. aeruginosa* nosocomiais e ambientais encontrados na cidade de Porto Velho – RO.

Mobilidade flagelar e “Twitching Motility” baseado no pili tipo IV tem sido mostrado como exigência para a aderência e desenvolvimento inicial do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* (DÉZIEL *et al*, 2001).

No presente estudo foi observado que não houve diferença entre os isolados encontrados no efluente hospitalar e em água superficial no que diz respeito à formação do biofilme, uma vez que todas as cepas apresentaram esse fator de virulência (Figura 17). Esse resultado já era esperado, visto que tais isolados também foram caracterizados com eficientes flagelos funcionais (Tabela 3) e presença de pili tipo IV (Figuras 15 e 16), necessários à formação do biofilme.

A habilidade de formar biofilme contribui para o aumento de riscos de infecção devido à proteção que ele proporciona às células bacterianas por evitar a ação de células de defesa como os fagócitos e servir como barreira de penetração para os mais diversos antibióticos (GIWERCMAN *et al*, 1991; HOIBY *et al*, 2001). Além disso, a resistência que o biofilme agrega a *Pseudomonas aeruginosa* é uma estratégia de sobrevivência a meios inóspitos, como ambientes contendo produtos químicos incluindo antibióticos e desinfetantes. (FRICKS-LIMA *et al*, 2011).

Infelizmente, por motivos econômicos, os exames de rotina laboratoriais (como hemocultura e antibiograma) não incluem a pesquisa dos biofilmes bacterianos, apenas as células filhas são investigadas, e desse modo, o tratamento empírico do paciente torna-se ineficiente, pois a equipe médica desconhece a verdadeira natureza das bactérias que se encontram protegidas pelo biofilme (HOIBY *et al*, 2001; FRICKS-LIMA *et al*, 2011).

A membrana externa presente em bactérias gram-negativas constitui uma barreira semipermeável à captação de antibióticos, contribuindo com a resistência intrínseca existente em bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (TAVARES, 2001). Por esse motivo, há um número limitado de agentes antimicrobianos com ação efetiva contra essa espécie, incluindo-se neste grupo as aminopenicilinas (Ampicilina), Penicilinas antipseudomonas (Piperacilina associado ao Tazobactam), cefalosporinas de terceira geração (Ceftriaxona, Ceftazidima), cefalosporinas de quarta geração (Cefepime), monobactams (Aztreonam),

carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem), fluoroquinolonas (Levofloxacino, Norfloxacino, Ciprofloxacino), aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina) e as Polimixinas (Polimixina B) (GOODMAN e GILMAN, 2010).

Os resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos realizados nos isolados de *P. aeruginosa* encontrados em amostras de efluentes hospitalares brutos e tratados demonstraram 78% dos isolados do efluente bruto (Figura 18) e 75% dos isolados de efluente tratado (Figura 20) com o fenótipo da multirresistência.

Os isolados oriundos do efluente hospitalar bruto apresentaram altos índices de resistência a diversos antibióticos, incluindo 3 antibióticos quinolônicos (Norfloxacino, Levofloxacino e Ciprofloxacino), 1 antibiótico do grupo das aminopenicilinas (Ampicilina), 2 antibióticos cefalosporínicos (Ceftriaxona e Cefepime), 2 antibióticos carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem) e 1 antibiótico aminoglicosídico (Gentamicina). Observamos que dos 14 antibióticos testados, esses isolados apresentaram elevado nível de susceptibilidade somente a 5 antibióticos (Polimixina, Piperacilina associada ao Tazobactam, Amicacina, Ceftazidima e Aztreonam).

Quando comparados os resultados da resistência antimicrobiana entre os efluentes hospitalares (bruto e tratado), verificamos resultados ainda mais preocupantes nos efluentes tratados, uma vez que apresentaram alto nível de resistência a 3 antibióticos quinolônicos (Norfloxacino, Levofloxacino e Ciprofloxacino), a 1 antibiótico do grupo das aminopenicilinas (Ampicilina), a 3 antibióticos cefalosporínicos (Ceftriaxona, Cefepime e Ceftazidima), a 1 antibiótico carbapenêmico (Meropenem), a 1 antibiótico monobactâmico (Aztreonam) e a 1 antibiótico aminoglicosídico (Gentamicina). Nesse ponto de coleta, dos 14 antibióticos testados, somente 4 apresentaram efetividade contra os isolados bacterianos, foram eles: Polimixina, Piperacilina associada ao Tazobactam, Amicacina e Imipenem.

Um estudo realizado por Fuentefria (2009) apresentou resultados bem distintos, com 70,2 % de todos os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados em esgotos hospitalares do Paraná susceptíveis a todos os antibióticos testados. Em Goiânia no ano 2009, foram identificados 3 isolados de *P. aeruginosa* com uma taxa de sensibilidade os antibióticos Aztreonam, Ceftazidima, Imipenem, Ciprofloxacina e Cefepime (RESENDE, 2009).

A frequência e resistência aos antimicrobianos podem variar significativamente entre diferentes estados (PAVIANI *et al*, 2004). Apesar disso, muitos protocolos clínicos gerais são gerados e seguidos por vários Estados brasileiros. No guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares, elaborado pelo grupo e subcomissões de controle de infecção hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, observa-se que o antibiótico piperacilina associado ao tazobactam não é mais recomendado no tratamento da maioria das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (FMUSP, 2011).

No atual estudo, a alta taxa de sensibilidade encontrada para Piperacilina associada ao Tazobactam o sugere como uma das melhores opções para o tratamento dos pacientes internados em Prontos Socorros da cidade de Manaus devido ao seu baixo custo e toxicidade quando comparado a antibióticos como a Polimixina (FURTADO, 2007; OLIVEIRA, 2009), porém resistências encontradas contra este antibiótico em vários estudos (FIGUEIREDO *et al*, 2007; PAVIANI *et al*, 2004) o levaram a não ser incluído na terapêutica, da maioria dos casos de infecções causadas por *P. aeruginosa*, recomendada pelo Guia Terapêutico do FMUPS, utilizado pelos grandes hospitais e prontos socorros do País, incluindo os Hospitais e Prontos Socorros de Manaus.

O resultado de sensibilidade a piperacilina/tazobactam em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar também foram observadas na região Norte por Almeida *et al*, (2012) no Estado do Pará, onde 75% dos isolados foram sensíveis a este antibiótico.

Estes dados reforçam a necessidade da realização de estudos epidemiológicos visando a caracterização da resistência a antibióticos efetuados de maneira periódica e regional devido à heterogeneidade dos resultados apresentados pela *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes estados brasileiros para adequação dos meios de tratamentos.

A *Pseudomonas aeruginosa* possui grande facilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos (BERTAND *et al*, 2011). Por isso, a realização de constantes programas de vigilância de maneira institucional são essenciais para guiar a terapia empírica, servindo como medida de controle de infecção, diminuir a resistência aos fármacos, aumentando o índice terapêutico (PAVIANI *et al*, 2004).

Apenas uma parte dos medicamentos é absorvida pelos pacientes internados nos serviços de saúde é metabolizada, a outra parte é excretada principalmente pela urina e fezes dos pacientes (GOODMAN e GILMAN, 2010) sendo destinadas ao esgoto hospitalar. Por esse motivo, todo serviço de saúde deve conter em sua estrutura física um eficiente sistema de tratamento de efluentes para não ocorrer liberação de antimicrobianos para o meio ambiente que pode promover uma grande pressão seletiva de microrganismos resistentes nos corpos d' água.

Além disso, a ineficiência do tratamento de efluentes pode causar o acúmulo de bactérias multirresistentes e a transmissão deste fenótipo a outras bactérias através do *quorum sensing* e transmissão plasmidial desencadeando a disseminação ambiental de bactérias multirresistentes que poderão causar sérios riscos à população (KUMMERER e HENNINGER, 2004).

Desta forma, os resultados obtidos no atual estudo mostram que os efluentes hospitalares representam uma fonte de contaminação em potencial para os mananciais encontrados no município de Manaus devido à alta resistência antimicrobiana encontrada nos efluentes mesmo após o tratamento.

Este resultado corrobora com o observado por Prado (2007), que analisou a eficiência de um sistema de tratamento de efluentes hospitalares no Brasil e considerou esse sistema ineficiente na remoção de microrganismos patogênicos por demonstrar a presença de *Klebsiella pneumoniae* contendo o fenótipo da multirresistente no efluente tratado.

Apesar das altas taxas de resistência terem sido encontradas entre os isolados provenientes dos efluentes hospitalares (Figuras 18 e 20), para os 8 isolados de *P. aeruginosa* da água superficial do Igarapé do Mindu o resultado foi bem diferente, porém importante, já que 100% desses isolados apresentaram resistência à Ampicilina; e 50% apresentaram resistência intermediária à Ceftriaxona (Figura 22), atualmente um dos antibióticos mais utilizado no controle de infecção hospitalar (FMUSP, 2011).

A presença de cepas resistentes presentes nas águas superficiais do Mindu é alarmante devido à ausência destes componentes de forma natural neste ambiente caracterizando uma fonte de contaminação externa.

Quiteira & Peixe (2006) encontraram a presença de genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em bactérias da espécie *P. aeruginosa* isoladas de fonte não hospitalar, sugerindo proveniência de contaminação hospitalar.

Em oposição, um estudo realizado por Medeiros, *et al* (2006) que isolaram 13 linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* encontradas em diferentes fontes de ambientes aquáticos em Recife - PE não encontrou nenhum isolado apresentando o fenótipo de resistência a qualquer dos nove antibióticos estudados.

Neste estudo, acreditamos que a ineficiência observada no tratamento de efluente para *Pseudomonas aeruginosa* nos hospitais possa ter influência nos microrganismos recuperados no ambiente aquático. Estudos adicionais sobre as características presentes no efluente tratado são necessárias para avaliar que outros microrganismos e substâncias podem estar sendo liberadas na rede coletora do município, que possui como destino final os rios.

Como complementação da caracterização fenotípica, a análise genotípica também tem sido amplamente utilizada para comparar cepas de bactérias ambientais com cepas nosocomiais (FUENTEFRIA, 2009). No estudo atual, foi utilizada Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE) com vários objetivos: verificar se isolados de *P. aeruginosa* encontrados no efluente hospitalar bruto possuem similaridade genética com isolados encontrados no efluente hospitalar tratado; determinar a relação clonal entre isolados encontrados em amostras coletadas no período da cheia e amostras coletadas no período da seca do Rio Negro; e avaliar se isolados oriundos de efluentes hospitalares estão sendo recuperados em amostras de água superficial do Igarapé do Mindu.

O dendograma (Figura 24), montado a partir dos padrões de restrição encontrados no PFGE, demonstra um alto grau de similaridade genética entre 2 isolados encontrados no efluente hospitalar bruto e 2 do efluente tratado (96%) indicando a ineficiência do sistema de tratamento de esgotos do HPS 28 de Agosto.

Este resultado corrobora com os encontrados na caracterização fenotípica, na qual foram recuperadas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com altas taxas de resistência a antibióticos mesmo após o tratamento. Curiosamente, 2 isolados, do efluente bruto (276) e tratado (292), com 96% de similaridade possuem o mesmo padrão de resistência a antimicrobiano (norfloxacino, levofloxacino, gentamicina, ciprofloxacino e ampicilina), caracterizando estas amostras como clones com alta similaridade genética.

Além disso, a similaridade de 100% entre 2 cepas isoladas de efluente tratado, uma encontrada na época de cheia do Rio Negro (191) e outra na seca (296) configura a persistência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no ambiente hospitalar mesmo após o período de 5 meses de coleta. Tal resultado demonstra a eficiência desta cepa em aderir-se a superfície do esgoto ou estar continuamente circulante em ambiente hospitalar, persistindo no efluente tratado. O mais preocupante é que estes isolados possuem o fenótipo da

multirresistência, apresentando resistência a 9 dos 14 antibióticos testados (Figura 20), tendo o potencial de transmiti-los continuamente a outros microrganismos.

Em estudos de Fuentefria *et al*, (2009) e Tuméo *et al*, (2008), não foram obtidas similaridade genética entre isolados encontrados em esgoto hospitalar com isolados encontrados em água superficial, indicando que outras fontes, que não o esgoto hospitalar, pudessem estar contribuindo para a presença de bactérias como a *P. aeruginosa* nas amostras de água analisadas.

Apesar disso, no estudo atual, a tipificação dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou uma relação clonal de 64% entre um isolado encontrado em efluente hospitalar bruto (162) e um isolado encontrado em água superficial do Mindu à jusante do HPS 28 de Agosto (251); e alta similaridade genética de 78% entre dois isolados (191 e 296) de *P. aeruginosa* oriundos de efluente hospitalar tratado e um isolado (239) oriundo de água superficial do Mindu à montante do mesmo hospital.

Esses resultados indicam que isolados oriundos de efluentes hospitalares estão sendo recuperados na água superficial do Mindu, devido às relações e similaridades encontradas entre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas. A resistência de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas superficiais do Mindu a ampicilina e ceftriaxona (Figura 22), uma cefalosporina de terceira geração, encontradas neste estudo configura o principal indício que esta contaminação ocorre e influencia no perfil destes isolados em um ambiente tão amplo quanto o Mindu.

Em conjunto, estes resultados indicam um grave problema de saúde pública uma vez que a contaminação constante no Rio Negro, já que os corpos d'água da zona urbana da cidade desaguam nesse manancial, proveniente de efluentes hospitalares não tratados adequadamente é cumulativa e pode futuramente levar a multirresistência dos microrganismos.

No contexto de legislação, a RDC 306 de 7 de dezembro de 2004 estabelece no seu item 13.3.1 que “Os resíduos líquidos provenientes de esgoto e de águas servidas de estabelecimentos de saúde devem ser tratados antes do lançamento no corpo receptor ou na rede coletora de esgoto, sempre que não houver sistema de tratamento de esgoto coletivo atendendo a área onde está localizado o serviço” (BRASIL, 2004).

Ainda, de acordo com a Resolução CONAMA 357/05, o efluente deve ser devolvido ao rio tão limpo ou mais limpo que o próprio rio, de forma que não altere as características físicas, químicas e biológicas do corpo receptor (BRASIL, 2005).

A presença de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* neste estudo apresentando fatores de virulência (flagelo funcional, pili tipo IV, formação de biofilme e fenótipo de multirresistência aos antibióticos) caracterizam essas bactérias como patogênicas. Além disso, as similaridades genéticas (PFGE) encontradas entre os efluentes hospitalares (bruto e tratado) demonstram a ineficiência deste tratamento para a eliminação de microrganismos. Estes resultados demonstram a discordância do efluente descartado no Igarapé do Mindu à legislação vigente, caracterizando um problema de saúde pública.

Este estudo pode servir como alerta às autoridades competentes para que haja um maior controle dos efluentes hospitalares escoados a rede coletora municipal, e um laudo com os resultados encontrados neste projeto será destinado à diretoria do Hospital 28 de Agosto para que o hospital tenha ciência do ocorrido e possa tomar as providências cabíveis.

7. CONCLUSÃO

Ao término do estudo foi possível concluir que:

- Apesar da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando fatores de virulência, ser de origem nosocomial, isolados dessa espécie foram encontrados em todos os pontos de coleta do Igarapé do Mindu, com exceção da nascente desse corpo d'água.
- A partir dos testes (mobilidade ligada ao flagelo, “Twitching Motility” e formação de biofilme) não foi possível diferenciar as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* encontradas em amostras de águas superficiais coletadas ao longo do igarapé do Mindu com as encontradas nos efluentes hospitalares (brutos e tratados), já que os isolados provenientes desses diferentes nichos expressaram com eficiência os três fatores de virulência;
- O fenótipo de multirresistência foi observado na maioria dos isolados de *P. aeruginosa* encontrados nos efluentes hospitalares (bruto e tratado). E os 8 isolados encontrados no Igarapé do Mindu apresentaram resistência a pelo menos 1 antibiótico, evidenciando a contaminação do Mindu por microrganismos de origem hospitalar;
- Alta similaridade genética foi observada entre isolados encontrados no efluente bruto e efluente tratado, entre isolados encontrados em diferentes períodos pluviométricos e entre isolados encontrados em amostras de efluente hospitalar e água do Mindu, evidenciando a ineficiência do sistema de tratamento de efluentes estudado, a

persistência de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar e a disseminação da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* nosocomiais no ambiente aquático estudado;

Esperamos que esse trabalho seja o ponto de partida para novos projetos que visem identificar microrganismos patogênicos nos mananciais de Manaus; que também sirva de alerta para os órgãos de vigilância sanitária do município para que haja maior fiscalização e punição para os serviços de saúde que não cumprem as legislações ambientais vigentes; e que esse estudo também colabore para a elaboração de políticas públicas de saúde que visem preservar o meio ambiente e a saúde da população.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. G. C, *et al.* Perfil de sensibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar e ambulatorial oriundas de laboratórios público e privado, em Belém, estado do Pará. *Rev Brasileira de Análises Clínicas*, v. 44, n. 1, p. 44-9, 2012.

ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. C. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. *Rev Saúde Pública*, v.36, n.6, p. 749-51, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos IV, p.63, 2004.

BARROS, H. Q. G. Caracterização fenotípica de bactérias isoladas de amostras de águas coletadas em 5 Escolas Públicas Estaduais e Municipais de Porto Velho/RO. 2005. 48f. Monografia (Ciências Biológicas) - Faculdade São Lucas de Rondônia.

_____. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* nosocomiais e ambientais da cidade de Porto Velho- RO. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica) – Universidade Federal de Rondônia.

BARROS, L. M, *et al.* Prevalência de microrganismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 33, n. 3, p. 429-435, 2012.

BERTRAND, X, *et al.* Épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue francophone des laboratoires*, n. 435, p. 35-40, 2011.

BRADLEY, D. E. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: “Twitching Motility”. *Can. J. Microbiol.* v. 26, p. 146–54, 1980.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial da Uniao, Brasília, DF, 10 dez. 2004.

BRASIL. Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, págs. 58-63 Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* “Twitching Motility” Typi IV pili in action. *Rev. Microbiol.* v. 66, p. 493-520, 2012.

CARVALHO, R. H.; GONTIJO, F. P. P. Epidemiologically relevant antimicrobial resistance phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian University Hospital. *Braz J Microbiol.* v. 39, n. 4, p. 623-30, 2008.

CAVALCANTE, A. M. A. Levantamento de Fauna e Flora do Corredor Ecológico do Mindú. Relatório Técnico Parcial. Secretaria Municipal de Meio Ambiente, Manaus – AM, 2007.

_____. Nas margens do igarapé do Mindu: dois lados da história. 2003. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CEZÁRIO, R. C, *et al.* Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* v. 27, n. 5, p. 269-74, 2009.

CLETO FILHO, S, E. N. Urbanização, poluição e biodiversidade na Amazônia. *Ciência hoje*, S.P. vol.33, 2005.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational Supplement, *Collaborating Centre for Reference Research on Salmonella, Institut*, M100-S16, v. 26, n. 6, 2009.

CHAVES, L.C.D. Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável. 2004. 156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho/ UMinho, Portugal.

COELHO, M. I. S, *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2010.

CONRAD, J. C. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Research in Microbiology*, v. 163, p. 619-629, 2012.

COSTERTON, J. W, *et al.* Microbial Biofilms. *Ann. Reviews Microbiol*, v. 49, p. 711-45, 1985.

DASGUPTA, N.; ARORA, S. K.; RAMPHAL, R. FleN, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. bacteriol*, v.182, p.357-364, 2000.

DÉZIEL, E.; COMEGAU, Y.; VILLEMUR, R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57rp correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotype variants deficient in swimming, swarming, and “Twitching Motility”, *J. of Bacteriology*, v. 183, n. 4, p. 1195–1204, 2001.

FELDMAN, M, *et al.* Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun*, v.66, p.43-51, 1998.

FIGUEIREDO, E. A. P, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 19, n. 4, 2007.

FRICKS-LIMA, J, *et al.* Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, p. 309–315, 2011.

FUENTEFRIA, D. B, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008.

_____. Detecção de melato β -Lactamases e similaridade genética em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar e água superficial. 2009. 169f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre/RS.

FURTADO, G. H, *et al.* Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 30, n. 4, p. 315-9, 2007.

GALES, A. C, *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

_____. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. *Braz J Infect Dis*, v. 8, n. 4, p. 267-71, 2004.

GIAMARELLOU, R. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother*, v. 49, p. 229-33, 2002

GILLARDI, G. L. Medical Microbiology. In: L. D. Sabath. (Org.) *Pseudomonas aeruginosa*: The organism, diseases it causes, and their treatment. Vienna, Hans Huber Publishers, p. 25-30, 1980.

GIWERCMAN, B, *et al.* Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 35, p. 1008–1010, 1991.

GOOGMAN E GILMAN. Manual de Farmacologia e Terapêutica. AMGH Editora Ltda, 1219p, 2010.

HAJJARTABAR, M. Poor- quality water in swimming pools associated with a substantial risk of otitis externa due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci Technol*, v. 50, n. 1, p. 63-7, 2004.

HARRIS, A.D, *et al.* Risk factors for piperacillin-tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Antimicrob. Agents Chemother*. V. 46, p. 854-858, 2002.

HOIBY, N, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes and Infection*, v. 3, p. 23–35, 2001.

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP: Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares, 2012-2014. Comissão de controle de infecção hospitalar, Coordenadora Anna Sara S. Levin...[*et al.*]- 5. ed., São Paulo. 2011.

HUANG, H.; HANCOCK, R. E. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, v. 178, n. 11, p. 3085-90, 1996.

KIFFER, C, *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gramnegative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC. Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 3, p. 216-24, 2005.

KUMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection*, v.9, p. 1203-14, 2004.

LANDSPERGER, W. J, *et al.* Inhibition of Bacterial Motility with Human Antiflagellar Monoclonal Antibodies Attenuates *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Pneumonia in the Immunocompetent Rat. *infection and immunity*, v. 62, n. 11, p. 4825-4830, 1994.

LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, v. 69, n. 12, p.1555-1623, 2009.

LIMA, M. E.; ANDRADE, D.; HAAS, V. J. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de Unidade de Terapia Intensiva. *Rev Bras Ter Intensiva*, v. 19, n. 3, p. 342-7, 2007.

LIS, J.T. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. v. 65, n. 1, p. 347-53, 1980.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, v. 34, n. 5, p. 634-40, 2002.

MACHADO, R. M.; CARVALHO, D. V.; OLIVEIRA, A. D. Aspectos epidemiológicos das infecções hospitalares no centro de terapia intensiva de um hospital universitário. *R. Enferm. Cent. O. Min.*, v. 1, n. 1, p. 9-16, 2011.

MAGALHAES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – Uma revisão técnica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 64, n. 2, p.155-161, jul.-dez. 2000.

MATTICK, J. S. Type IV Pili and “Twitching Motility”. *Annu. Rev. Microbiol*, v. 56, p. 289-314, 2002.

MCNEIL, S. A, *et al.* Outbreak of sternal surgical site infections due to *Pseudomonas aeruginosa* traced to a scrub nurse with onychomycosis. *Clin Infect Dis*, v. 33, n. 317-23, 2001.

MEDEIROS, L. V.; VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G. M. T. Ocorrência de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* cloro resistentes em águas de diferentes origens, *actascibiolsci*, v. 29, n. 3, 2007.

MENDES, C, *et al.* Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brasil 2002. *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2005.

MONTIE, T. C, *et al.* Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the bured-mouse model. *Infect Immun*, v. 38, p.1296-8, 1982.

MOOLENAAR, R. L, *et al.* A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 21, p. 80-5, 2000.

NEUSELY, S, *et al.* Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. São Paulo - Livraria Varela Editora. 258p. 2010.

NEVES, P. R, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab.*, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem*, v. 269, n. 6, p. 3905-8, 1994.

NIKBIN, V. S, *et al.* Pulsed field gel electrophoresis & plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran. *Indian. J. Med. Res.*, v. 126, p. 146-151, 2007.

OLIVEIRA, A. C, *et al.* Isolation of *pseudomonas aeruginosa* strains from dental office environments and units in barretos, state of são paulo, brazil, and analysis of their susceptibility to antimicrobial drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 579-584, 2008.

_____. Aspectos epidemiológicos da ocorrência do Enterococcus resistente a Vancomicina. *Rev Esc Enferm*, v. 44, n. 3, p. 725-31, 2010.

OLIVE, D.; BEAN, P. Principles and applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

OTTOW, J. C. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu. Rev. Microbiol*, v. 29, p. 79-108, 1975.

O'TOOLE, G. A.; KOTLER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiol*, v. 30, p. 295-304, 1998-A

OTSUKI, K.; GUAYCURÚS, T. V.; VICENTE, A. C. P. *Bacillus sphaericus* entomocidal potential determined by polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 1, p. 107-108, 1997.

PAITHANKAR, K. R.; PRASAD, K. S. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res*, v. 19, n. 6, p. 1346, mar, 1991.

PALLERONI, N. J. Family *Pseudomonadaceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.1, p. 141-219, 1984.

PAULA, D. M. Precauções de contato: conhecimento e comportamento dos profissionais de um centro de terapia intensiva em um hospital geral de Belo Horizonte. 2008. 106 f. Dissertação (Mestrado em Infecção hospitalar) - Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais.

PRADO, T. Avaliação da eficiência de um sistema de tratamento de efluente hospitalar por processo anaeróbio na remoção de coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos e vírus da Hepatite A. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.

PIER, G. B.; MELULENI, G.; GOLDBERG. Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the Murine Gastrointestinal Tract Is Effectively Mediated by O-Antigen-Specific Circulating Antibodies. *infection and immunity*, v. 63, n. 8, p. 2818-25, 1995.

QUINTEIRA, S. E PEIXE, L. Multiniche Screening Reveals the Clinically Relevant Metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Far from the Hospital Setting: an Ongoing Dispersion Process. *Appl Environ Microbiol*, v.72, p. 3743-3745, 2006.

RAMSEY, M. M.; WHITELEY, M. *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. *Molecular Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 1075-87, 2004.

RASHID, M. H. E KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*, v. 97, p. 4885-90, 2000.

RESENDE, A. C. B. Detecção de microrganismos presentes no efluente hospitalar e na estação de tratamento de esgoto de Goiânia: presença de bactérias gram-negativas resistentes aos antimicrobianos. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) - Universidade Católica de Goiás.

SADER, H. S, *et al.* IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem- resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect*, v. 11, n. 1, p. 73-6, 2005.

SAMPAIO, J. L. M. Consenso em detecção de resistência bacteriana aos antimicrobianos em bacilos Gram-negativos. *Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia*, v. 3, p. 18-27, 2008.

SANTOS, S. M. L. Caracterização e Comparação Fenotípica entre Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de Água de Consumo da Região Ribeirinha e de Hospital da cidade de Porto Velho-RO. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica) - Universidade Federal de Rondônia – UNIR.

SAUER, K, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as biofilm. *J. Bacteriol*, v. 184, p. 1140-54, 2002.

SASTRY, P. A, *et al.* Studies on the primary structure and antigenic determinants of pili isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem Cell Biol*, v. 63, p. 284-291, 1985.

SCHEFFER, M. C, *et al.* Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Rev. Soc. Bras de Medicina Tropical*, v. 43, n. 4, p. 367-371, 2010.

SILVA, C. H. P. M.; SILVA, P. M. Bacteriologia: Um texto ilustrado. Ed. Eventos, Rio de Janeiro, Brasil, p. 285–315, 1999.

SINGH, A, *et al.* Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SOUSA, C. M, *et al.* Responsabilidade civil dos profissionais de enfermagem nos procedimentos invasivos. *Rev Bras Enferm*, v. 62, n. 5, p. 717-22, 2009.

STOODLEY, P, *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, v. 56, p. 187-209, 2002.

TAVARES, W. Resistência Bacteriana. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3.ed, São Paulo, Atheneu, p. 55-144, 2001.

TENOVER, F. C, *et al.* Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TRABULSI, L. R E ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4.ed, Sao Paulo: Atheneu, 2004.

TRAUTMANN, M.; MICHALSKY, T.; WIEDECK, H. Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. *Infect control hosp Epidemiol*, v. 22, p. 49-52, 2001.

TUMÉO, E, *et al.* Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 211, p. 200-204, 2008.

VALLET, I. Formation de biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa*: mise en évidence de nouveaux gènes impliqués dans le processus d'adhérence. Tese (Doutorado em Microbiologia). Université Paris, 2003.

VAN DER WEND, E.; CHARACKLIS, W. G. Biofilms in Potable Water Distribution Systems. In : Drinking Water Microbiology, Gordon A. McFeters Editor, Springer-Verlag, N. Y. Inc. p. 250-268, 1990.

VECCHIA, A. D, *et al.* Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil, *Health and Environment Journal*, v. 10, n. 2, p. 65-70. 2009.

WALKER, J. T, *et al.* Heterogeneous Mosaic Biofilm – A Haven for Waterborne Pathogens. In : Microbial Biofilms, Series Editor J. M. Lynch, *Press Syndicate of the University of Cambridge*, p. 196-204, 1995.

WEBB, S. J.; LAU, M.; KJELLEBRG, S. Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Developmente. *Jornal of Bacteriology*, v. 186, n. 23, p. 8066–8073, 2004.

YAMAMOTO, S.; KASAI, H.; ARNOL, D. A. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from de nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes. *Microbiology*, v.146, p. 2385-2394, 2000.

YAMANE, K. *et al.* 16S rRNA methylase-producing, Gram-negative pathogens, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 4, p. 642-6, 2007.