



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2003

Marta Cristina Oliveira Martins Tacão **Caracterização molecular de estirpes de *Aeromonas* spp. resistentes a antibióticos beta-lactâmicos**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Prof. Dr. António Carlos Matias Correia, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Dr. Edgar Figueiredo da Cruz e Silva

professor associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Maria José Félix Saavedra

professora auxiliar do Departamento de Higiene e Sanidade da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Dra. Maria Angela Sousa Dias Alves Cunha

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. António Carlos Matias Correia

professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. António Correia, agradeço a oportunidade de desenvolver este trabalho e também o apoio e confiança. E porque nem só com trabalho se concluem projectos, agradeço também a amizade e boa disposição. Venha o próximo!

À Prof. Dra. Maria José Saavedra agradeço a cedência das estirpes da sua colecção particular e também a disponibilidade e interesse demonstrados durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dra Claudine Fumè e ao Prof. Dr. David Miñana agradeço a cedência de estirpes referência e estirpes tipo usadas neste trabalho.

À Sandra Novais agradeço a colaboração imprescindível para a realização deste trabalho.

À Sara pela ajuda na identificação dos isolados em colaboração com o Hospital Distrital de Aveiro.

Às funcionárias do sector de Microbiologia, Helena Dias ("Lenita") e Conceição Carvalho, pela disponibilidade sempre demonstrada.

Aos amigos de "bancada", Claudia, Anabela, Cristina, Sofia, Nuno, Ana, Isabel e Joca, agradeço todos os minutos. Agradeço as conversas de corredor, as piadas, as trocas de ideias, as músicas, as noitadas em dia de campanha, as sugestões, questões, palpites, ajudas, sobretudo, a pachorra. Vou mal acostumada... "Foi bom pra vocês? Pra mim foi um prazer, como sempre!"

Aos meus chefitos, Joca e Isabel um obrigado sem tamanho. Sem os vossos truques, dicas e segredos não teria sido tão "fácil".

Aos amigos que fiz em terras do Norte, biólogos, engenheiros, "wursts", portugueses ou não, fico grata pela vossa amizade permanente ao longo destes anos. Como estamos crescidos.... E que bom tem sido crescer convosco!

Aos mouros gauleses que tantas vezes perguntaram pelas "Anfromonas", "Ampolomonas", "Ancromonas" e outras monas mais... Obrigado pela força, pelos beijos e abraços e por me corrigirem este sotaque do "nuorte" que teima em aparecer... É sempre uma delícia estar convosco, seus malucos!

Ao avô Manuel e à avó Hermínia, os meus maiores fãs, agradeço o incentivo e carinho ao longo de todos estes anos.

Finalmente, um agradecimento especial aos meus pais. Não há palavras que cheguem para agradecer tudo o que vos devo, tudo o que fizeram de mim e por mim. E que paciência!

resumo

Estudos feitos em todo o mundo têm demonstrado que *Aeromonas* spp. estão distribuídas universalmente e podem ser isoladas de amostras clínicas, alimentares e ambientais. São exemplo de microrganismos patogênicos emergentes. Em sistemas de aquacultura, as infecções bacterianas são a causa principal das quebras de produtividade. O uso intensivo de antibióticos beta-lactâmicos como agentes terapêuticos levou ao aparecimento de estirpes multiresistentes. Neste trabalho, foram analisadas estirpes de *Aeromonas* isoladas de amostras de tecido da pele e rins de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) de uma aquacultura da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Foram incluídas também estirpes de referência. Os testes de susceptibilidade a antibióticos beta-lactâmicos revelaram que a maior parte dos isolados é resistente a penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração. Em 7 isolados foi detectada resistência a carbapenemos (imipenemo). Por forma a caracterizar o mecanismo de resistência dos isolados resistentes ao imipenemo, foram desenhados "primers" para amplificar por PCR genes de resistência homólogos a *cphA* e/ou *imiS*, que codificam as metalo-beta-lactamases CphA e ImiS, já descritas em *Aeromonas* spp.. Em 5 dos isolados e em 2 estirpes referência, foi possível amplificar por PCR, com os "primers" desenhados, Aer-R e Aer-F, um fragmento com o tamanho esperado, cerca de 670 pb, a partir do DNA total das estirpes de *Aeromonas* spp.. A análise das sequências nucleotídicas e das sequências de aminoácidos deduzidas revelou tratarem-se de fragmentos de DNA de genes homólogos a *cphA/imiS*, que codificam para metalo-beta-lactamases de classe B, subclasse B2. Procedeu-se também à detecção de sequências homólogas por hibridação DNA-DNA, usando uma sonda marcada por PCR com os "primers" Aer-R e Aer-F. Ocorreu hibridação entre o fragmento de DNA usado como sonda e o DNA de todos os isolados que apresentavam actividade de carbapenemase. Pretendeu-se, também, caracterizar os isolados ao nível molecular, através de técnicas de tipagem genética como ARDRA e rep-PCR. Os perfis ARDRA obtidos por digestão com *Mbol* e *AluI* permitiram identificar os isolados como *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas media*. Os perfis REP- e BOX-PCR resultantes mostraram-se mais complexos que os perfis ARDRA e permitiram avaliar o grau de diversidade genómica dos isolados, mostrando-se úteis na tipagem genética de isolados deste grupo de procariotas.

abstract

Worldwide studies have demonstrated that *Aeromonas* spp. are universally distributed and widely isolated from clinical, environmental and food samples. They are an example of emerging bacterial pathogens. In aquaculture explorations, bacterial infectious diseases are the major cause of decreases in productivity. The extensive use of beta-lactam antibiotics as therapeutic agents has generated multiresistant strains. In this work, tissue samples from the skin and kidney of rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) from a fish farm at the Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro were examined for the presence of *Aeromonas* spp. Reference strains were also included in this study. The susceptibility to antibiotics tests revealed that most of these strains are resistant to penicillins and 1st generation cephalosporins. It was detected resistance to carbapenems (imipenem) in 7 aeromonads. In order to understand the resistance mechanism of the strains that showed resistance to carbapenems, primers Aer-R and Aer-F were designed to detect by PCR, homologous genes to *cphA/imiS*, which code for the metallo-beta-lactamases CphA and ImiS, already described in *Aeromonas* spp. In 5 isolates and in 2 reference strains, it was possible to amplify by PCR a DNA fragment with 670 bp as expected, whose sequence was determined. The nucleotide and deduced amino acid sequence analysis revealed that these are DNA fragments homologous to *cphA/imiS*, that code for class B, subclass B2 metallo-beta-lactamases. DNA-DNA hybridization was also applied using a DNA fragment, amplified by PCR with primers Aer-R and Aer-F, as probe. There was hybridization between the probe and the DNA from all the strains that showed resistance to carbapenems. Aeromonads isolates were also compared using different molecular typing techniques like ARDRA and rep-PCR. ARDRA profiles obtained from enzymatic digestion of rDNA 16S with *Mbol* and *AluI*, allowed the identification of strains as *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas media*. Fingerprinting by REP- and BOX- PCR provided complex genomic profiles, proving that these are good methods for typing aeromonads.

Índice

I. Introdução

1. Resistência bacteriana a antibióticos beta-lactâmicos	3
1.1 Antibióticos beta-lactâmicos	3
1.2 Mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos	4
1.2.1 Beta-lactamases	5
1.2.1.1 Classificação de beta-lactamases	6
1.2.1.2 Carbapenemases	8
1.2.1.2.1 Beta-lactamases serínicas	8
1.2.1.2.2 Metalo-beta-lactamases	9
2. O género <i>Aeromonas</i>	11
2.1 Descrição do género	11
2.2 Taxonomia do género	12
2.3 Beta-lactamases no género <i>Aeromonas</i>	14
3 Resistência bacteriana em sistemas de aquacultura	16
4. Tipagem genética de microrganismos	18
4.1 "Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis"-ARDRA	19
4.2 rep-PCR	19
5. Objectivos do trabalho	21

II. Material e Métodos

1. Estirpes	25
2. Meios de cultura	26
3. Conservação de microrganismos	27

4. Reagentes	27
5. Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos	27
5.1 Método de difusão em agar com discos de antibióticos	27
6. Marcadores de peso molecular	28
7. Preparação de DNA total	28
8. Hidrólise de DNA por endonucleases de restrição	29
9. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR	29
10. Electroforese de DNA	30
10.1 Electroforese em gel de agarose	30
10.2 Visualização de DNA	31
10.3 Determinação do tamanho de fragmentos de DNA em géis de agarose	31
11. Transferência de fragmentos de DNA separados em gel de agarose para membranas de nylon	31
12. Detecção de sequências homólogas por hibridação DNA-DNA	32
12.1 Marcação não radioactiva de sondas de DNA	32
12.1.1 Marcação da sonda por PCR	32
12.1.2 Marcação "random primed"	33
12.2 Hibridação	34
12.3 Lavagem e detecção	35
13. ARDRA- <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>	36
14. rep-PCR	37
15. Determinação de sequências nucleotídicas a partir de produtos de PCR- Sequenciação cíclica	38

III. Resultados

1. Isolamento e identificação dos isolados	43
2. Susceptibilidade a antibióticos	43
3. Detecção de elementos genômicos codificando para genes de resistência a carbapenemos	44
3.1 Detecção por PCR do gene que codifica para metalo-beta-lactamases em <i>Aeromonas</i> spp.	45
3.2 Determinação da sequência nucleotídica dos fragmentos amplificados e análise das sequências	46
3.3 Detecção de sequências homólogas por hibridação DNA-DNA (marcação da sonda por PCR com "primers" para <i>cphA/imiS</i>)	48
4. Tipagem molecular de isolados de <i>Aeromonas</i> spp.	49
4.1 ARDRA	49
4.2 rep-PCR	52

IV. Discussão e Conclusões

1. Identificação de isolados membros do género <i>Aeromonas</i>	57
2. Pesquisa de genes de resistência a carbapenemos em isolados de <i>Aeromonas</i> spp.	58
3. Tipagem molecular de isolados de <i>Aeromonas</i> spp	61
Conclusões	65

V. Bibliografia

Bibliografia	69
--------------	----

V. Anexos

Anexo 1: Marcadores de peso molecular para DNA	83
Anexo 2: "Primers"	84
Anexo 3: Endonucleases de restrição	85

Índice de tabelas

Tabela 1:	Sistemas de classificação molecular e funcional de beta-lactamases	Pág 7
Tabela 2:	Subgrupos funcionais das metalo-beta-lactamases	Pág 10
Tabela 3:	Classificação estrutural das metalo-beta-lactamases	Pág 11
Tabela 4:	Espécies e grupos de hibridação válidos no género <i>Aeromonas</i>	Pág 13
Tabela 5:	Co-produção de metalo-beta-lactamases e outras beta-lactamases em <i>Aeromonas</i> spp	Pág 16
Tabela 6:	Estirpes de <i>Aeromonas</i> utilizadas neste trabalho	Pág 25
Tabela 7:	Identificação dos isolados com os sistemas API20NE e VITEK	Pág 43
Tabela 8:	Classificação da susceptibilidade a antibióticos beta-lactâmicos de isolados e estirpes referência de <i>Aeromonas</i> spp.	Pág 44
Tabela 9:	Tabela de homologias construída com base na percentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos deduzidas de beta-lactamases de classe B de <i>Aeromonas</i> spp. e dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp.	Pág 47

Índice de figuras

Figura 1:	Nível de resolução relativa de várias técnicas de tipagem de DNA (Adaptado de Louws <i>et al.</i> , 1996).	Pág 19
Figura 2:	Alinhamento das sequências de aminoácidos de CphA e ImiS	Pág 45
Figura 3:	Electroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados por PCR com os primers Aer-R e Aer-F, de DNA de estirpes isoladas e estirpes referência.	Pág 46
Figura 4:	Alinhamento das sequências de aminoácidos dos fragmentos de DNA amplificados por PCR.	Pág 47
Figura 5:	Alinhamento das sequências de aminoácidos de metalo-beta-lactamases já conhecidas e das sequências de aminoácidos deduzidas de A1, A3, A4, A8 e A5.	Pág 48
Figura 6:	Detecção por hibridação DNA-DNA de genes homólogos a <i>cphA/imiS</i> , no DNA total das estirpes de <i>Aeromonas</i>	Pág 49
Figura 7:	Perfis ARDRA obtidos por digestão com <i>MboI</i> e <i>AluI</i> .	Pág 50
Figura 8:	Perfis padrão obtidos com a técnica ARDRA	Pág 51
Figura 9:	Perfis REP e BOX-PCR	Pág 52
Figura 10:	Dendrograma dos perfis BOX e REP-PCR combinados.	Pág 53

Lista de abreviaturas

Amp: ampicilina	min.: minuto
AP-PCR: “Arbitrarily Primed-PCR”	ml: mililitro
ARDRA: “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”	MLST: “Multilocus Sequence Typing”
ATP: adenosina-5'-trifosfato	mM: milimolar
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	mRNA: RNA mensageiro
CECT: “Colección Española de Cultivos Tipo”	NaCl: cloreto de sódio
cm: centímetro	NAG: N-acetilglucosamina
dATP: desoxiadenosina-5'-trifosfato	NaOH: hidróxido de sódio
dCTP: desoxicitidina-5'-trifosfato	NBT: Nitroblue Tetrazolium Salt
dGTP: desoxiguanidina-5'-trifosfato	NCCLS: “National Committee for Clinical Laboratory Standards”
DIG: digoxigenina	nm: nanómetro
DNA: ácido desoxiribonucleico	pb: pares de bases
dsDNA: DNA de cadeia dupla	PBPs: “Penicillin Binding Proteins”
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato	PCR: “Polymerase Chain Reaction”
dTTP: desoxitimidina-5'-trifosfato	RAPD: “Random Amplified Polymorphic DNA”
dUTP: desoxiuridina-5'-trifosfato	rDNA: DNA que codifica para RNA ribossomal
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético	REP-PCR: “Repetitive Extragenic Palindromic- PCR”
ER: endonucleases de restrição	RNA: ácido ribonucleico
ERIC-PCR: “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- PCR”	RNase: ribonuclease
EtBr: brometo de etídeo	rpm: rotações por minuto
g: grama	rRNA: RNA ribossômico
h: hora(s)	seg.: segundo
HCl: ácido clorhídrico	SSC: citrato de sódio salino
HG: “Hybridization Group”	TAE: Tris-Acetato-EDTA
IPTG: isopropil- β -D-galactopiranosídeo	TBE: Tris-Borato-EDTA
Kb: quilobases	TE: Tris-EDTA
KCl: cloreto de potássio	Tm: temperatura de melting
KDa: quilodalton	U: unidades de enzima
l: litro	UV: ultravioleta
M: molar	V: volts
mg: miligrama	v/v: volume por volume
MgCl₂: cloreto de magnésio	

Tabela de abreviaturas de aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de três letras	Abreviatura de uma letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

I. **INTRODUÇÃO**

1. Resistência bacteriana a antibióticos beta-lactâmicos

1.1 Antibióticos beta-lactâmicos

Os antibióticos beta-lactâmicos representam mais de metade do número total de agentes antimicrobianos disponíveis. A sua eficácia e baixa toxicidade justificam o seu amplo desenvolvimento e o facto de representarem os agentes antibacterianos mais usados no tratamento de infecções causadas tanto por microrganismos gram-positivos como por microrganismos gram-negativos (Kotra e Mobashery, 1998; Page, 1999; Therrien e Levesque, 2000). Actualmente, esta classe de antibióticos está dividida em vários grupos nomeadamente, monobactâmicos, cefalosporinas, penicilinas e carbapenemos. Os antibióticos beta-lactâmicos apresentam como estrutura comum, um anel beta-lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de azoto, com radicais substituintes. O anel beta-lactâmico encontra-se fundido com um anel tiazolidina nas penicilinas ou com um anel dihidrotiazina nas cefalosporinas. Nos monobactâmicos mantém-se apenas o anel beta-lactâmico e nos carbapenemos observa-se a presença de carbono em substituição de enxofre no anel tiazolidina.

O primeiro antibiótico beta-lactâmico utilizado como agente terapêutico foi a penicilina, nos anos 40 (Levy, 1998; Livermore, 1998; Crowder e Walsh, 1999). A eficácia dos antibióticos beta-lactâmicos é constantemente desafiada pela emergência de estirpes bacterianas resistentes. A actividade dos antibióticos beta-lactâmicos depende da sua capacidade para se difundir pela membrana celular bacteriana, da afinidade do antibiótico para as enzimas alvo designadas por PBPs ("Penicillin-Binding Proteins"), e da estabilidade do antibiótico face à hidrólise mediada por enzimas bacterianas (Dever e Dermody, 1991; Bush e Miller, 1998; Kotra e Mobashery, 1999). O mecanismo de acção dos antibióticos beta-lactâmicos consiste na inibição da biosíntese da parede celular bacteriana, nomeadamente da matriz de peptidoglicano. A síntese de peptidoglicano é mediada por PBPs, que constituem o alvo principal para estes antibióticos. Essencialmente, as PBPs possuem actividade de carboxipeptidase e de transpeptidase, e estão envolvidas em vários passos do processo de construção, manutenção e regulação da matriz de peptidoglicano. A alteração covalente das PBPs é o passo crítico que altera a sua função biológica, nomeadamente durante a etapa final da biosíntese de peptidoglicano, durante a qual ocorrem reacções de "cross-linking" (ligações entre cadeias vizinhas) que asseguram a rigidez da

parede celular bacteriana, essencial para a sobrevivência da célula (Bush *et al.*, 1998; Dever e Dermody, 1991; Kotra e Mobashery, 1999; Spratt, 1994). Tipper e Strominger sugeriram que a estrutura central de um antibiótico beta-lactâmico, como por exemplo a penicilina, é semelhante à porção terminal acil-D-Ala-D-Ala do peptidoglicano bacteriano. Assim, as PBPs reconhecem e ligam-se às moléculas de penicilina ou de outros antibióticos beta-lactâmicos, confundindo-as com o seu substrato natural (Tipper e Strominger, 1965). A estrutura e composição da molécula de peptidoglicano apresentam determinados aspectos que são específicos de bactérias, o que contribui para a elevada especificidade dos antibióticos beta-lactâmicos (Rasmussen e Bush, 1997).

1.2 Mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos

O uso sistemático de antibióticos beta-lactâmicos resultou na disseminação indesejável de estirpes resistentes. A produção de beta-lactamases é o mecanismo de resistência bacteriana mais comum. Estas enzimas hidrolisam o anel beta-lactâmico de modo a inactivar o antibiótico, tal acontecendo com todas as classes de antibióticos beta-lactâmicos. Foram descritas beta-lactamases em estirpes bacterianas, muito antes de estar disponível penicilina como agente terapêutico (Abraham e Chain, 1940; Levy, 1998).

Para além da degradação enzimática mediada por beta-lactamases, estão descritos outros mecanismos de resistência bacteriana que incluem a modificação de PBPs, alteração na permeabilidade da membrana externa e o desenvolvimento de sistemas eficazes de efluxo. Alterações na permeabilidade da membrana diminuem o influxo do antibiótico e, conseqüentemente, diminui a sua concentração no espaço periplásmico (Dever e Dermody, 1991). A entrada de nutrientes nas células bacterianas gram-negativas é assegurada pela presença de proteínas específicas na membrana externa, designadas por porinas, que estão implicadas na formação de canais que permitem a difusão de nutrientes e outras substâncias (incluindo antibióticos) entre o meio extracelular e o espaço periplásmico (Nikaido, 1994). Normalmente, estes mecanismos não são responsáveis por níveis elevados de resistência uma vez que, apesar da reduzida permeabilidade da membrana externa, a maior parte das moléculas de antibiótico atingem o espaço periplásmico. Nos casos em que se verificam níveis de resistência elevados, pode ocorrer a combinação de dois tipos de mecanismos

de resistência, nomeadamente a redução da permeabilidade e a produção de beta-lactamases (Martínez-Martínez *et al.*, 1999). Em microrganismos com permeabilidade reduzida, a degradação enzimática é mais eficiente devido à menor concentração de antibiótico no espaço periplásmico (Dever e Dermody, 1991). A produção de enzimas alvo (PBPs) alteradas pode dever-se à aquisição de novos genes localizados em plasmídeos ou transposões, ou a mutações nos genes que codificam PBPs (Spratt, 1994). A alteração da estrutura das PBPs ao nível do seu local catalítico afecta também a função normal destas enzimas. Por esta razão, este mecanismo de resistência é pouco frequente, especialmente em microrganismos gram-negativos (Kotra e Mobashery, 1999).

A tendência actual é para o aumento do número de organismos patogénicos com múltiplos mecanismos de resistência. Consequentemente aumenta o número de estirpes multiresistentes (Ahmad *et al.*, 1999) e também o número de agentes infecciosos resistentes a todos os antibióticos disponíveis, incluindo carbapenemos que são muitas vezes considerados como antibióticos de último recurso (Bradley *et al.*, 1999; Bush, 1999; Norrby, 1995).

Um microrganismo pode apresentar resistência intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma propriedade genética estável, derivada de mutações no DNA cromossomal e que é partilhada por todos os membros do mesmo género (ou da mesma espécie). A resistência adquirida resulta de trocas genéticas com outro microrganismo que pode ou não pertencer à mesma espécie. Os genes de resistência podem ser transferidos entre bactérias, por exemplo, por conjugação ou transformação. Podem permanecer em plasmídeos ou ser integrados no cromossoma bacteriano, por exemplo, por transposição. Qualquer dos processos permite a transmissão para a geração seguinte (MacManus, 1997).

1.2.1 Beta-lactamases

A resistência a antibióticos beta-lactâmicos está frequentemente relacionada com a produção de beta-lactamases, especialmente em bactérias gram-negativas (Kotra e Mobashery, 1999; Crowder *et al.*, 1999). As beta-lactamases são produzidas por espécies gram-negativas e por algumas gram-positivas. O mecanismo de resistência mais comum em microrganismos gram-positivos é a modificação de PBPs, as enzimas alvo dos antibióticos beta-lactâmicos (Bush, 1999).

Em bactérias gram-negativas, as beta-lactamases podem ser transferidas livremente entre espécies, com níveis elevados de produção de enzimas cataliticamente eficientes. Muitas vezes, uma pequena alteração no promotor do gene que codifica para uma beta-lactamase pode resultar num aumento de resistência por superprodução da enzima. Em consequência, beta-lactamases com baixa actividade catalítica podem tornar-se sérias ameaças à aplicação de antibióticos beta-lactâmicos para o tratamento de infecções bacterianas (Bush, 1999; Bradford, 2001).

Os genes estruturais que codificam beta-lactamases podem localizar-se no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos, sendo assim designadas por beta-lactamases cromossomais e beta-lactamases plasmídicas. A resistência mediada por plasmídeos pode ser disseminada por conjugação não só entre microrganismos da mesma espécie ou género, mas também entre microrganismos filogeneticamente distantes. A expressão de beta-lactamases cromossomais é normalmente induzida ou reprimida pela exposição a antibióticos beta-lactâmicos (Dever e Dermody, 1991; Kotra e Mobashery, 1998; Bush, 1999).

1.2.1.1 Classificação de beta-lactamases

Têm sido propostos vários sistemas de classificação de beta-lactamases com base em diferentes características, tais como características moleculares e funcionais. O primeiro esquema de classificação foi proposto por Richmond e Sykes, em 1973, e distinguia cinco classes de beta-lactamases produzidas apenas por bactérias gram-negativas (Richmond e Sykes, 1973). Em 1980, Ambler e colaboradores propuseram um sistema de classificação que agrupava as beta-lactamases em quatro classes com base em características moleculares, designadas de A a D. Às classes A (penicilinasas), C (cefalosporinasas) e D (oxacilinasas) pertencem todas as enzimas que apresentam serina no seu centro activo. A classe B (metalo-beta-lactamases) engloba enzimas que possuem um átomo de zinco no seu centro activo, em vez de serina (Ambler, 1980).

Com o aparecimento de novas beta-lactamases e com a disponibilidade de mais dados bioquímicos que incluem o perfil de substratos e de inibidores de beta-lactamases, em 1989 Bush e colaboradores delinearam um novo esquema de classificação, que em 1995 foi completado (Bush, 1989; Bush *et al.*, 1995). Neste sistema as beta-lactamases são divididas, num passo inicial, de acordo

com a sua inibição pelo agente quelante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), e seguidamente de acordo com o perfil de substratos hidrolisados. Assim, as beta-lactamases são classificadas em quatro grupos principais. O grupo funcional 1 (classe molecular C) inclui enzimas que não são inibidas pelo EDTA e hidrolisam preferencialmente a cefaloridina, sendo assim designadas por cefalosporinas. O grupo funcional 2 (classes A e D de Ambler) engloba enzimas que não são inibidas pelo EDTA, mas sim pelos inibidores de beta-lactamases, nomeadamente o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam, e que hidrolisam preferencialmente a benzilpenicilina, denominadas por penicilinas. Inclui também beta-lactamases de espectro amplo. O grupo 3 (classe molecular B) inclui beta-lactamases que são inibidas pelo EDTA, mas não por inibidores de beta-lactamases, e que hidrolisam carbapenemos, sendo por isso designadas por carbapenemases. No grupo 4 são incluídas enzimas não inibidas pelo EDTA, mas que não se adequam a nenhuma das categorias anteriores. A tabela seguinte compara os sistemas de classificação de beta-lactamases mais importantes.

Tabela 1: Sistemas de classificação molecular e funcional de beta-lactamases

Grupo funcional (Bush <i>et al.</i> , 1995)	Classe molecular de Ambler	Perfil de substratos	Inibição com EDTA AcClav		Exemplos
1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas tipo AmpC
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de bactérias gram-positivas
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6
2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36
2c	A	Penicilinas, carbenicilinas	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas, cloxacilinas	±	-	OXA-1 a OXA-11
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinase indutível de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos	+	-	NMC-A, Sme-1
3	B	Maioria dos beta-lactâmicos, incluindo carbapenemos	-	+	L1, CphA, ImiS, ImiH
4	-	Penicilinas	-	?	Penicilinase de <i>Pseudomonas cepacia</i>

1.2.1.2 Carbapenemases

Nos últimos anos aumentou o número de novas beta-lactamases descritas capazes de hidrolisar carbapenemos como o imipenemo e meropenemo. Estes antibióticos beta-lactâmicos têm um espectro de acção alargado, sendo eficazes no tratamento de infecções causadas quer por microrganismos gram-negativos quer por microrganismos gram-positivos resistentes à maioria dos antibióticos conhecidos. Os carbapenemos apresentam elevada resistência à acção hidrolítica de beta-lactamases, sendo muitas vezes referidos como antibióticos de último recurso, usados apenas no tratamento de infecções graves, em ambientes hospitalares (Bradley *et al.*, 1999; Bush e Miller, 1998; Norrby, 1995).

O grupo das carbapenemases é o mais diverso de todas as beta-lactamases (Rasmussen e Bush, 1997; Paton *et al.*, 1993; Donald *et al.*, 2000) e talvez por isso, as publicações existentes sejam controversas quanto à utilização do termo "carbapenemase" (Thomson e Moland, 2000). Livermore refere-se a carbapenemases como "todas as enzimas com actividade hidrolítica significativa em carbapenemos" (Livermore, 1995) enquanto Rasmussen e Bush se referem a "enzimas de classe B que hidrolisam preferencialmente carbapenemos" (Rasmussen e Bush, 1997). Lavaki e colaboradores sugerem que as verdadeiras carbapenemases são enzimas do tipo CphA, identificadas em *Aeromonas* spp., que hidrolisam apenas carbapenemos (Laraki *et al.*, 1999).

No entanto, na maior parte da literatura, este grupo é referido como um grupo de enzimas com actividade hidrolítica em carbapenemos, composto por beta-lactamases serínicas (classes A e D de Ambler) e por metalo-beta-lactamases (classe molecular B).

1.2.1.2.1 Beta-lactamases serínicas

As beta-lactamases de classe A (subgrupo funcional 2f) já descritas incluem as enzimas NMC-A, IMI-1, Sme-1, Sme-2, KPC-1 e KPC-2. Foram identificadas em isolados clínicos de *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae*. Com a excepção de KPC-1 e KPC-2, são todas beta-lactamases cromossomais inibidas pelo ácido clavulânico e com espectro de acção alargado incluindo, para além dos carbapenemos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Naas e Nordmann, 1994; Naas *et al.*, 1994; Rasmussen *et al.*, 1996; Yigit *et al.*, 2001). As beta-lactamases serínicas de classe D (subgrupo funcional 2d) para além do imipenemo, também hidrolisam penicilinas e

cefalosporinas. Fazem parte desta classe as enzimas ARI-1 e ARI-2, identificadas em isolados de *Acinetobacter baumannii* (Donald *et al.*, 2000; Afzal-Shah *et al.*, 1999). A incidência das beta-lactamases serínicas continua extremamente rara. A maioria das carbapenemases são metalo-enzimas, assim designadas porque requerem a presença de um ou dois cátions de zinco no centro activo (Bush *et al.*, 1995).

1.2.1.2.2 Metalo-beta-lactamases

As metalo-beta-lactamases são enzimas da classe B de Ambler (grupo funcional 3) inibidas pelo EDTA, mas não por inibidores de beta-lactamases convencionais tais como ácido clavulânico, o tazobactam ou o sulbactam (Crowder e Walsh, 1999; Rasmussen e Bush, 1997).

As metalo-beta-lactamases foram divididas em três subgrupos funcionais (tabela 2) por Bush e colaboradores (Bush *et al.*, 1995). Ao subgrupo funcional 3a pertencem enzimas que, para além de carbapenemos, hidrolisam também penicilinas e cefalosporinas, mas não monobactâmicos. Neste subgrupo foram descritas metalo-beta-lactamases cujos genes estruturais se localizam no cromossoma bacteriano e também em plasmídeos ou integrões, o que aumenta a relevância clínica destas enzimas devido à possibilidade de disseminação destes elementos genéticos (Laraki *et al.*, 1999; Lauretti *et al.*, 1999; Poirel *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1993). Fazem parte deste subgrupo as beta-lactamases cromossomais CcrA (*Bacteroides fragilis*), L1 (*Stenotrophomonas maltophilia*) e também IMP-1, enzima cujo gene estrutural se localiza num plasmídeo e pode ser encontrada em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, entre outras (Rasmussen *et al.*, 1990; Sanchagrin *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1994; Laraki *et al.*, 1999; Senda *et al.*, 1996; Osano *et al.*, 1994). O subgrupo funcional 3b inclui enzimas que hidrolisam preferencialmente carbapenemos, sendo por isso consideradas como as verdadeiras carbapenemases. Inclui enzimas como CphA e ImiS (*Aeromonas* spp.). Apesar de não conferirem resistência a penicilinas ou cefalosporinas, a combinação com outras beta-lactamases serínicas confere ao microrganismo resistência a todas as classes de antibióticos beta-lactâmicos. Foram feitas várias tentativas para desenvolver inibidores que inactivem metalo-beta-lactamases, porém, actualmente ainda não existe um inibidor para estas enzimas. O subgrupo 3c inclui apenas a metalo-beta-lactamase FEZ-1 de *Legionella*

gormanii, que apresenta propriedades bioquímicas diferentes das enzimas pertencentes aos outros grupos, com elevada actividade enzimática sobre as cefalosporinas e a ampicilina (Fuji *et al.*, 1986; Rasmussen e Bush, 1997; Bush, 1998).

Tabela 2: Subgrupos funcionais das metalo-beta-lactamases

Grupo	Enzima	Organismo	Referências
3a	BcII	<i>Bacillus cereus</i>	Felici e Amicosante, 1995
	CcrA3	<i>Bacteroides fragilis</i>	Rasmussen <i>et al.</i> , 1994
	CcrA	<i>Bacteroides fragilis</i>	Yang <i>et al.</i> , 1995
	PCM-1	<i>Burkholderia cepacia</i>	Baxter e Lambert, 1994
	IMP-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 1991
	IMP-1	<i>Serratia marcescens</i>	Osano <i>et al.</i> , 1994
	L1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bush <i>et al.</i> , 1993
3b	CphA	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Massidda <i>et al.</i> , 1991
	CphA2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Iaconis e Sanders, 1990
	CephA3	<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i>	GenBank AY112998 (2002)
	ImiH	<i>Aeromonas hydrophila</i>	GenBank AY548797 (2003)
	ImiS	<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i>	Walsh <i>et al.</i> , 1994
	AsbM1	<i>Aeromonas jandaei</i>	Yang e Bush, 1996
	ASA-1	<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i>	Hayes <i>et al.</i> , 1996
3c	FEZ-1	<i>Legionella gormanii</i>	Sato <i>et al.</i> , 1985

Com base na análise da homologia de sequências nucleotídicas de uma série de metalo-beta-lactamases, e também de acordo com os aminoácidos conservados no centro activo, foi proposta a divisão destas enzimas em três subclasses designadas por B1, B2 e B3 (tabela 3). A subclasse B1 contém a maioria das metalo-beta-lactamases conhecidas, tais como BcII (Carfi *et al.*, 1995; Carfi *et al.*, 1998; Fabiane *et al.*, 1998), CfiA (Thompson e Malamy, 1990), BlaB (Bellais *et al.*, 1999; Massidda *et al.*, 1991; Woodford *et al.*, 2000), entre outras. A subclasse B2 inclui enzimas produzidas por membros do género *Aeromonas*, tais como CphA (Massidda *et al.*, 1991), ImiS (Walsh *et al.*, 1994) e também uma metalo-beta-lactamase descrita em *Serratia fonticola*, Sfh-I (GenBank EMBL AF197943). À subclasse B3 pertencem enzimas como L1 de *Stenotrophomonas maltophilia* (Walsh *et al.*, 1994; Sanchagrin *et al.*, 1998), FEZ-1 de *Legionella gormanii* (Boschi *et al.*, 2000), entre outras.

Tabela 3: Classificação estrutural das metalo-beta-lactamases

Grupo	Enzima	Organismo	Motivos conservados de aminoácidos (nº) no centro activo
B1	BcII	<i>Bacillus cereus</i>	His(3), Cys(1)
	CcrA	<i>Bacteroides fragilis</i>	
	IMP-1	<i>Serratia marcescens</i>	
B2	CphA	<i>Aeromonas hydrophila</i>	His(2), Asn(1), Cys(1)
	ImiS	<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i>	
	Sfh-I	<i>Serratia fonticola</i>	
B3	L1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	His(3), Ser(1)

O alinhamento de sequências de aminoácidos das metalo-beta-lactamases permitiu verificar que enzimas da classe estrutural B1 partilham motivos conservados com três histidina (His) e uma cisteína (Cys) no centro activo. Entre os membros da classe B2 como resíduos de aminoácidos conservados, encontram-se dois resíduos de histidina (His), um de asparagina (Asn) e um de cisteína (Cys) (Massidda *et al.*, 1991; Segatore *et al.*, 1993; Bush e Miller, 1998; Walsh *et al.*, 1998). No centro activo das metalo-beta-lactamases da classe B3 encontram-se três histidinas (His) e uma serina (Riccio *et al.*, 2000).

2. O género *Aeromonas*

2.1 Descrição do género

O género *Aeromonas* é constituído por bactérias gram-negativas, oxidase-positivas e catalase-positivas, heterotróficas, anaeróbias facultativas, dispersas por uma variedade de ambientes aquáticos (Holmes *et al.*, 1996). São microrganismos patogénicos primários ou secundários de peixes, anfíbios e outros animais exotérmicos. Algumas das espécies móveis (principalmente *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* bv. *sobria*) são consideradas como espécies patogénicas oportunistas de humanos, associados a septicémia em indivíduos imunodeprimidos ou portadores de doenças crónicas. Já foram isolados de infecções auriculares e de feridas infectadas, assim como de fezes de doentes com enterite, onde poderão actuar como agentes patogénicos primários (Janda e Abbott, 1998). Suspeita-se que as infecções humanas com membros do género *Aeromonas* têm, normalmente, origem em alimentos ou água, onde ocorrem comumente (Schubert, 1990a; Havelaie *et al.*, 1992; Kirov, 1993).

2.2 Taxonomia do género

Na década de 70, a maioria das espécies de *Aeromonas* era classificada em dois grupos principais. As estirpes que cresciam a temperaturas de 35°C a 37°C (mesófilas) e eram responsáveis por uma variedade de infecções humanas, eram referidas como *Aeromonas hydrophila*. As estirpes psicrófilas, que cresciam preferencialmente a temperaturas mais baixas (22°C a 28°C), e causavam infecções principalmente em peixes tais como salmonídeos, eram designadas por *Aeromonas salmonicida*. Estes dois grupos por serem fenotipicamente bem distintos eram facilmente diferenciados com base em várias características, incluindo a temperatura óptima de crescimento e a mobilidade.

Enquanto que a taxonomia de estirpes psicrófilas se tem mantido relativamente estável, o número de espécies mesofílicas tem aumentado. Por esta razão, a taxonomia do género *Aeromonas* tem sofrido muitas alterações desde a sua descrição no *Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey* (Popoff, 1984), onde foram incluídas apenas três fenoespécies mesofílicas móveis (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria*) e uma espécie psicrófila não móvel (*Aeromonas salmonicida*). Com base em estudos feitos por Popoff e colaboradores (Popoff *et al.*, 1981) e uma série de trabalhos que se seguiram usando técnicas de hibridação DNA-DNA foram definidos 12 grupos de hibridação DNA-DNA, designados por HG ("hybridization groups").

Actualmente, o número de espécies descritas aumentou de 4 (Popoff, 1984) para 16 (Allen *et al.*, 1983; Hickman-Brenner *et al.*, 1987, 1988; Schubert e Hegazzi, 1988; Schubert *et al.*, 1990a,b; Carnahan *et al.*, 1991 a,b; Martínez-Murcia *et al.*, 1992b; Esteve *et al.*, 1995b; Ali *et al.*, 1996; Huys *et al.*, 1997) e estão definidos 17 grupos de hibridação (tabela 4)(Janda, 1991; Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Esteve *et al.*, 1995; Huys e Altwegg, 1997; Huys *et al.*, 1997). O aumento do número de fenoespécies e genoespécies levou a que, em 1986, Colwell e colaboradores sugerissem a criação da sua própria família, sendo assim transferidas da família *Vibrionaceae* para a nova família *Aeromonadaceae* (Colwell *et al.*, 1986).

Tabela 4: Espécies e grupos de hibridação válidos no gênero *Aeromonas*.

HG	Estirpe tipo (†) ou referência	Espécie genômica	Espécie fenotípica
1	CECT 839 ^T	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
2	CECT 4227 ^T	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>
3	CECT 894 ^T	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
3	CDC 0434-84	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. hydrophila</i>
4	CECT 838 ^T	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
5	CDC 0862-83	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
5	CECT 4232 ^T	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
6	CECT 4224 ^T	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>
7	CECT 4245 ^T	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
8	CECT 4246	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> <i>bv sobria</i>
9	CECT 4228 ^T	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>
10	CECT 4257 ^T	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
11	ATCC 35941	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.
12	CECT 4240 ^T	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>
13	ATCC 43946	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Aer</i> Group 501
14	CECT 4255 ^T	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>
15	CECT 4199 ^T	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>
16	CECT 4342 ^T	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>
17	CECT 5176 ^T	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>
ND	CECT 4487 ^T	<i>A. enteropelogenes</i>	<i>A. enteropelogenes</i>
ND	CECT 4486 ^T	<i>A. ichthiosmia</i>	<i>A. ichthiosmia</i>

Porém, a taxonomia deste gênero continua a ser discutida e por tal, ainda não está bem definida. Por exemplo, apesar de *Aeromonas ichthiosmia* e *Aeromonas enteropelogenes* terem sido referidas como espécies sinônimas de *Aeromonas veronii* e *Aeromonas trota*, respectivamente (Collins *et al.*, 1993), num estudo publicado recentemente, *Aeromonas enteropelogenes* é referida como uma espécie válida (Bruckner *et al.*, 1999).

A identificação de *Aeromonas* spp. é controversa, devido à sua heterogeneidade fenotípica (Janda *et al.*, 1996; Abbott *et al.*, 1998). Já foram testadas várias abordagens para caracterizar este grupo, de modo a obter um padrão definitivo para a identificação de isolados. Apesar de todos os esforços feitos, a identificação de algumas espécies é ainda problemática. Os testes bioquímicos são usados rotineiramente na identificação de isolados do gênero *Aeromonas*. Estes testes, apesar de úteis, são laboriosos, demorados e podem

originar erros de identificação. Alguns destes métodos convencionais requerem o uso de pelo menos 18 testes bioquímicos para a identificação de espécies de *Aeromonas* (Janda *et al.*, 1996; Borrell *et al.*, 1997).

Com o aumento do número de genótipos, subespécies e biótipos descritos para membros do género *Aeromonas*, na última década desenvolveram-se numerosos métodos moleculares para a rápida e correcta identificação de isolados ambientais e clínicos. As sequências dos genes ribossomais 16S já mostraram ser ferramentas valiosas, que permitem a delimitação e identificação da maioria das espécies de *Aeromonas* (Martínez-Murcia *et al.*, 1992). Consequentemente já foram publicadas várias sondas específicas de DNA. Contudo, o uso de sondas de DNA para identificar todas as *Aeromonas* spp., é dispendioso e moroso, uma vez que são necessárias várias sondas e a credibilidade é relativa visto que as sequências alvo diferem em poucos nucleótidos, como por exemplo *Aeromonas salmonicida* e *Aeromonas bestiarum* que diferem apenas em dois nucleótidos (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Ash *et al.*, 1993).

Foi descrito também, um protocolo baseado em padrões de restrição de rDNA 16S amplificado por PCR (ARDRA), que permite a identificação rápida e precisa de um grande grupo de isolados, usando as endonucleases de restrição *AluI* e *MboI*, simultaneamente (Borrell *et al.*, 1997). Com a descrição de espécies novas como *Aeromonas popoffii* e *Aeromonas bestiarum*, este método foi revisto e melhorado por Figueras e colaboradores (Figueras *et al.*, 2000).

2.3 Beta-lactamases no género *Aeromonas*

Nos últimos anos, foram feitos diversos estudos em *Aeromonas* spp. com o objectivo de determinar os perfis de susceptibilidade a antibióticos destes microrganismos. Nesta área, os membros do género *Aeromonas* mais estudados têm sido aqueles que estão implicados em infecções em humanos tais como, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* bv *sobria*, *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas caviae*. Neste grupo de microrganismos, a resistência a antibióticos beta-lactâmicos tem aumentado, e a causa apontada mais frequentemente é a produção de beta-lactamases, incluindo carbapenemases. Já foi demonstrado, por análises bioquímicas e genéticas, que algumas estirpes deste género

produzem múltiplas beta-lactamases (tabela 5)(Shannon *et al.*, 1986; Walsh *et al.*, 1995; Hayes *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1997).

Estudos feitos por Walsh e colaboradores revelaram que, em estirpes de *Aeromonas veronii* bv *sobria*, há a expressão coordenada de três beta-lactamases: AmpS, CepS e ImiS. O espectro hidrolítico de cada uma destas beta-lactamases é muito fechado, AmpS hidrolisa principalmente penicilinas (penicilinase), CepS hidrolisa apenas cefalosporinas (cefalosporinase) e ImiS é activa principalmente contra carbapenemos (metalo-beta-lactamase) (Walsh *et al.*, 1995, 1998).

Foram apresentados resultados semelhantes em *Aeromonas jandaei*. Os genes que codificam para as três beta-lactamases de *Aeromonas jandaei* também foram clonados e sequenciados. São designados por *asbA1*, *asbB1* e *asbM1*, e codificam para AsbA1 (penicilinase), OXA-12 ou AsbB1 (cefalosporinase) e AsbM1 (metalo-beta-lactamase), respectivamente (Rasmussen *et al.*, 1994; Yang e Bush, 1996).

Em *Aeromonas hydrophila* foi determinada a sequência do gene que codifica para a metalo-beta-lactamase CphA (Massidda *et al.*, 1991). Foi descrita uma segunda metalo-beta-lactamase que, após a determinação da sua sequência nucleotídica, foi denominada CphA2 (Iaconis e Sanders, 1990; Rasmussen e Bush, 1997). A análise das sequências de *cphA* e *cphA2* mostrou que existe elevada homologia entre estes dois genes (Rasmussen e Bush, 1997). Recentemente, foram depositadas na base de dados GenBank, sequências completas de dois genes que codificam para as metalo-beta-lactamases ImiH de *Aeromonas hydrophila* (GenBank EMBL AY548797, 2003) e CephA3 de *Aeromonas veronii* bv *sobria* (GenBank EMBL AY112998, 2002). Avison e colaboradores demonstraram que estirpes de *Aeromonas hydrophila* também apresentam homólogos de *ampS* e *cepS*, tal como foi descrito para *Aeromonas veronii* bv *sobria*. Foram designados por *ampH* e *cepH*, e codificam para as beta-lactamases AmpH e CepH (Avison *et al.*, 2000).

Em resumo, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* bv *sobria* e *Aeromonas jandaei* produzem pelo menos três beta-lactamases cromossomais. A expressão das três enzimas é, normalmente, reprimida, mas é induzida na presença de antibióticos beta-lactâmicos (Walsh *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1998; Avison *et al.* 2000; Rasmussen *et al.*, 1994; Yang e Bush, 1996; Massidda *et al.*, 1991) e cada enzima apresenta um espectro de actividade curto (Segatore *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1998). Pode-se então sugerir que a actividade de ampicilinase se deve a enzimas do tipo AmpS, enquanto que a actividade demonstrada contra

cefalosporinas se deve a cefalosporinases do tipo CepS (Walsh *et al.*, 1997; Segatore *et al.*, 1993).

Ainda não está esclarecida a razão pela qual estirpes de *Aeromonas* spp. produzem múltiplas beta-lactamases, nem qual o motivo porque *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* produzem metalo-beta-lactamases e por exemplo, *Aeromonas caviae* não (Rossolini *et al.*, 1995).

Tabela 5: Co-produção de metalo-beta-lactamases e outras beta-lactamases em *Aeromonas* spp.

Organismo	Enzimas	Grupo funcional	Referências
<i>Aeromonas hydrophila</i>	A1h	1	Iaconis e Sanders, 1990
	A2h= CphA2	3	Iaconis e Sanders, 1990
	Sem nome	Não caracterizada	Segatore <i>et al.</i> , 1993
	Sem nome	Não caracterizada	Segatore <i>et al.</i> , 1993
	CphA	3	Massidda <i>et al.</i> , 1991
	ACE	1	Hayes <i>et al.</i> , 1996
	APE	2	Hayes <i>et al.</i> , 1996
	ACP	3	Hayes <i>et al.</i> , 1996
	CepH	1	Avison <i>et al.</i> 2000
	AmpH	2	Avison <i>et al.</i> 2000
	ImiH	3	GenBank AY548797 (2003)
<i>Aeromonas jandaei</i>	AsbA1	1	Rasmussen <i>et al.</i> , 1994
	AsbB1=OXA-12	2	Rasmussen <i>et al.</i> , 1994
	AsbM1	3	Yang e Bush, 1996
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ASA-3	1	Hayes <i>et al.</i> , 1994
	ASA-2	2	Hayes <i>et al.</i> , 1994
	ASA-1	3	Hayes <i>et al.</i> , 1994
<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i>	CepS	1	Walsh <i>et al.</i> , 1996
	AmpS	2	Walsh <i>et al.</i> , 1996
	ImiS	3	Walsh <i>et al.</i> , 1995
	CephA3	3	GenBank AY112998 (2002)

Existem outros organismos que produzem metalo-beta-lactamases cromossomais em conjunto com uma segunda beta-lactamase, tais como *Bacillus cereus* (Fabiane *et al.*, 1998), *Bacteroides fragilis* (Rasmussen *et al.*, 1990) e *Stenotrophomonas maltophilia* (Sanchagrin *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1994).

3. Resistência bacteriana em sistemas de aquacultura

Nos últimos anos, o aumento aparente na ocorrência de resistência bacteriana a antibióticos em várias áreas de produção animal e as possíveis implicações na saúde pública, levaram a que, em muitos países, aumentasse a vigilância e monitorização de resistência a agentes antibacterianos nestes ambientes (Schmidt *et al.*, 2000). No que diz respeito a aquacultura, têm sido discutidos tanto os problemas terapêuticos como os problemas ambientais, uma vez que, os agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções

bacterianas em peixes de aquacultura, são libertados para as águas circundantes (Aoki, 1992; Levy, 1998). Os problemas crescentes associados a doenças infecciosas em peixes, o número limitado de antibióticos disponíveis para o tratamento e prevenção destas doenças, e o aumento rápido de resistência a estes antibióticos, representam os maiores desafios para esta fonte de produção animal, em todo o mundo (ASM, 1994).

Relatórios recentes levantaram preocupações legítimas ao nível da saúde pública sobre a segurança no uso de antibióticos em aquacultura (Alderman e Hastings, 1998). É difícil estabelecer o nível exacto de antibiótico que deve ser usado e determinar os perigos potenciais que originam. Um grupo de investigadores dinamarqueses demonstrou que microrganismos isolados de um sistema de aquacultura e os isolados no meio envolvente, são resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos disponíveis para uso em aquacultura (Schmidt *et al.*, 2000). Apesar de existirem algumas barreiras para a dispersão dos microrganismos mais comuns de peixes para o Homem, existem vias únicas em aquacultura. Por exemplo, peixes importados de outros países sofrem normalmente um tratamento agressivo com antibióticos antes da sua exportação. É urgente tomar atenção ao uso de drogas em aquacultura porque é provável que a pressão selectiva de antibióticos em sistemas de aquacultura se esteja a intensificar. Isto porque existem poucos antibióticos aprovados para uso em aquacultura. A falta de escolha aumenta o potencial de uso e abuso dos produtores, que muitas vezes tanto aplicam drogas legais como ilegais.

Os membros do género *Aeromonas* são microrganismos ubíquos e oportunistas que constituem parte da microflora normal de peixes assim como de mamíferos aquáticos. Já foram identificados tanto em ambientes marinhos como de água doce (Doukas *et al.*, 1998) e podem causar doenças em peixes que se encontram em condições de stresse (Peters *et al.*, 1988). Sabe-se que provocam lesões e úlceras na pele, hemorragias, destruição de tecidos e necrose do fígado e rins (Johnson, 1993).

As infecções causadas por estas bactérias estão entre as doenças mais comuns e problemáticas que ocorrem em pisciculturas, tanto em sistemas com recirculação de água como em tanques de aquacultura. As espécies móveis deste género actuando sozinhas ou em conjunto com outros microrganismos, são responsáveis por perdas financeiras significativas na área da produção animal.

A severidade da doença é influenciada por inúmeros factores inter-relacionados que incluem a virulência bacteriana, o tipo e o grau de stresse exercido numa população de peixes em cultura, a condição fisiológica do hospedeiro, e o grau de resistência genética inerente na população de peixes (Nichols *et al.*, 1996). Factores ambientais como a temperatura elevada da água, níveis elevados de nitritos, variações de pH, concentração elevada de dióxido de carbono e níveis baixos de oxigénio dissolvido, promovem o stresse numa população de peixes em aquacultura (Walters e Plumb, 1980). A associação de factores ambientais à má qualidade da água resultante de práticas de cultura intensiva potencia o desenvolvimento de doenças já que a população de peixes está enfraquecida. A melhor prevenção consiste na monitorização e minimização de factores de stresse, que possivelmente evitariam situações mais graves e sem dúvida, economicamente desastrosas. Uma vez diagnosticada a doença, o tratamento deve começar de imediato. O uso de agentes antibacterianos em sistemas de produção animal é aceite como prática comum. São administrados antibacterianos e parasiticidas rotineiramente, como aditivos alimentares, virtualmente a todas as espécies animais, tanto para prevenir como para controlar doenças. Apesar de existir alguma preocupação em relação às consequências ambientais do uso de antibióticos em todas as formas de produção animal, esta preocupação parece particularmente aguda em aquacultura (Camus *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2000; Goldberg *et al.*, 2001).

4. Tipagem genética de microrganismos

A identificação e classificação de bactérias são de importância crucial em microbiologia ambiental, industrial, clínica, agrícola e ecologia microbiana.

Actualmente são usados diversos métodos fenotípicos e genotípicos na identificação e classificação microbiana (Louws *et al.*, 1996). Cada um destes métodos permite a classificação filogenética a um determinado nível (Figura 1), com vantagens e desvantagens no que diz respeito à facilidade de aplicação, reprodutibilidade, equipamento necessário e nível de resolução (Akkermans *et al.*, 1995).

Família	Gênero	Espécie	Subespécie	Estirpe
Sequenciação de DNA				
Sequenciação de rDNA 16S				
	ARDRA			
	rep-PCR			

Figura 1: Nível de resolução relativa de várias técnicas de tipagem de DNA (Adaptado de Louws *et al.*, 1996).

De um modo geral, os métodos com base na análise de DNA são considerados como os métodos mais simples, baratos e fiáveis para a identificação e classificação de microrganismos. Tradicionalmente, a atribuição de gêneros/espécies tem sido baseada em métodos de hibridação DNA-DNA (Wayne *et al.*, 1987) enquanto que a filogenia moderna se baseia na análise de sequências de rDNA 16S (Woese *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1996).

4.1 "Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis"- ARDRA

A técnica de ARDRA consiste na amplificação de um fragmento do gene que codifica para o rRNA 16S, seguida da hidrólise deste fragmento com endonucleases de restrição. Os perfis de restrição resultantes constituem padrões específicos úteis para identificação de microrganismos ao nível da espécie filogenética. Esta técnica tem como vantagens a alta especificidade inerente ao tipo de sequências em estudo e a resultante elevada reprodutibilidade. A determinação da espécie com base em relações filogenéticas pode ser executada num curto espaço de tempo, a um custo razoável e para um elevado número de isolados (Borrell *et al.*, 1997).

4.2 rep-PCR

A técnica de tipagem rep-PCR faz uso de "primers" complementares a sequências de DNA repetidas altamente conservadas, presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias gram-negativas e em várias gram-positivas. Tem-se mostrado extremamente fiável, rápida e altamente discriminatória (Versalovic *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1996).

Foram identificadas três famílias de sequências repetitivas, incluindo a sequência REP ("Repetitive Extragenic Palindromic") de 35-40pb, sequência ERIC ("Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus") de 124-127pb, e o elemento BOX de 154pb (Versalovic *et al.*, 1991, 1994). Aparentemente, estas sequências estão localizadas em posições distintas intergênicas no genoma. Os elementos repetitivos podem estar presentes nos dois sentidos, e assim, os "primers" foram desenhados de modo a sintetizar DNA nas duas direções. O uso destes "primers" leva à amplificação selectiva por PCR de regiões genômicas distintas localizadas entre REP, ERIC e o elemento BOX. Os protocolos correspondentes são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR respectivamente, e rep-PCR colectivamente (Versalovic *et al.*, 1991, 1994). Os protocolos de tipagem rep-PCR têm sido aplicados com sucesso em estudos de diversidade em microbiologia ambiental, clínica e industrial (Versalovic, 1994). No estudo da diversidade, a tipagem com rep-PCR tem sido uma ferramenta valiosa para a identificação e classificação de bactérias e para estudos de epidemiologia molecular de organismos patogênicos humanos e de plantas (van Belkum *et al.*, 1998).

Não é necessário o conhecimento prévio da estrutura genômica ou da natureza das sequências repetitivas indígenas. Normalmente obtém-se uma caracterização detalhada de um grupo de estirpes aplicando apenas um conjunto ou par de "primers". De um modo geral, o "primer" usado em BOX-PCR é recomendado uma vez que origina perfis de bandas complexos. O par usado em REP-PCR gera perfis de bandas com um nível de complexidade inferior, mas mesmo assim reprodutíveis e diferenciáveis. O par de "primers" para ERIC-PCR é mais sensível.

5. Objectivos do trabalho

Com este trabalho pretendeu-se alcançar os seguintes objectivos:

- Determinar a susceptibilidade a antibióticos beta-lactâmicos de estirpes do género *Aeromonas* isoladas de peixes em aquacultura.
- Pesquisar genes de resistência a carbapenemos, principalmente genes que codificam para metalo-beta-lactamases.
- Desenhar e testar "primers" para a pesquisa rápida e simples, com base em técnicas de PCR, de genes de resistência a carbapenemos.
- Identificar os isolados ao nível taxonómico, através de métodos moleculares e bioquímicos.
- Comparar os isolados ao nível molecular através de técnicas de tipagem genética.

II. **MATERIAL E MÉTODOS**

1. Estirpes

As estirpes de *Aeromonas* utilizadas neste trabalho foram isoladas da pele e rins de trutas arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) de uma aquacultura da UTAD (Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro), pela Professora Doutora Maria José Saavedra. Foram também incluídas estirpes tipo e de referência da coleção espanhola de culturas tipo (CECT), gentilmente cedidas pela Prof^a Doutora Claudine Fumé, da Universidade de Barcelona.

Na tabela 6 apresenta-se a listagem de todas as estirpes utilizadas neste estudo, bem como algumas características relevantes e a designação adoptada para cada uma.

Tabela 6: Estirpes de *Aeromonas* utilizadas neste trabalho

Estirpes	Características	Designação
3 amarela	Estirpes isoladas de <i>Onchorynchus mykiss</i> em aquacultura	A1
20 amarela		A2
R27		A3
28 imp		A4
16 imp		A5
T17RA		A7
T14 PA		A8
P24		A12
T3A		A15
T5PA		A19
CECT 4232 ^T		Estirpe tipo de <i>Aeromonas media</i> ; =ATCC 33907 ^T ;
CECT 839 ^T	Estirpe tipo de <i>Aeromonas hydrophila</i> ; =ATCC 7966 ^T ;	39
CECT 4245 ^T	Estirpe tipo de <i>Aeromonas sobria</i> ; =ATCC 43979 ^T ;	45
CECT 4246	Estirpe referência de <i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>sobria</i> ; =ATCC 9071;	46
CECT 4257 ^T	Estirpe tipo de <i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>veronii</i> ; =ATCC 35624 ^T	57
CECT 894 ^T	Estirpe tipo de <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ; =ATCC 33658 ^T	94

2. Meios de cultura

A composição os meios de cultura é indicada, de seguida, para volumes de 1 litro. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos, logo após preparação. Os meios sólidos foram preparados de acordo com a composição apresentada para o meio líquido correspondente, com o suplemento de 2% de Bacto-Agar (Difco).

GSP agar ("Glutamate Starch Phenol-red Agar")*

Glutamato de sódio	10g
Amido solúvel	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0,5g
Vermelho de fenol	0,36g
(pH 7,2)	

*Este meio é suplementado com ampicilina (solução stock preparada a 50 µg/ml)

Meio de TSB ("Tryptic Sodium Broth"- Caldo de tripticase-soja)

Peptona de caseína	17g
Peptona de soja	3g
KH ₂ PO ₄	2,5g
NaCl	5g
Dextrose	2,5g
(pH 7,3)	

Meio de Mueller-Hinton

Extracto de carne	2g
Amido	1,5g
Caseína hidrolisada	17,5g
(pH 7,0)	

3. Conservação de microrganismos

Os isolados de *Aeromonas* foram semeados em placas de GSP com ampicilina (1g/ml) e incubadas a 30°C durante 24 horas. A partir de colônias isoladas, procedeu-se à cultura em meio líquido (TSB), sendo posteriormente conservadas, no mesmo meio contendo 20% de glicerol, a - 80°C.

As estirpes utilizadas com maior frequência foram mantidas em placa de Petri selada com parafilm™ a 4°C, e repicadas mensalmente.

4. Reagentes

Os reagentes químicos e bioquímicos utilizados neste trabalho foram adquiridos nas seguintes casas comerciais: Merck (Darmstadt, Alemanha), Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, EUA), GIBCO BRL (Eggenstein, Alemanha), Boheringer Mannheim/Roche (Mannheim, Alemanha), MBI Fermentas (Vilnius, Lituânia) Promega Co (Madison, EUA), Difco (Detroit, Michigan, USA), Pharmacia (Uppsala, Suécia), Biorad (California, EUA), Qiagen (Hilden, Alemanha).

5. Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos

5.1 Método de difusão em agar com discos de antibióticos

A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi determinada através da técnica de difusão em agar, utilizando os seguintes discos comerciais de antibióticos: ampicilina (AMP), amoxicilina (AML), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), ticarcilina (TIC), ticarcilina + ácido clavulânico (TIM), carbenicilina (CAR), piperacilina (PRL), piperacilina + tazobactam (TZP), imipenemo (IMP), cefotaxima (CTX), cefoperazona (CFP), cefepime (FEP), cefalotina (KF) e aztreonamo (ATM), obtidos da casa OXOID.

O procedimento utilizado para obtenção do antibiograma é descrito em seguida e foi definido de acordo com as normas do NCCLS ("National Committee for Clinical Laboratory", 1995), classificando as estirpes, de acordo com a inibição observada, nas categorias sensível, intermédia ou resistente.

Técnica de difusão em agar com discos de antibióticos

1. Preparar uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a metade do grau 1 da escala de MacFarland (3-4 colónias) em soro fisiológico estéril.
 2. A partir desta suspensão, inocular placas de agar Mueller-Hinton, utilizando uma zaragatoa.
 3. Deixar secar o inóculo e aplicar os discos dos antibióticos a testar sobre a superfície do meio de cultura.
 4. Incubar a 37°C, durante 18 horas.
 5. Com uma craveira medir os diâmetros dos halos de inibição de crescimento para cada antibiótico.
-
-

6. Marcadores de peso molecular

O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por comparação com a migração de fragmentos de peso molecular conhecido. Para tal, foram utilizados os seguintes marcadores de peso molecular: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, Mass Ruler™ DNA ladder Low Range, Mass Ruler™ DNA Ladder High Range e Lambda/*EcoRI*+*HindIII* da casa MBI Fermentas (ver anexo).

7. Preparação de DNA total

O DNA total de todas as estirpes de *Aeromonas* foi preparado, a partir de culturas líquidas em TSB, utilizando o sistema comercial "Genomic DNA Purification Kit" (MBI Fermentas). Com o método descrito em seguida obtém-se DNA total destinado a tratamento com enzimas de restrição de alta frequência de corte, e cujos fragmentos resultantes sejam de tamanho inferior a 30 Kb, bem como para utilização em reacções de PCR.

Preparação de DNA total ("Genomic DNA Purification Kit")

1. Incubar a estirpe em 5 ml de meio TSB, durante 16-18 horas, a 250 rpm.
2. Sedimentar as células por centrifugação, durante 5 minutos a 14000 rpm. Ressuspender em 200 µl de TE.
3. Adicionar 400 µl de Solução de Lise (MBI Fermentas). Misturar vigorosamente. Incubar 10 minutos a 65 °C. A solução deve apresentar-se viscosa e transparente.
4. Adicionar 600 µl de clorofórmio e agitar até que as fases se misturem. Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm.
5. Preparar a solução de precipitação adicionando a 720 µl de água estéril 80 µl de Solução de Precipitação Concentrada (MBI Fermentas).
6. Transferir a fase aquosa para um microtubo novo.
7. Adicionar a solução de precipitação à fase aquosa e misturar suavemente. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente.
8. Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm.
9. Ressuspender o precipitado em 100 µl de uma solução de NaCl a 1,2 M. Adicionar 2 µl de uma solução de RNase a 10 mg/ml. Incubar 10 minutos a 37 °C.
10. Adicionar 3 volumes de etanol frio. Deixar precipitar durante 15 minutos a -20 °C.
11. Centrifugar 3-4 minutos a 12000 rpm.
12. Lavar o DNA com etanol a 70 %.
13. Ressuspender em 100 µl de TE. Conservar a -20 °C.

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA.

8. Hidrólise de DNA por Endonucleases de Restrição

As enzimas de restrição foram obtidas das firmas Boehringer Manheim, Gibco-BRL, Promega e MBI Fermentam, e foram utilizadas de acordo com as recomendações dos referidos fornecedores. As digestões de DNA total efectuaram-se em volumes totais de 20 a 50 µl contendo 0,2 a 5 µg de DNA (Sambrook *et al.*, 1990). Foram usadas de 1 a 5U de enzima por µg de DNA. As condições relativas à temperatura de incubação, bem como ao tampão a utilizar, foram estabelecidas também de acordo com as recomendações do fornecedor.

9. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

As reacções de PCR foram efectuadas em volumes de 50 µl e decorreram num termociclador iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Os reagentes (tampões, dNTPs

e $MgCl_2$) e enzima (*Taq* DNA polimerase) foram adquiridos na casa MBI Fermentas. As particularidades referentes a cada reacção são indicadas nos protocolos adequados.

Os fragmentos amplificados por PCR destinados a sequenciação foram purificados utilizando o sistema "kit Concert™ Rapid PCR Purification System", pelo método que se descreve em seguida.

Purificação de produtos de PCR (*kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System*)

1. Adicionar 400 µl de solução H1 (Binding Solution - Gibco BRL) à reacção de PCR e misturar.
 2. Colocar uma coluna (Gibco BRL) num tubo de 2 ml. Transferir a amostra para a coluna.
 3. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.
 4. Remover o liquido recolhido no tubo. Colocar novamente a coluna no tubo de 2 ml.
 5. Lavar a coluna com 700 µl de tampão H2 (Wash Buffer - Gibco BRL). Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto. Descartar o líquido no tubo.
 6. Centrifugar novamente nas mesmas condições para remover restos de tampão 2.
 7. Colocar a coluna num tubo de 1,5 ml. Adicionar 50 µl de TE previamente aquecido directamente no centro da coluna.
 8. Incubar durante 2 minutos à temperatura ambiente. Recolher a amostra por centrifugação a 14000 rpm durante 2 minutos.
-

10. Electroforese de DNA

10.1. Electroforese em gel de agarose

Os géis de agarose (Ultra Pure™ da Gibco BRL ou Agarose 3:1HRB™ da Amresco) foram preparados a concentrações de 0,8 a 4%, dependendo do tamanho dos fragmentos a separar, decorrendo a voltagens de 1 a 4 v/cm em tampão TAE 1x (Sambrook *et al.*, 1990). As amostras foram carregadas no gel após adição de 1/6 de volume de tampão de carga.

TAE 50x

40 mM Tris base

40 mM Acetato

2 mM EDTA

(pH 8,0)

Tampão de carga 6x

0,25% bromofenol

0,25% xileno cianol

40% sacarose ou 30% glicerol

(pH 8,0)

10.2 Visualização de DNA

Os géis foram corados numa solução de brometo de etídio (EtBr) a 5µl/ml, em tampão de electroforese, durante cerca de 20 minutos.

Após a coloração, o DNA foi visualizado num transiluminador de luz UV sendo digitalizado num Personal Molecular Imager™ FX System (Bio-Rad) ou GS-710™ Imaging Densitometer, com o software Quantity One® 1-D Image Analysis Software (BIORAD).

10.3 Determinação do tamanho de fragmentos de DNA em géis de agarose

O tamanho de fragmentos lineares de DNA foi determinado por comparação com a migração de padrões de peso molecular conhecido (Southern, 1975).

11. Transferência de fragmentos de DNA separados em gel de agarose para membranas de "nylon"

Os fragmentos de DNA separados em géis de agarose foram transferidos para membranas de "nylon" utilizando um sistema de vácuo (*VacuGene™XL*, Pharmacia Biotech), seguindo o método descrito em seguida.

Transferência por vácuo (Método "Vacuum-blotting")

1. Tratar o gel com solução despurinizante durante 10 minutos, com agitação suave. O volume de solução adicionada deve ser suficiente para manter o gel submerso.
2. Descartar a solução despurinizante e adicionar aproximadamente o mesmo volume de solução desnaturizante. Manter durante 45 minutos com agitação suave.

3. Retirar a solução anterior e deitar sobre o gel o mesmo volume de solução neutralizante. Manter durante 30 minutos com agitação suave.
4. Entretanto cortar uma membrana de "nylon" (Boehringer Mannheim) cujas dimensões sejam superiores em 1 cm às do gel. Humedecer a membrana em água.
5. Colocar a membrana na unidade de transferência e efectuar a montagem do sistema de acordo com as instruções do fabricante.
6. Sobre a membrana colocar suavemente o gel, tendo o cuidado de evitar que se formem bolhas de ar entre o gel e o filtro.
7. Com o auxílio de uma pipeta de vidro, deitar sobre o gel a solução de transferência (SSC 20x); Manter durante 60 minutos a 50 mBar. Retirar todo o líquido; remover o gel e, finalmente, a membrana.
8. Lavar o filtro em SSC 2x durante 5 minutos.
9. Secar e fixar o DNA durante 5 minutos num transiluminador de UV.

Solução despurinizante: 0,25 N HCl.

Solução desnaturizante: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH.

Solução neutralizante: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA.

SSC 20x: 3 M NaCl; 0,3 M Citrato de sódio; pH 7,0.

12. Detecção de sequências homólogas por hibridação DNA-DNA

A detecção de sequências homólogas por hibridação DNA-DNA foi efectuada de acordo com o sistema DIG de Marcação e Detecção Não-radioactiva de ácidos nucleicos ("DIG DNA labelling and detection starter kit I" e "DIG Nucleic Acid Detection Kit", Boehringer Mannheim) (Höltke *et al.*, 1995). O sistema permite a utilização de diversos métodos de marcação enzimáticos. No caso deste trabalho a incorporação de nucleótidos marcados (DIG-dUTP) foi efectuada através da extensão de "primers" iniciadores pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I (método "random primed") ou pela *Taq* DNA polimerase (método de incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR).

12.1 Marcação não radioactiva de sondas de DNA

12.1.1 Marcação da sonda por PCR

Neste método, as reacções de marcação por PCR são equivalentes a reacções de amplificação normais, com substituição dos dNTP's por 5µl da mistura PCR DIG Labelling Mix (Roche). Esta mistura contém: 2mM dATP, 2mM dGTP, 2mM dCTP, 1,9mM dTTP e 0,1 mM dUTP.

Após a reacção de amplificação, deve ser visível em gel de agarose, após coloração com EtBr, apenas uma banda.

Reacção de marcação por PCR (50µl):

	Volume	Concentração final
H ₂ O	variável	-----
10x PCR buffer s/ MgCl ₂	2,5µl	0,5x
10x PCR buffer c/ (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5µl	0,5x
MgCl ₂	6µl	3mM
PCR DIG labelling mix	5µl	200µM
"Primer" 1	1,5µl	0,3µM
"Primer" 2	1,5µl	0,3µM
DNA molde	variável	50-100ng
Taq polimerase 1U/µl	1µl	1U

12.1.2 Método "random primed"

A utilização deste método permite a marcação de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição ou purificados de géis de agarose, não sendo necessário ter qualquer informação acerca da sua sequência. A partir de hexanucleótidos ao acaso o fragmento Klenow da DNA polimerase I incorpora, com base na cadeia de DNA molde, os nucleótidos adicionados à reacção, incluindo digoxigenina-11-dTTP. Esta reacção de síntese permite a partir de 1 µg de DNA molde obter cerca de 2 a 3 µg de sonda marcada.

Marcação de sonda pelo método "Random Primed"

1. Diluir cerca de 1 µg de DNA (previamente purificado) em 16 µl de água destilada estéril.

2. Desnaturar o DNA fervendo em água durante 10 minutos. Arrefecer imediatamente em gelo.
3. Adicionar 4 μ l de da mistura DIG-High Prime (Boehringer Mannheim) e misturar suavemente.
4. Incubar a reacção a 37 °c, durante cerca de 20 horas (tempos de incubação a partir de 60 minutos podem ser utilizados, diminuindo, no entanto, a eficiência da reacção de marcação).
5. Parar a reacção adicionando 2 μ l de EDTA 0,5 M.
6. O DNA marcado pode ser utilizado imediatamente ou armazenado a - 20 °C.

DIG-High Prime: 1 mM dATP; 1 mM dCTP; 1 mM dGTP; 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-dUTP; 1 U/ μ l fragmento klenow da DNA polimerase I; Tampão de reacção 5x

12.2 Hibridação

As membranas foram introduzidas em tubos de vidro fechados com tampa. O procedimento foi o seguinte:

Hibridação

1. Colocar a membrana num tubo de hibridação e adicionar 20 ml de solução de hibridação por cada 100 cm² de filtro. Colocar à temperatura de hibridação durante 2 horas.
2. Desnaturar a sonda marcada (no caso de dsDNA) fervendo durante 10 minutos, e arrefecendo imediatamente em gelo.
3. Desprezar a solução utilizada na pré-hibridação e adicionar o mesmo volume de solução de hibridação na qual foi previamente diluída a sonda marcada.
4. Colocar no forno de hibridação, à temperatura de hibridação, durante 14-16 horas.
5. Após a hibridação, retirar a membrana e armazenar a solução de hibridação a -20°C.

Solução de hibridação: 5x SSC; 1% Agente bloqueador; 0,1% Sarcosil; 0,02% SDS.

A temperatura de hibridação foi decidida de acordo com a percentagem esperada de bases idênticas entre a sonda e o DNA alvo. Para o caso das sondas em que 100% das bases seriam idênticas, a temperatura de hibridação é de 65°C na ausência de formamida e de 45°C na presença de formamida (Casey e Davidson, 1977). Em casos em que a homologia seria inferior, utilizou-se a

temperatura de hibridação de 45°C, na ausência de formamida, o que em teoria permite detectar sequências de DNA 65% de bases idênticas.

A pré-hibridação prepara a membrana para a ligação da sonda, bloqueando os locais inespecíficos de ligação de ácidos nucleicos, permitindo assim a redução do *background* na mesma. As lavagens com as soluções I e II removem toda a sonda não ligada permitindo, de igual modo, reduzir o *background* na membrana.

12.3 Lavagem e detecção

A formação de híbridos entre as sondas e o DNA alvo foi revelada por imunodeteção com anti-digoxigenina conjugada com a fosfatase alcalina (anti-DIG-AP) e, posteriormente visualizadas, com substratos colorimétricos NBT/BCIP (Boehring Mannheim). O procedimento decorre à temperatura ambiente. As membranas de "nylon" podem ser reutilizadas, sendo para isso sujeitas a procedimentos específicos para eliminação da cor e também da sonda.

Lavagem e detecção colorimétrica

1. Lavar a membrana em solução I duas vezes, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.
2. Lavar a membrana em solução II duas vezes, durante 5 minutos, à temperatura de hibridação.
3. Após a hibridação e lavagens, equilibrar a membrana durante 5 minutos em tampão de ácido maleico.
4. Bloquear a membrana em solução bloqueadora durante 30 minutos.
5. Diluir o conjugado anti-digoxigenina-fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim) em solução bloqueadora (1:5000).
6. Remover a solução bloqueadora e incubar a membrana com a solução contendo anticorpos, durante 30 minutos.
7. Descartar a solução de anticorpos e lavar a membrana 2x 15 minutos com tampão de ácido maleico. Estas lavagens permitem remover anticorpos não ligados.
8. Equilibrar a membrana em tampão de detecção durante 5 minutos.
9. Entretanto preparar a solução corante adicionando 200 µl de solução concentrada de NBT/BCIP (Boehringer Mannheim) a 10 ml de tampão de detecção.
10. Colocar a membrana numa bolsa de plástico com solução corante. Selar e incubar no escuro.

11. Parar a reacção lavando a membrana com água ou TE, quando o desenvolvimento do sinal for satisfatório.

Solução I: 2x SSC; 0,1% SDS

Solução II: 0,5x SSC; 0,1% SDS

Tampão de ácido maleico: 0,1 M ácido maleico; 0,15 M NaCl; pH 7,5

Solução bloqueadora: 1% de Agente bloqueador (Boehringer Mannheim) em Tampão de ácido maleico

Tampão de detecção: 0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5

13. ARDRA- *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

Para amplificar por PCR a região rDNA 16S, foram utilizados os "primers" rD1 e fD1 (ver anexo) (Weisburg *et al.*, 1991).

ARDRA

1. Preparar a seguinte reacção de amplificação (50 µl):

	Volume	Concentração final
H ₂ O	variável	-----
10x PCR buffer s/ MgCl ₂	2,5µl	0,5x
10x PCR buffer c/ (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5µl	0,5x
MgCl ₂	6µl	3mM
dNTP's	5µl	200µM
"Primer" 1	1,5µl	0,3µM
"Primer" 2	1,5µl	0,3µM
DNA molde	variável	50-100ng
Taq polimerase 1U/µl	1µl	1U

2. Proceder à amplificação por PCR, da região rDNA 16S de acordo com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial de 7 min. a 95°C seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C, 1 min.; "annealing" a 40°C, 1 min.; extensão a 65°C, 8 min.) e extensão final de 16 min. a 65°C. No final, manter os tubos a 4°C.

3. Observar uma alíquota de cada reacção de PCR num gel de agarose a 1% em TAE 1x.
4. Digerir uma alíquota (10µl) da reacção anterior com as endonucleases de restrição adequadas. Incubar a 37°C "overnight".
5. Separar os produtos da digestão por electroforese num gel de agarose HB 3:1 (Amresco) a 4% em TAE 1x.

14. rep-PCR

Neste procedimento foram utilizados os seguintes "primers" (ver anexo): REP1R, REP2I (REP-PCR) Versalovic *et al.* (1991) e BOXA1R (BOX-PCR) Versalovic *et al.* (1994).

REP-PCR

1. Preparar a seguinte reacção de amplificação (50 µl):

	Volume	Concentração final
H ₂ O	variável	-----
10x PCR buffer s/	2,5µl	0,5x
MgCl ₂		
10x PCR buffer c/	2,5µl	0,5x
(NH ₄) ₂ SO ₄		
MgCl ₂	6µl	3mM
PCR DIG labelling mix	5µl	200µM
"Primer" 1	1,5µl	0,3µM
"Primer" 2	1,5µl	0,3µM
DNA molde	variável	50-100ng
Taq polimerase 1U/µl	1µl	1U

2. Proceder à amplificação por PCR, de acordo com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial de 7 min. a 95°C seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C, 1 min.; "annealing" a 40°C, 1 min.; extensão a 65°C, 8 min.) e extensão final de 16 min. a 65°C. No final, manter os tubos a 4°C.
3. Observar uma alíquota de cada reacção de PCR num gel de agarose a 1% em TAE 1x.

BOX-PCR

1. Preparar a seguinte reacção de amplificação (50 µl):

	Volume	Concentração final
H ₂ O	variável	-----
10x PCR buffer s/ MgCl ₂	2,5µl	0,5x
10x PCR buffer c/ (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5µl	0,5x
MgCl ₂	6µl	3mM
PCR DIG labelling mix	5µl	200µM
"Primer" 1	1,5µl	0,3µM
"Primer" 2	1,5µl	0,3µM
DNA molde	variável	50-100ng
Taq polimerase 1U/µl	1µl	1U

2. Proceder à amplificação por PCR, de acordo com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial de 7 min. a 95°C seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C, 1 min.; "annealing" a 53°C, 1 min.; extensão a 65°C, 8 min.) e extensão final de 16 min. a 65°C. No final, manter os tubos a 4°C.

3. Observar uma alíquota de cada reacção de PCR num gel de agarose a 1% em TAE 1x.

15. Determinação de sequências nucleotídicas a partir de produtos de PCR – Sequenciação cíclica

Para a sequenciação de fragmentos de DNA amplificados por PCR foi utilizado o sequenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Sequenciação cíclica de fragmentos de DNA amplificados por PCR

1. Purificar os produtos utilizando o sistema *kit Concert™ Rapid PCR Purification System*, como descrito anteriormente.
2. Preparar a seguinte reacção de PCR para sequenciação cíclica (20 µl), com reagentes do *kit ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante:

	Volume	Concentração final
H ₂ O	variável	-----
Term Ready Reaction Mix	8µl	4x
DNA	variável	5-20ng
"Primer"	1,6µl	3,2pmol

3. Proceder à amplificação por PCR, de acordo com um programa de 30 ciclos de amplificação: 10 seg de desnaturação a 96°C, 5 seg de "annealing" a temperatura adequada e extensão a 60°C durante 4 min. No final, os tubos devem ser mantidos a 4°C.
 4. Purificar os produtos da reacção por precipitação acetato de sódio/etanol do seguinte modo:
 - 4.1 Para cada reacção de PCR misturam-se, em tubos de 1,5ml, 2µl de acetato de sódio 3M (pH 4,6) com 50µl de etanol 95%.
 - 4.2 Pipetar o conteúdo total de cada reacção de PCR para um tubo com a mistura anterior.
 - 4.3 Deixar à temperatura ambiente durante 20 minutos.
 - 4.4 Centrifugar durante 20 minutos à velocidade máxima.
 - 4.5 Remover o sobrenadante e ressuspender em 250µl de etanol 70%.
 - 4.6 Centrifugar durante 5 minutos à velocidade máxima.
 - 4.7 Retirar o sobrenadante.
-
-

4.8 Colocar os tubos numa placa de aquecimento a 90°C, durante 1 minuto.

5. Injectar as amostras no sequenciador

III.

RESULTADOS

1. Isolamento e identificação dos isolados

As estirpes de *Aeromonas* utilizadas neste trabalho foram isoladas da pele e rins de trutas arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) de uma aquacultura da UTAD (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro). Para além de *Aeromonas* spp., foram também isolados membros dos géneros *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Stenotrophomonas*.

Para a identificação das estirpes foi usado o sistema API20NE (bioMérieux) que permitiu a identificação precisa apenas ao nível do género. Posteriormente, em colaboração com o Hospital Distrital de Aveiro, foi usado o sistema VITEK (bioMérieux). Este sistema permite identificar isolados clínicos das espécies *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* bv *sobria*. Os resultados são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Identificação dos isolados com os sistemas API20NE e VITEK

Estirpes	API 20NE	VITEK
1	<i>A. hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	<i>A. hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	<i>A. hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
4	<i>A. hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
5	<i>A. hydrophila</i> / <i>caviae</i> / <i>sobria</i>	<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>sobria</i>
7	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>
8	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>
12	<i>A. hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>
15	<i>A. hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>
19	<i>A. hydrophila</i> / <i>caviae</i>	Não determinado

2. Susceptibilidade a antibióticos

A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi determinada através da técnica de difusão em agar com discos de antibióticos. Os isolados foram classificados como resistentes (R), sensíveis (S) ou intermédios (I), de acordo com as normas da NCCLS (tabela 8).

Tabela 8: Classificação da susceptibilidade a antibióticos beta-lactâmicos de isolados e estirpes referência de *Aeromonas* spp.

	A1	A2	A3	A4	A5	A7	A8	A12	A15	A19	32	39	45	46	57	94
PRL	I	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TZP	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AML	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
AMC	R	I	R	R	R	R	R	I	I	R	I	I	I	R	I	S
TIC	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	R	I	R	I	S
TIM	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	I	R	S	S
AMP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
CAR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
KF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CFP	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
FEP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CTX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IMP	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I	S

Legenda: PRL- piperacilina; TZP- piperacilina + tazobactam; AML- amoxicilina; AMC- amoxicilina + ácido clavulânico; TIC- ticarcilina; TIM- ticarcilina + ácido clavulânico; AMP- ampicilina; CAR- carbenicilina; KF- cefalotina; CFP- cefoperazona; FEP- cefepime; CTX- cefotaxima; ATM- aztreonam; IMP- imipenemo

A análise do antibiograma obtido revela que a maioria dos isolados é resistente a amoxicilina, ampicilina e carbenicilina. São sensíveis ao aztreonam, cefotaxima, cefoperazona e cefepime. Em 7 isolados foi detectada resistência ao imipenemo. Com base nestes dados, procedeu-se à caracterização molecular do mecanismo envolvido na resistência aos carbapenemos.

3. Detecção de elementos genómicos codificando para genes de resistência a carbapenemos

A resistência a antibióticos beta-lactâmicos tem aumentado entre os membros do género *Aeromonas*, e a causa apontada mais frequentemente é a produção de beta-lactamases, incluindo carbapenemases (Bradley *et al.* 1999, Bush *et al.* 1998).

3.1 Detecção por PCR de genes que codificam para metalo-beta-lactamases em *Aeromonas* spp.

Com base nas sequências nucleotídicas dos genes *cphA* e *imiS*, e nas sequências de aminoácidos deduzidas das proteínas correspondentes, foram desenhados os "primers" Aer-R e Aer-F, a ser utilizados em PCR, para verificar a presença de um gene homólogo no genoma das estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas.

Aer-R: 5' GCCTTGATCAGCGCTTCGTAGTG 3'

Aer-F: 5' GCGGGGATGTCGCTGACGCAG 3'

Na figura 2 é apresentado o alinhamento das sequências de aminoácidos de CphA e ImiS, estando identificadas a cinzento as regiões conservadas, com base nas quais foram desenhados os dois "primers".

```

ImiS      MMKGWIKCGLAGAVVLMASFWGGSVRAAGMSLTQQVSGPVYVVEDNYVQENSMVYFGAK 60
CphA      MMKGWMKCGLAGAVVLMASFWGGSVRAAGMSLTQQVSGPVYVVEDNYVQENSMVYFGAK 60
          *****;*****
          <----->
ImiS      GVTVVGATWTPDTARELHKLIKRVSRKPVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVISTRQ 120
CphA      GVTVVGATWTPDTARELHKLIKRVSRKPVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVISTRQ 120
          *****;****
ImiS      TRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDLPVLPNVVHEGDFTLQEGKLRAFYLGPAHSPDGI 180
CphA      TRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDLPVLPNVVHDGDFTLQEGKVRAFYAGPAHTPDGI 180
          *****;*****;**** ****;****
ImiS      FVYFPDQQVLYGNCILKEKLGNSFADVKAYPQTLERLKAMKLPKTVVGGHDSPLHGPE 240
CphA      FVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFADVKAYPQTLERLKAMKLPKTVVGGHDSPLHGPE 240
          *****;*****;*****
          <----->
ImiS      LIDHYEALIKAASQS 255
CphA      LIDHYEALIKAAPQS 255
          *****;**

```

Figura 2: Alinhamento das sequências de aminoácidos de CphA e ImiS.

Em 5 dos isolados (figura 3A) e em 2 estirpes referência (figura 3B), foi possível amplificar por PCR, com os "primers" Aer-R e Aer-F, um fragmento com o tamanho esperado, cerca de 670 pb, a partir do DNA total das estirpes de *Aeromonas* spp.

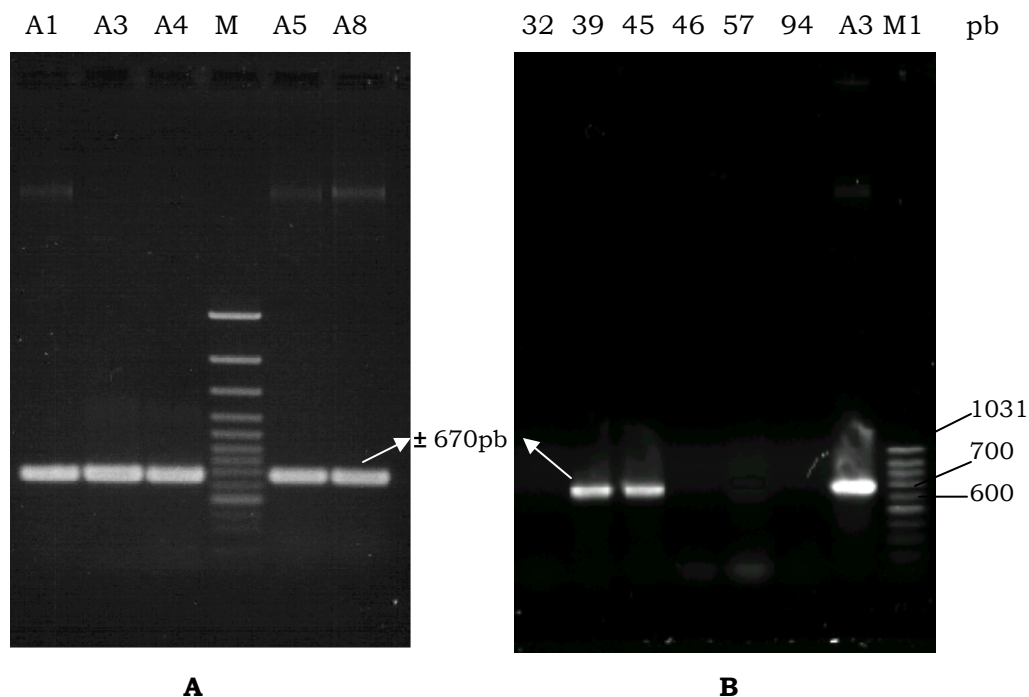


Figura 3: Electroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados por PCR com os primers Aer-R e Aer-F, de DNA de estirpes isoladas (A) e estirpes referência (B) M- marcador de peso molecular: M- GeneRuler™ 100bpDNA Ladder Plus ; M1- MassRuler™ DNALadder, LowRange.

3.2 Determinação da sequência nucleotídica dos fragmentos amplificados e análise das sequências

Foi determinada a sequência nucleotídica dos fragmentos de DNA amplificados por PCR com os "primers" Aer-R e Aer-F. Utilizando "software" disponível na Internet, foi deduzida a sequência de aminoácidos dos fragmentos sequenciados. As sequências de aminoácidos deduzidas foram utilizadas para pesquisar, em bases de dados disponíveis, sequências com um grau de homologia considerável, utilizando para este fim o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Verificou-se que os fragmentos sequenciados apresentavam elevada percentagem de identidade com sequências de genes de metalo-beta-lactamases já conhecidas de *Aeromonas* spp.

As sequências nucleotídicas, bem como as sequências de aminoácidos deduzidas, foram também alinhadas utilizando os programas Clustal W (Thompson *et al.* 1994) e Clustal X (Thompson *et al.* 1997), disponíveis na Internet. Verificou-se que tanto as sequências nucleotídicas como as sequências

de aminoácidos deduzidas, apresentam uma grande percentagem de similaridade entre si (figura 3). Dos 5 fragmentos de DNA sequenciados, os pares A1/A3 e A4/A8 apresentam sequências idênticas.

```

A1  PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDLP 60
A3  PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDLP 60
A4  PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVATRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDLP 60
A8  PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVATRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDLP 60
A5  PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVATRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDLP 60
    *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

A1  LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRIFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 120
A3  LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRIFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 120
A4  LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRIFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 120
A8  LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRIFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 120
A5  LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRIFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCMLKEKLGNSFAD 120
    *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

A1  VKAYPQTL 128
A3  VKAYPQTL 128
A4  VKAYPQTL 128
A8  VKAYPQTL 128
A5  VKAYPQTL 128
    *****
    
```

Figura 4: Alinhamento das sequências de aminoácidos dos fragmentos de DNA amplificados por PCR.

Procedeu-se também ao alinhamento múltiplo com sequências de aminoácidos de metalo-beta-lactamases já descritas em *Aeromonas* spp e as sequências determinadas para os fragmentos de DNA de isolados de *Aeromonas* spp., amplificados por PCR (figura 5). A tabela 9 apresenta os valores de percentagem de identidade entre as sequências.

Tabela 9: Tabela de homologias construída com base na percentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos deduzidas de beta-lactamases de classe B de *Aeromonas* spp. e dos isolados de *Aeromonas* spp.

	CphA	CphA2	CphA3	ImiH	ImiS	A1	A3	A4	A5	A8
CphA	-----									
CphA2	96	-----								
CphA3	97	94	-----							
ImiH	97	97	95	-----						
ImiS	95	96	92	96	-----					
A1	98	98	96	99	96	-----				
A3	98	98	96	99	96	100	-----			
A4	97	97	96	98	96	99	99	-----		
A5	96	97	95	96	96	97	96	98	-----	
A8	97	97	96	98	96	99	99	100	98	-----

```

CphA2    ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
ImiS     ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVISTRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
A5       ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVATRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
A4       ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVATRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
A8       ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVATRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
A1       ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
A3       ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
ImiH     ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
CphA     ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
CephA3   ...PVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVATRQTRDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYPDLP 167
... *****NH*****:*****

CphA2    LVLPNVVHEGDFTLQEGKLRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 227
ImiS     LVLPNVVHEGDFTLQEGKLRAFYLGPAAHSPDGFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 227
A5       LVLPNVVHEGDFTLQEGKLRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCMLKEKLGNSFAD 227
A4       LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 227
A8       LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 227
A1       LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 227
A3       LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 227
ImiH     LVLPNVVHDGDFTLQEGKLRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 227
CphA     LVLPNVVHDGDFTLQEGKVRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAD 227
CephA3   LVLPNVVHDGDFTLQEGKVRAFYAGPAHTPDGIFVYFPDQVLYGNCILKEKLGNSFAN 227
*****:*****:**** *H:*****: *****:*****:

CphA2    VKAYPRTL 235
ImiS     VKAYPQTL 235
A5       VKAYPQTL 235
A4       VKAYPQTL 235
A8       VKAYPQTL 235
A1       VKAYPQTL 235
A3       VKAYPQTL 235
ImiH     VKAYPQTL 235
CphA     VKAYPQTL 235
cphA3    VKAYPQTI 235
*****:

```

Figura 5: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de metalo-beta-lactamases já conhecidas e das seqüências de aminoácidos deduzidas de A1, A3, A4, A8 e A5. Estão sublinhados os resíduos considerados importantes para a actividade catalítica das metalo-beta-lactamases de classe B2, e sombreados a cinza destacam-se os resíduos envolvidos na ligação de um dos iões de zinco; A numeração foi feita de acordo com o esquema proposto por Galleni e colaboradores para a numeração de beta-lactamases de classe B (Walsh *et al.* 1997, Galleni *et al.* 2001).

Em resumo, os fragmentos de DNA amplificados por PCR com os "primers" Aer-R e Aer-F, e posteriormente sequenciados, possivelmente correspondem a fragmentos de genes que codificam para metalo-beta-lactamases de classe B, subclasse B2.

3.3 Detecção de seqüências homólogas por hibridação DNA-DNA (marcação da sonda por PCR com "primers" para *cphA/ imiS*)

O DNA total de todas as estirpes de *Aeromonas* spp. (estirpes isoladas e estirpes referência) foi digerido com a enzima *Bam*HI e uma alíquota foi aplicada num gel de agarose a 1%. Como marcador de peso molecular foi usado DNA do fago λ digerido com *Eco*RI + *Hind*III. Os fragmentos separados no gel foram

transferidos por vácuo (método *vacuum blotting*) para uma membrana de *nylon*. Para a hibridação foi usada uma sonda marcada por PCR com os "primers" Aer-R e Aer-F, e uma sonda específica para DNA do fago λ digerido com *EcoRI* + *HindIII*, marcada pelo método *random-primed*. A hibridação decorreu a 42°C na presença de 50% de formamida. O resultado obtido apresenta-se na figura 6.

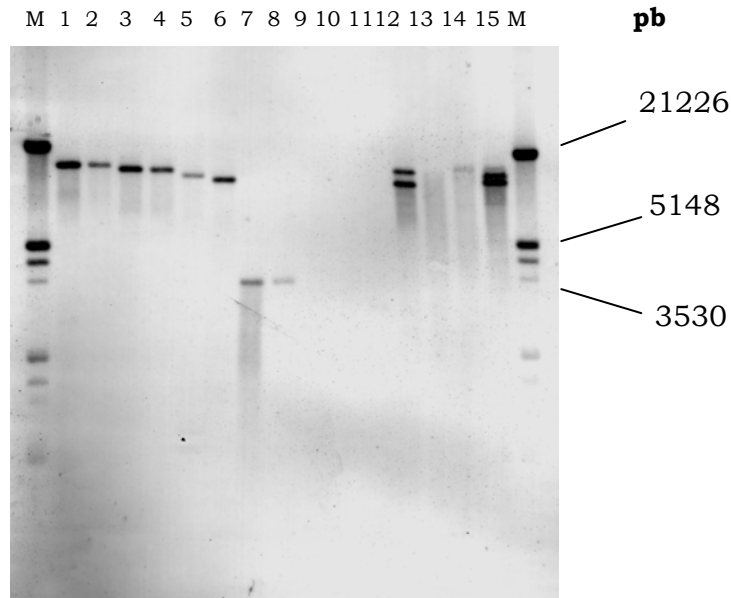


Figura 6: Detecção por hibridação DNA-DNA de genes homólogos a *cphA/imiS*, no DNA total das estirpes de *Aeromonas*. M- λ /*EcoRI*+*HindIII*; 1- A1; 2-A3; 3-A4;4-A8, 5- A5, 6- A7, 7- A2, 8-A12, 9-A15, 10-A19, 11-32, 12-39, 13-46, 14-45, 15-57

Da análise da figura 6, verifica-se que ocorreu hibridação entre o fragmento de DNA usado como sonda e o DNA de todos os isolados que apresentaram actividade hidrolítica contra imipenemo. Das estirpes referência e/ou tipo, obteve-se sinal para *A. hydrophila* (39), *A. sobria* (45) e *A. veronii* bv *veronii* (57). Em *A. veronii* bv *sobria* (46) a banda é muito ténue.

4. Tipagem molecular de isolados de *Aeromonas* spp.

4.1 ARDRA

Recorrendo aos "primers" universais rD1 e fD1 (Weisburg *et al.*, 1991) foi amplificado por PCR um fragmento com aproximadamente 1400-1500pb, correspondente ao gene que codifica a subunidade ribossomal, rRNA 16S. Estes fragmentos foram posteriormente digeridos com as endonucleases de restrição *MboI* e *AluI*, tal como descrito por Borrell *et al.* (1997), resultando nos perfis de bandas apresentados na figura 7.

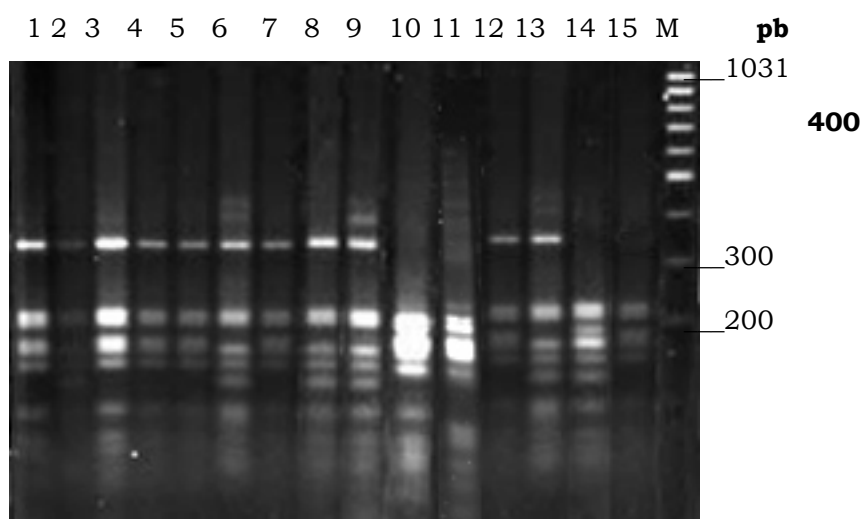


Figura 7: Perfis ARDRA obtidos por digestão com *MboI* e *AluI*. M- Mass Ruler™ DNA Ladder Low Range; 1- A1; 2-A2; 3-A3;4-A4, 5- A5, 6-A7, 7- A8, 8-A12, 9-A15, 10-A19, 11-32, 12-39, 13-94, 14-46, 15-45

Os perfis ARDRA obtidos a partir de fragmentos de rDNA 16S digeridos com *MboI* e *AluI* (de 33 a 346 pb), constituem padrões específicos que podem ser usados na identificação de estirpes ao nível da espécie filogenética (Borrel *et al.*,1992; Figueras *et al.*,2000).

Analisando os perfis ARDRA é possível distinguir 5 perfis padrão, aqui designados de A a D (figura 8).

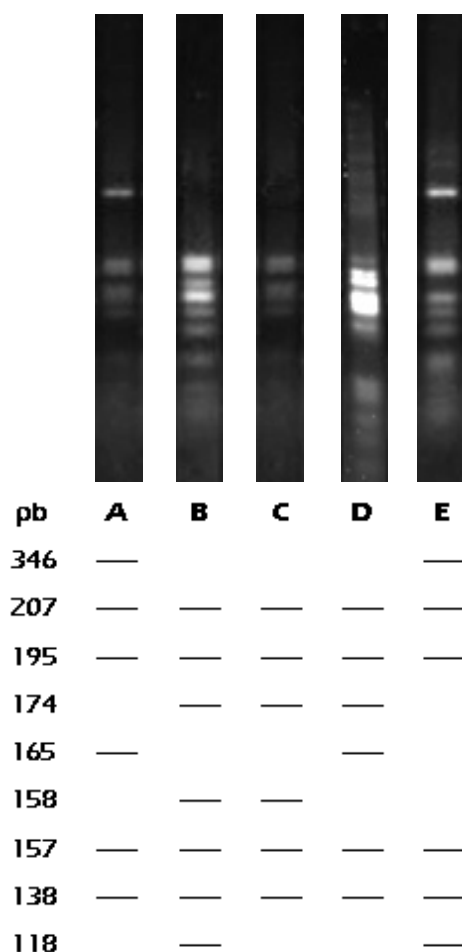


Figura 8: Perfis padrão obtidos com a técnica ARDRA

Os isolados 1, 3, 4, 5 e 8 e a estirpe CECT 839^T apresentam o perfil de bandas A, que corresponde a *Aeromonas hydrophila* (HG1). A estirpe referência CECT 4245^T (*A. sobria*) é a única que apresenta o perfil B, isto é, o perfil correspondente a *Aeromonas sobria* ou HG 5. A estirpe referência CECT 4246^T (*A. veronii* bv *sobria*) e CECT 4257^T (*A. veronii* bv *veronii*) (não apresentado na figura 7) originaram o perfil C que corresponde precisamente ao perfil de *Aeromonas veronii* (HG 8 e HG 10). A estirpe A19 e CECT 4232^T apresentam o perfil D que corresponde a espécies de *Aeromonas media* (HG5). Às estirpes 2, 7, 12 e 15, e CECT 894^T corresponde o perfil E. Segundo Figueras *et al.*(2000), este perfil ARDRA é comum a *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *Aeromonas* Group 501, *A. encheleia* e *A. popoffii*. Para distinguir estas estirpes recorreu-se às endonucleases *Pst*I e *Hae*III, tal como sugerido pelos autores, resultando num perfil de bandas que corresponde a *A. bestiarum* (ou HG2).

4.2 rep-PCR

Os perfis BOX e REP-PCR, obtidos pela amplificação com os "primers" BOXA1R (figura 9 A) e o par REP1R/2I (figura 9 B), originaram perfis com um número variável de bandas. Na maior parte dos isolados de *Aeromonas* spp. o número de bandas nos perfis rep-PCR é relativamente inferior ao número observado em estirpes tipo e referência. No entanto, estes perfis são mais complexos que os obtidos com a técnica ARDRA, e permitem também a diferenciação entre isolados.

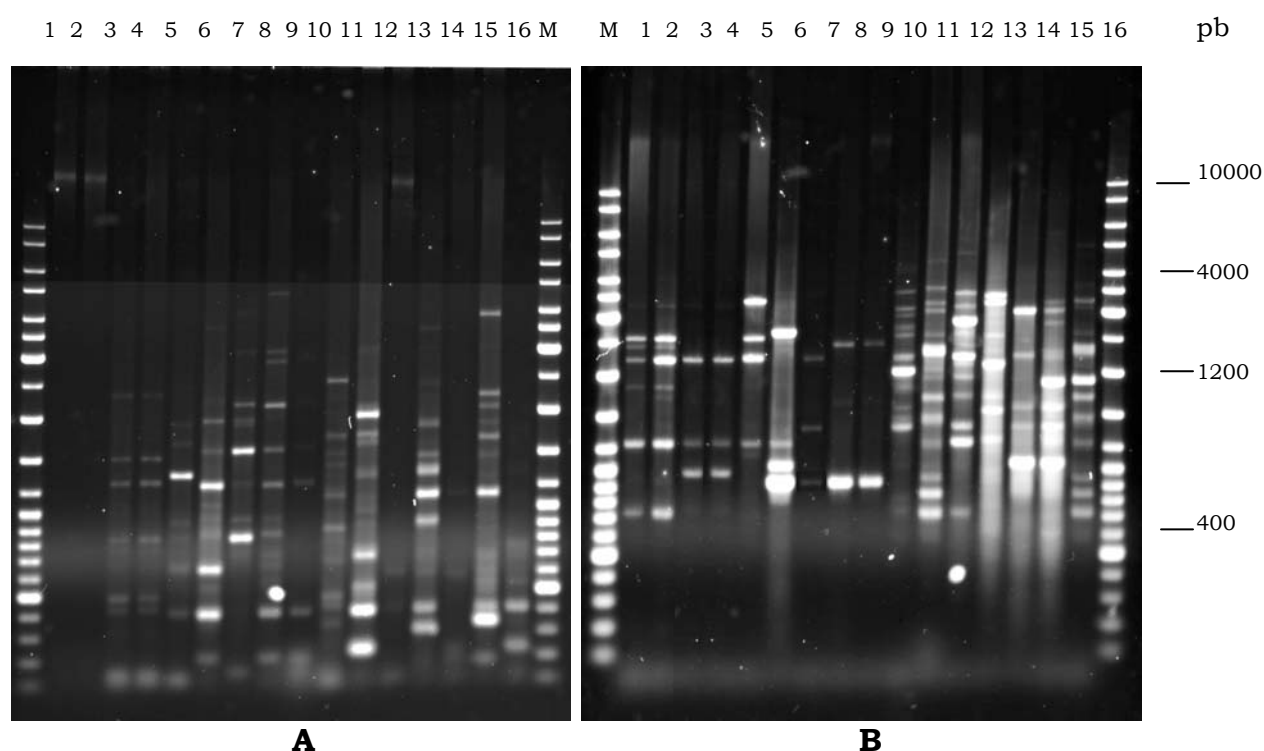


Figura 9: Perfil REP-PCR (A) e BOX-PCR (B); M- Gene Ruler™ DNA Ladder Mix; 1- A1; 2- A3; 3-A4; 4-A8; 5- A5; 6-A7; 7- A15; 8-A2; 9-A12; 10-A19; 11-32; 12-39; 13-45; 14-46; 15-57; 16-94.

Da análise dos perfis BOX e REP-PCR é possível diferenciar dois pares de estirpes que apresentam o mesmo perfil de bandas: A1/A3 e A4/A8.

Com exceção das estirpes designadas por A1 e A3, que apresentam um perfil REP-PCR idêntico ao da estirpe referência CECT 839^T (*A. hydrophila*), nenhum dos isolados apresenta um perfil de bandas idêntico aos perfis de qualquer uma das estirpes referência.

A combinação dos perfis BOX e REP-PCR permitiu diferenciação de todas as estirpes de *Aeromonas* spp., com excepção dos pares A1/A3 e A4/A8 que são exactamente iguais.

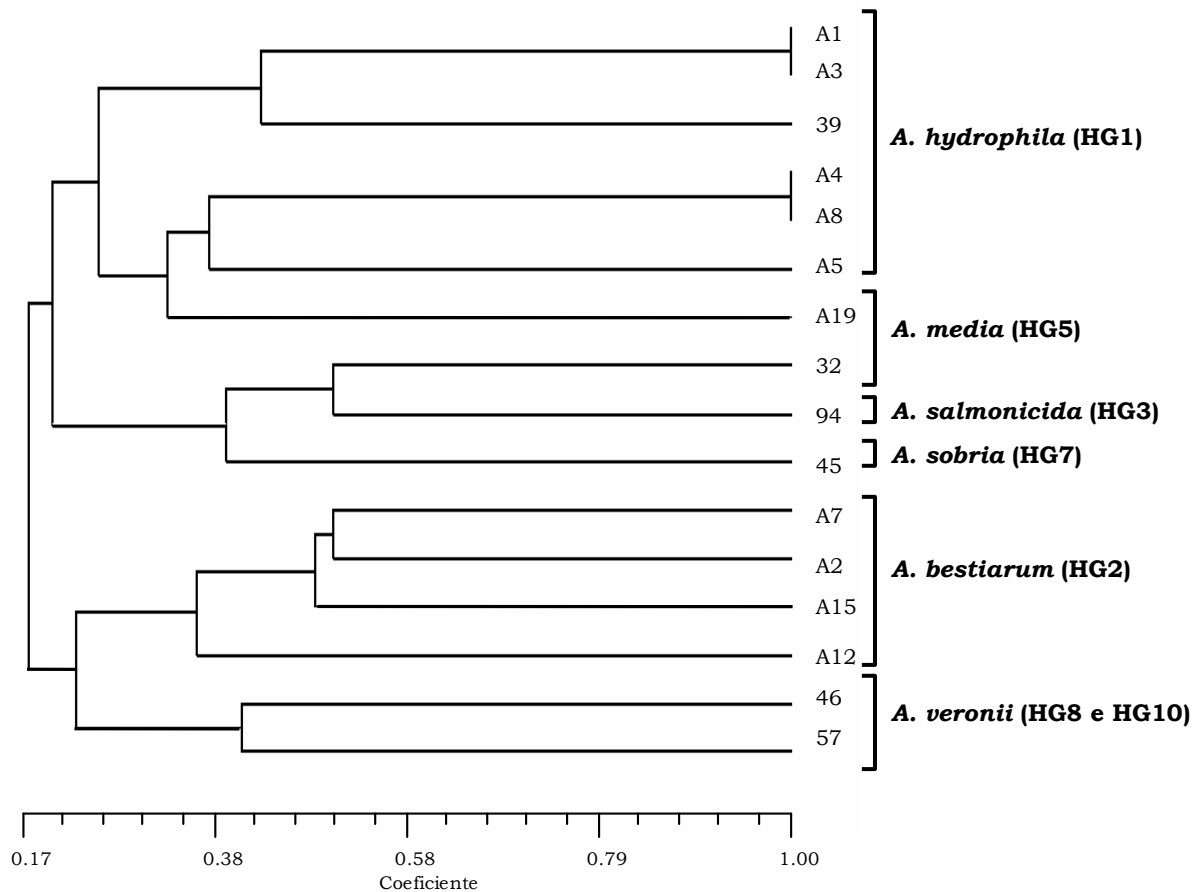


Figura 10: Dendrograma dos perfis BOX e REP-PCR combinados. A matriz de similaridade foi calculada usando o coeficiente de Dice. A análise de "clustering" da matriz de similaridade foi efectuada pelo método UPGMA. Coeficiente de correlação cofenético $r = 0,87437$

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

1. Identificação de isolados membros do género *Aeromonas*

Com o aumento do número de genótipos, subespécies e biótipos descritos para membros do género *Aeromonas*, na última década desenvolveram-se numerosos métodos moleculares para a rápida e correcta identificação de isolados ambientais e clínicos. Apesar de todos os esforços feitos, a identificação de algumas espécies é ainda problemática e por tal, a taxonomia do género *Aeromonas* continua a ser controversa (Janda *et al.*, 1996; Abbott *et al.*, 1998).

Neste trabalho, foram aplicados os sistemas comerciais API20 NE (bioMérieux) e VITEK (bioMérieux) para a identificação dos isolados de *Aeromonas* spp.. Ambos os sistemas revelaram-se incapazes de identificar correctamente os isolados ao nível da espécie. Com a aplicação da técnica ARDRA obtiveram-se perfis de bandas distintos para as espécies *Aeromonas hydrophila* (A1, A3, A4, A5, A8 e CECT 839^T), *A. sobria* (CECT 4245^T), *A. veronii* (CECT 4246^T e CECT 4257^T), *A. bestiarum* (A2, A7, A12 e A15), *A. media* (A19 e CECT 832^T) e *A. salmonicida* (CECT 894^T) (Borrell *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000).

Os sistemas de identificação comerciais como API20NE (bioMérieux) e VITEK (bioMérieux) não possibilitam a identificação fiável de membros do género *Aeromonas* ao nível da espécie ou como pertencentes a um dos complexos fenotípicos (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas salmonicida*) (Abbott *et al.*, 1998; Ling *et al.*, 2001). Estão descritos por vários autores casos em que isolados de *Aeromonas* spp. foram identificados incorrectamente como *Vibrio* spp., entre os quais os mais comuns *Aeromonas caviae* identificada como *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas schubertii* como *Vibrio damsela* e *Aeromonas veronii* biovar *veronii* como *Vibrio cholerae* (Abbott *et al.*, 1998; Janda *et al.*, 1995; Overman *et al.*, 1985). Estes erros podem ser prevenidos efectuando uma série de testes bioquímicos prévios que permitem distinguir *Aeromonadaceae* de *Vibrionaceae*, tais como testes de susceptibilidade ao agente vibriostático O/129, crescimento na presença e ausência de sal, teste de oxidase, entre outros (Janda *et al.*, 1995a; Hickman-Brenner *et al.*, 1988). Apesar de versões mais recentes de alguns sistemas comerciais de identificação de bactérias, tais como o sistema VITEK 2 (bioMérieux) apresentarem melhorias significativas (Abbott *et al.*, 1998; Funke *et al.*, 1998), na identificação de *Aeromonas* spp. continuam pouco precisos e pouco fiáveis (Ling *et al.*, 2001).

Os testes bioquímicos são usados rotineiramente na identificação de isolados do género *Aeromonas* e, apesar de úteis, são laboriosos, demorados e podem originar erros de identificação. Alguns destes métodos convencionais requerem o uso de pelo menos 18 testes bioquímicos para a identificação de espécies de *Aeromonas* (Janda *et al.*, 1996; Borrell *et al.*, 1997). As sequências dos genes ribossomais 16S mostraram ser ferramentas valiosas, que permitem a delimitação e identificação da maioria das espécies de *Aeromonas* (Martínez-Murcia *et al.*, 1992). O protocolo ARDRA ("Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis") descrito por Borrell e colaboradores para a identificação de espécies de *Aeromonas* consiste na amplificação de um fragmento do gene que codifica para o rRNA 16S, seguida da hidrólise deste fragmento com as endonucleases de restrição *AluI* e *MboI*. Estas foram escolhidas com base numa análise computacional com várias enzimas de restrição e todas as sequências conhecidas em *Aeromonas* spp. do gene que codifica para o rRNA 16S, que neste grupo exibem níveis elevados de similaridade. Algumas espécies apresentam diferenças em 3 nucleótidos como *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas media* ou mesmo num único nucleótido como *Aeromonas caviae* e *Aeromonas trota*. A análise de restrição dos fragmentos de rDNA 16S pela aplicação simultânea de *AluI* e *MboI* originou padrões específicos que permitem a identificação ao nível da espécie. Borrell e colaboradores avaliaram este método usando estirpes tipo de diferentes espécies e 76 isolados identificados previamente por testes bioquímicos convencionais (Borrell *et al.*, 1997; Martínez-Murcia *et al.*, 2000). Com a descrição de novas espécies como *Aeromonas popoffii* e *Aeromonas bestiarum*, este método foi revisto e melhorado por Figueras e colaboradores (Figueras *et al.*, 2000).

A técnica ARDRA tem por isso como vantagens a alta especificidade inerente ao tipo de sequências em estudo e a resultante elevada reprodutibilidade. A determinação da espécie com base em relações filogenéticas pode ser executada num curto espaço de tempo, a um custo razoável e para um elevado número de isolados (Borrell *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000).

Deleted: ¶

2. Pesquisa de genes de resistência a carbapenemos em isolados de *Aeromonas* spp.

O uso sistemático de antibióticos beta-lactâmicos resultou na disseminação indesejável de estirpes resistentes. A produção de beta-lactamases é o mecanismo de resistência bacteriana a antibióticos beta-lactâmicos mais comum e eficiente. Nos últimos anos, o aumento aparente na ocorrência de resistência bacteriana a antibióticos em várias áreas de produção animal e as possíveis implicações na saúde pública, levaram a que, em muitos países, aumentasse a vigilância e monitorização de resistência a agentes antibacterianos nestes ambientes (Schmidt *et al.*, 2000). No que diz respeito a aquacultura, têm sido discutidos tanto os problemas terapêuticos como os problemas ambientais, uma vez que, os agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções bacterianas em peixes de aquacultura, são libertados para as águas circundantes (Aoki, 1992; Levy, 1998).

Neste trabalho foi determinada a susceptibilidade dos isolados de *Aeromonas* spp. aos agentes antimicrobianos através da técnica de difusão em agar com discos de antibióticos beta-lactâmicos. A análise do antibiograma obtido revelou que a maioria dos isolados é resistente a penicilinas (amoxicilina, ampicilina, ticarcilina e carbenicilina) e cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina). São sensíveis a monobactâmicos (aztreonam) e a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (cefotaxima, cefoperazona e cefepime). A associação de inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico e o tazobactam, possibilita em algumas estirpes a recuperação da actividade dos antibióticos amoxicilina e ticarcilina. Em 7 isolados foi detectada resistência ao imipenemo. Tendo em conta estes dados, procedeu-se à caracterização molecular do mecanismo envolvido na resistência aos carbapenemos.

Com base nas sequências nucleotídicas já conhecidas dos genes *cphA* e *imiS*, e nas sequências de aminoácidos deduzidas das proteínas correspondentes, foram desenhados os "primers" Aer-R e Aer-F, a ser utilizados em PCR, para detectar genes homólogos no genoma das estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas. Em apenas 5 dos isolados e em 2 estirpes referência, foi possível amplificar por PCR um fragmento de DNA com o tamanho esperado, cerca de 670 pb, cuja sequência nucleotídica foi determinada. Da análise das sequências nucleotídicas determinadas para os fragmentos de DNA amplificados por PCR com os "primers"

Aer-R e Aer-F, assim como da análise das sequências de aminoácidos deduzidas, verificou-se que os fragmentos sequenciados apresentam elevada percentagem de identidade (96% a 99%) com sequências de genes de metalo-beta-lactamases já conhecidas de *Aeromonas* spp. e que os pares A1/A3 e A4/A8 apresentam sequências idênticas. O alinhamento múltiplo com sequências de aminoácidos de metalo-beta-lactamases já descritas em *Aeromonas* spp e as sequências deduzidas para os fragmentos de DNA de isolados de *Aeromonas* spp. permitiu a identificação de resíduos considerados importantes para a actividade catalítica de metalo-beta-lactamases, nomeadamente a sequência Asn-Tyr-His-Thr-Asp (NYHTD), assim como resíduos envolvidos na ligação de um dos iões de zinco levando a crer que correspondem a fragmentos de genes que codificam para metalo-beta-lactamases de classe B, subclasse B2 (Walsh *et al.* 1997, Galleni *et al.* 2001).

Por outro lado, os resultados obtidos por hibridação DNA-DNA com uma sonda marcada por PCR com os "primers" Aer-R e Aer-F, permitiram detectar sequências homólogas a *cphA/imiS* em todos os isolados que apresentaram actividade hidrolítica contra imipenemo. Entre as estirpes referência obteve-se sinal para *A. hydrophila* (CECT 839^T), *A. sobria* (CECT 4245^T), *A. veronii* bv *veronii* (CECT 4257^T) e *A. veronii* bv *sobria* (CECT 4246^T). Tanto para a estirpe referência CECT 839^T (*A. hydrophila*) como para CECT 4257^T (*A. veronii* bv *veronii*) observaram-se dois sinais de hibridação. Pela análise de todas as sequências nucleotídicas conhecidas do tipo *cphA*, a endonuclease de restrição escolhida (*Bam*HI) não corta o fragmento de DNA correspondente ao utilizado como sonda, pelo que os dois sinais positivos de hibridação DNA-DNA poderão indicar que no genoma destas estirpes existem duas cópias deste gene.

Em resumo, foram detectadas sequências nucleotídicas do tipo *cphA/imiS* em todos os isolados que mostraram resistência ao imipenemo: isolados de *A. hydrophila* (A1, A3, A4, A8, A5) e *A. bestiarum* (A2, A7 e A12). Não foi possível amplificar por PCR usando os "primers" desenhados nenhum fragmento de DNA de estirpes de *A. bestiarum*. No entanto, por hibridação DNA-DNA o sinal foi positivo. Possivelmente não há complementaridade entre o "primer" e o local de ligação à cadeia de DNA. Até ao momento não estão descritas metalo-beta-lactamases em *Aeromonas bestiarum*. A resistência a carbapenemos pode ter sido adquirida por trocas genéticas com estirpes produtoras de enzimas do tipo CphA através de elementos geneticamente móveis. Rossolini e colaboradores

detectaram numa estirpe de *Aeromonas caviae* a presença de sequências do tipo *cphA*. Esta espécie normalmente não apresenta o gene *cphA* no seu genoma, sugerindo assim que pode ocorrer a transferência horizontal do gene *cphA* para espécies que normalmente não o apresentam no seu genoma (Rossolini *et al.*, 1995). No entanto, nenhum estudo demonstrou a associação entre genes homólogos a *cphA/imiS* e elementos geneticamente móveis.

Relacionando a presença de sequências do tipo *cphA/imiS* e a produção de actividade de carbapenemase, apenas estirpes onde foram detectadas essas sequências foram capazes de expressar uma actividade enzimática similar. Estes dados sugerem que a produção de carbapenemases é restrita a estirpes de *Aeromonas* que apresentam no seu genoma genes similares a *cphA/imiS* e também que a actividade de carbapenemase detectada nessas estirpes é na verdade codificada por homólogos a *cphA/imiS*.

Nos últimos anos aumentou o número de novas beta-lactamases descritas capazes de hidrolisar carbapenemos como o imipenemo e meropenemo. Estes antibióticos beta-lactâmicos apresentam elevada resistência à acção hidrolítica de beta-lactamases, sendo muitas vezes referidos como antibióticos de último recurso, usados apenas no tratamento de infecções graves, em ambientes hospitalares (Bradley *et al.*, 1999; Bush e Miller, 1998; Norrby, 1995).

As metaloenzimas conhecidas em *Aeromonas* spp. pertencem ao subgrupo funcional 3b que inclui enzimas que hidrolisam preferencialmente carbapenemos, sendo por isso consideradas como as verdadeiras carbapenemases. Apesar de não conferirem resistência a penicilinas ou cefalosporinas, a combinação com outras beta-lactamases serínicas confere ao microrganismo resistência a todas as classes de antibióticos beta-lactâmicos (Walsh *et al.*, 1997; Segatore *et al.*, 1993; Avison *et al.*, 2000; Rossolini *et al.*, 1995).

3. Tipagem molecular de isolados de *Aeromonas* spp.

A técnica de tipagem rep-PCR faz uso de "primers" complementares a sequências de DNA repetidas altamente conservadas, presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias gram-negativas e em várias gram-positivas. Tem-se mostrado extremamente fiável, rápida e altamente discriminatória (Versalovic *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1996). Normalmente obtém-

se uma caracterização detalhada de um grupo de estirpes aplicando apenas um conjunto ou par de "primers".

O "primer" usado em BOX-PCR no grupo de isolados de *Aeromonas* spp. em estudo, originou perfis de bandas mais complexos. que os perfis gerados pelo par usado em REP-PCR, no entanto os perfis obtidos apresentam níveis de complexidade relativamente baixos. De notar que em ambos os casos o perfil de bandas originado em estirpes referência é significativamente mais complexo que os perfis gerados para isolados de *Aeromonas* spp.. A combinação dos perfis BOX e REP-PCR permitiu a diferenciação de todas as estirpes de *Aeromonas* spp., com excepção dos pares A1/A3 e A4/A8 que apresentam perfis de bandas idênticos.

Os métodos BOX- e REP-PCR revelaram-se bons métodos de tipagem genética de estirpes do género *Aeromonas*. Na sua maioria, as estirpes estudadas apresentaram perfis distintos entre si, como pode ser observado pelo dendrograma gerado pela análise de "clustering" (Fig. 10). Os perfis entre indivíduos da mesma espécie apresentam bandas em comum que poderão também ser úteis como marcadores moleculares de diagnóstico ao nível da espécie. Nos resultados obtidos é evidente a separação das estirpes de *A. hydrophila*, *A. bestiarum* e também das estirpes referência de *A. veronii*. No entanto, a estirpe designada por A19 identificada por ARDRA como *Aeromonas media* surge no dendrograma próxima das estirpes de *A. hydrophila* e não da estirpe referência CECT832^T (*A. media*) como seria de esperar. De facto, para a estirpe A19 os perfis resultantes tanto em BOX como em REP-PCR são bastante mais complexos que os perfis originados pelas restantes estirpes. A inclusão de um número superior de isolados desta espécie em estudos posteriores poderá esclarecer estes resultados anómalos.

Estirpes do género *Aeromonas* são isoladas frequentemente quer de amostras ambientais quer de amostras clínicas. As relações epidemiológicas são importantes para a compreensão do comportamento destes microrganismos nas infecções causadas quer em humanos quer em animais. O contacto directo com água e alimentos contaminados é o meio de colonização e infecção mais frequente (Burke *et al.* 1984; Burke *et al.* 1984a; Holmes *et al.*, 1996; Hänninen e Siitonen, 1995; Kirov, 1993; Haavelar *et al.*, 1992). Num ambiente hospitalar, a detecção da origem de infecção assim como a relação entre estirpes isoladas é essencial para a determinação das medidas adequadas para prevenir a disseminação de microrganismos patogénicos (Talon *et al.*, 1998).

Um sistema de tipagem molecular de microrganismos ideal deve ser altamente discriminatório, reprodutível e com capacidade para identificar relações epidemiológicas entre estirpes (Talon *et al.*, 1996). A identificação rápida de isolados e a realização de estudos de caracterização molecular de estirpes, nomeadamente estirpes resistentes a antibióticos, é essencial para elucidar os aspectos relacionados com a disseminação dos mecanismos de resistência associados. Os métodos de tipagem genética podem ser úteis na determinação das relações genéticas entre isolados ambientais e isolados clínicos que apresentem um fenótipo de resistência similar (Hänninen e Siitonen, 1995; Talon *et al.* 1996).

Em *Aeromonas* spp. foram aplicados diversos métodos de tipagem molecular nomeadamente RAPD ("Randomly Amplified Polymorphic DNA") ou AP-PCR ("Arbitrary Primer- PCR") (DavinRegli *et al.*, 1998; Oakey *et al.*, 1998), ribotipagem (Moyer *et al.*, 1992), ARDRA ("Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis")(Borrell *et al.*, 1997; Figueras *et al.* 2000) e análise de perfis de macrorestrição por electroforese em campo pulsado (PFGE- "Pulsed-Field Gel Electrophoresis"), muito utilizada em estudos de epidemiologia e disseminação de isolados clínicos (Hänninen e Hirvelä-Kosky, 1997; Talon *et al.* 1996; Villari *et al.*, 2000; Villari *et al.*, 2003; Bonadonna *et al.*, 2002). Talon e colaboradores usaram esta técnica de tipagem para a caracterização de estirpes de *Aeromonas hydrophila* isoladas em diferentes pacientes e também no reservatório de água de um hospital de modo a estabelecer uma relação epidemiológica. Este método de tipagem permitiu caracterizar e diferenciar todos os isolados e concluir que o reservatório de água não era a fonte de disseminação de *Aeromonas* spp (Talon *et al.* 1996). Embora moroso e tecnicamente complexo, o método de tipagem por electroforese em campo eléctrico pulsado é aparentemente a técnica mais promissora no estudo do significado clínico e dispersão geográfica de determinadas estirpes. Recentemente foi descrito outro método de tipagem designado por "Multilocus sequence typing" (MLST), que consiste na amplificação por PCR de um conjunto variável de genes, seguido de sequenciação do fragmento de DNA amplificado. Em *Aeromonas* spp, já foram testados os genes *rDNA* 16S, *recA*, *chiA* e *gyrB*, mostrando bons resultados no estabelecimento de relações epidemiológicas entre isolados (Carnahan *et al.*, 2002). Martínez-Murcia e colaboradores testaram em isolados clínicos e isolados ambientais de *Aeromonas veronii* um protocolo de tipagem baseado na amplificação por PCR e

restrição do fragmento de DNA entre os genes que codificam para rRNA 16S e 23S que se mostrou útil na caracterização de isolados desta espécie (Martínez-Murcia *et al.*, 2000).

Até ao momento não foi publicado nenhum trabalho que sugerisse a aplicação de REP- e BOX-PCR para a caracterização molecular de *Aeromonas* spp. No entanto DavinRegli e colaboradores aplicaram o conjunto de “primers” ERIC na tipagem de isolados de *A. hydrophila*, tendo obtido bons resultados (DavinRegli *et al.*, 1998).

Os métodos moleculares baseados em PCR apresentam diversas vantagens nomeadamente a sua rapidez, reprodutibilidade, facilidade de execução e elevado poder discriminatório. A combinação de métodos de tipagem baseados em PCR, como rep-PCR e MLST, com a técnica PFGE, que já demonstrou elevado poder discriminatório de estirpes de *Aeromonas* spp., poderá ser usada para detectar a origem ou fonte epidemiológica e monitorizar a dispersão de um determinado grupo de isolados, assim como avaliar o seu significado clínico.

Conclusões

A análise dos resultados obtidos neste trabalho permitiu tirar as seguintes conclusões:

- Os sistemas comerciais API20 NE (bioMérieux) e VITEK (bioMérieux) não são adequados para a identificação de isolados de *Aeromonas* spp ao nível da espécie.
- A aplicação da técnica ARDRA (“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”) permite identificar isolados de *Aeromonas* spp., nomeadamente as espécies: *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. media* e *A. salmonicida*.
- Os testes de susceptibilidade a antibióticos beta-lactâmicos revelaram que a maioria das estirpes de *Aeromonas* spp., isoladas da pele e rins de trutas arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) em aquacultura, são resistentes a penicilinas e cefalosporinas de 1^a geração. São sensíveis a monobactâmicos (aztreonamo) e a cefalosporinas de 3^a e 4^a geração (cefotaxima, cefoperazona e cefepime). Em 7 isolados foi detectada resistência ao imipenemo.
- Os “primers” desenhados Aer-R e Aer-F demonstraram ser uma boa ferramenta para a detecção por PCR de genes que codificam para metalo-beta-lactamases homólogas a *cphA* e/ou *imiS*.
- A análise dos fragmentos de DNA amplificados revelou que estes correspondem a fragmentos de genes que codificam para metalo-beta-lactamases de classe B, subclasse B2.
- Os dados sugerem que a produção de carbapenemases é restrita a estirpes de *Aeromonas* que apresentam no seu genoma genes similares a *cphA/imiS*.
- Os métodos BOX- e REP-PCR revelaram-se úteis na tipagem genética de estirpes do género *Aeromonas*, apresentando diversas vantagens nomeadamente a sua rapidez, reprodutibilidade, facilidade de execução e elevado poder discriminatório. Constituem uma ferramenta importante, e de fácil execução. em estudos clínicos, ambientais e epidemiológicos deste grupo de procariotas.

V.
BIBLIOGRAFIA

- Abbott, S.L.; Seli, L.S.; Catino, M.Jr; Hartley, M.A.; Janda, J.M.** (1998). Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1103-1104.
- Abraham, E. P.; Chain, E.** (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146:837
- Afzal-Shah, M.; Villar, H. E.; Livermore, D.M.** (1999). Biochemical characteristics of a carbapenemase from *Acinetobacter baumannii* isolate collected in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43:127-131.
- Ahmad, M.; Curban, C.; Mariano, N.; Bradford, P.A.; et al.** (1999). Clinical characteristics and molecular epidemiology associated with imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases* 29:352-355.
- Akkermans, A.D.L.; van Elsas, J.D.; de Bruijn, F.J.** (1995). Molecular Ecology Manual. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, pp. 1-488.
- Alderman, D.J.; Hastings, T.S.** (1998). Antibiotic use in aquaculture: development of resistance- potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology* 33(2): 139-155.
- Ali, A.; Carnahan, A.M.; Altwegg, M.; Lüthy-Hottensdtein, J.; Joseph, S.W.** (1996). *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non human sources. *Medical Microbiology Letters* 5:156-165.
- Allen, D.A.; Austin, B.; Colwell, R.R.** (1983). *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 599-604.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Ambler, R. P.** (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289(1036):321-331.
- Ash, C.; Martínez-Murcia, A.; Collins, A.D.** (1993). Molecular identification of *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas jandaei* by using a polymerase chain reaction-probe test. *FEMS Microbiology Letters* 2: 80-86.
- ASM- American Society of Microbiology** (1994). Report of the ASM task force on antibiotic resistance. In: [Http://www.asmsusa.org/pasrc/pdfs/antibiot.pdf](http://www.asmsusa.org/pasrc/pdfs/antibiot.pdf).
- Avison, M.B.; Niumsup, P.; Walsh, T.R.; Bennett, P.M.** (2000). *Aeromonas hydrophila* AmpH and CepH beta-lactamases: derepressed expression in mutants of *Escherichia coli* lacking *creB*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 695-702.

Bellais, S.; Leotard, S.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. (1999). Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *indologenes*. *FEMS Microbiology Letters* 171:127-132.

Bonadonna, L.; Briancesco, R.; Filetici, E.; Manuppella, A.; Pourshaban, M.; Semproni, M. (2002). Genomic heterogeneity of environmental and clinical aeromonads. *Microbiologica* 25:21-29.

Borrell, N.; Acinas, S.G.; Figueras, M.J.; Martinez-Murcia, A. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* 35(7):1671-1674.

Boschi, L.; Mercuri, P.S.; Riccio, M.L.; Amicosante, G.; Galleni, M.; Frère, J.M.; Rossolini, G.M. (2000). The *Legionella* (*Fluoribacter*) *gormanii* metallo-beta-lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1538-1543.

Bradford, P.A (2001). What's new in beta-lactamases?. *Current Infectious Diseases Reports* 3:13-19.

Bradley, J.; Garau, J.; Lode, H.; Rolston, K.; Wilson, S.; Quinn, J. (1999). Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11:93-100.

Burke, V.; Robinson, J.; Gracey, M.; Peterson, D.; Meyer, N.; Haley, V. (1984). Isolation of *Aeromonas* spp. from unchlorinated domestic water supply. *Applied and Environmental Microbiology* 48:367-370.

Burke, V.; Robinson, J.; Gracey, M.; Peterson, D.; Partridge, K. (1984a). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 48:361-366.

Bush, K. (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33:259-263.

Bush, K. (1999). Beta-lactamases of increasing clinical importance. *Current Pharmaceutical Design* 5:839-845.

Bush, K.; Jacoby, G.; Medeiros, A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(6):1211-1233.

Bush, K.; Macalintal, C.; Rasmussen, B.A.; Lee, V.J.; Yang, Y. (1993). Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37:851-858.

Bush, K.; Miller, G. (1998). Bacterial enzymatic resistance: beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 1:509-515.

- Carfi, A.; Duée, E.; Galleni, M.; Frère, J.M.; Dideberg, O.** (1998). 1.85 Å resolution structure of the zinc(II) beta-lactamase from *B. cereus*. *Acta Crystallogr. Sect. D* 54:313-323.
- Carfi, A.; Pares, S.; Duée, E.; Galleni, M.; Duez, C.; Frère, J.M.; Dideberg, O.** (1995). The 3D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO Journal* 14:4914-4921.
- Carnahan, A.M.; Stine, O.C.; Morris Jr., J.G.; Waddington, M.** (2002). MLST (Multilocus sequence typing) of a diverse group of *Aeromonas* strains. *7th International Symposium on Aeromonas and Plesiomonas (FEMS Meeting), September 8-10, Orihuela (Spain)* Abstract book pp. 16.
- Carnahan, A.M.; Behram, S.; Joseph, S.W.** (1991a). Aerokey: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 2843-2849.
- Carnahan, A.M.; Chakraborty, T.; Fanning, G.R.; Verma, D.; Janda, J.M.; Joseph, S.W.** (1991b). *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1206-1210.
- Collins, M.D.; Martínez-Murcia, A.; Cai, J.** (1993). *Aeromonas enteropelogenes* and an *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 855-856.
- Colwell, R.R.; MacDonnel, M.T.; De Ley, J.** (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 473.
- Crowder, M.; Walsh, T.** (1999). Structure and function of metallo-beta-lactamases. *Recent Research Development in Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 3:105-132.
- DavinRegli, A.; Bollet, C.; Chamorey, E.; Distria, V.C.; Cremieux, A.** (1998). A cluster of cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR. *Journal of Medical Microbiology* 47:499-504.
- Dever, L.; Dermody, T.** (1991). Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Archives in International Medicine* 151:886-895.
- Donald, H. M.; Scaife, W.; Amyes, S. G.; Young, H. K.** (2000). Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(1):196-199.
- Doukas, V.; Athanassopoulous, F.; Karagouni, E.; Dotsika, E.** (1998). *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea. *Journal of Fish Diseases* 21: 317-320.

- Esteve, C.; Gutierrez, M.C.; Ventosa, A.** (1995). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 462-466.
- Fabiane, S.M.; Sohi, M.K.; Wan, T.; Payne, D.J.; Bateson, J.H.; Mitchell, T.; Sutton, B.J.** (1998). Crystal structure of the zinc-dependent beta-lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å: binuclear active site with features of a mononuclear enzyme. *Biochemistry* 37:12404-12411.
- Figueras, M.J.; Guarro, J.; Martínez-Murcia, A.** (2000). Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2023-2025.
- Fuji, T.; Sato, K.; Miyata, K.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S.** (1986). Biochemical properties of beta-lactamase produced by *Legionella gormanii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29: 925-926.
- Funke, G.; Monnet, D.; DeBernardis, C.; von Graevenitz, A.; Freney, J.** (1998). Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. *Journal of Clinical Microbiology* 36(7): 1948-1952.
- Galleni, M.; Lammote-Brasseur, J., Rossolini, G., Spencer, J.; Dideberg, O.; Frère, J. and The Metallo-Beta-Lactamases Working group** (2001). Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(3):660-663.
- Hänninen, M.L.; Hirvelä-Kosky, V.** (1997). Pulsed-field electrophoresis in the study of mesophilic and psychrophilic *Aeromonas* spp. *Journal of Applied Microbiology* 83: 493-498.
- Hänninen, M.L.; Siitonen, A.** (1995). Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiology and Infection* 115: 39-50.
- Havelaar, A.H.; Schets, F.M.; van Silfhout, A.; Jansen, W.H.; Wienten, G.; van der Kooij, D.** (1992). Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 435-444.
- Hayes, M.V.; Thomson, C.J.; Amyes, S.G.B.** (1996). The "hidden" carbapenemase of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37: 37-44.
- Hickman-Brenner, F.W.; Fanning, G.R.; Arduino, M.J.; Brenner, D.J.; Farmer III, J.J.** (1988). *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1561-1564.
- Hickman-Brenner, F.W.; MacDonald, K.L.; Steigerwalt, A.G.; Fanning, G.R.; Brenner, D.J.; Farmer III, J.J.** (1987). *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 900-906.

- Holmes, P.; Niccols, L.M.; Sartory, D.P.** (1996). The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In: Austin B., Altwegg M., Gosling P.J., Joseph S., eds. *The Genus Aeromonas*. Chichester, England: John Wiley & Sons. pp. 127-150.
- Iaconis, J.P.; Sanders, C.C.** (1990). Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34:44-51.
- Janda, J.M.** (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 397-410.
- Janda, J.M.; Abbott, S.L.** (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases* 27: 332-344.
- Janda, J.M.; Abbott, S.L.; Khashe, S.; Kellogg, G.H.; Shimada, T.** (1996). Further studies on biochemical characteristics and serological properties of the genus *Aeromonas*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1930-1933.
- Janda, J.M.; Abbott, S.L.; Carnahan, A.M.** (1995). *Aeromonas* and *Plesiomonas* In: Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H., eds. *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. pp. 477-482.
- Janda, J.M.; Abbott, S.L.; Morris Jr, J.G.** (1995a). *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella* In: Blaser M.J., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrant R.L., eds. *Infections of the gastrointestinal tract*, 6th ed. New York, N.Y.: Raven Press, Ltd. pp. 905-917.
- Kirov, S.M.** (1993). The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *International Journal of Food Microbiology* 20: 179-198.
- Kotra, L.; Mobashery, S.** (1998). Beta-lactam antibiotics, beta-lactamases and bacterial resistance. *Bulletin Institut Pasteur* 96:139-150.
- Kotra, L.; Mobashery, S.** (1999). Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 47:211-266.
- Laraki, N.; Franceschini, N.; Rossolini, G.M.; Santucci, P.; Meunier, C.; de Pauw, E.; Amicosante, G.; Frère, J.M.; Galleni, M.** (1999). Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo-beta-lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(4):902-906.
- Lauretti, L.; Riccio, M.L.; Mazzariol, A.; Cornaglia, G.; Amicosante, G.; Fontana, R.; Amicosante, G.; Rossolini, G.M.** (1999). Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1584-1590.

- Levy, S.B.** (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am* 278:46-53.
- Ling, Thomas K.W.; Tam, P.C.; Liu, Z.K.; Cheng, Augustine F.B.** (2001). Evaluation of the VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 39(8): 2964-2966.
- Livermore, D.** (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 41:557-584.
- Livermore, D.** (1998). Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41(suppl. B):25-41.
- Louws, F.J.;** Schneider, M.; de Bruijn, F.J. (1996). In: Toranzos G. (ed), *Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples* pp. 63-94.
- MacManus, M.C.** (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J. Health-Syst. Pharm.* 54:1420-1433.
- Martínez-Martínez, L.; Pascual, A.; Hernández-Allés, S.; Alvarez-Díaz, D.; Suárez, A.; Tran, J.; Benedí, J.; Jacoby, G.** (1999). Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(7):1669-1673.
- Martínez-Murcia, A.J.; Borrell, N.; Figueras, M.J.** (2000). Typing of clinical and environmental *Aeromonas veronii* strains based on the 16S-23S rDNA spacers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 28:225-232.
- Martínez-Murcia, A.J.; Benlloch, S.; Collins, M.D.** (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42:412-421.
- Massidda, O.; Rossolini, G.M.; Satta, G.** (1999). The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamses. *Journal of Bacteriology* 173:4611-4617.
- Moyer, N.P.; Martinetti, G.; Lüthy-Hottenstein, J.; Altwegg, M.** (1992). Value of rRNA gene restriction patterns of *Aeromonas* spp. for epidemiological investigations. *Current Microbiology* 24:15-21.
- Naas T.; Nordmann P.** (1994). Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:7693-7697.
- Naas, T.; Vandael, L.; Sougakoff, W.; Livermore, D.; Nordmann, P.** (1994). Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(6):1262-1270.

- NCCLS** (1995). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards. M2-A5. Villanova, 5^a ed.
- Nikaido, H.** (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382-388.
- Norrby, S.** (1995). Carbapenems. *Medical Clinics of North America* 79(4):745-759.
- Oakey, H.J.; Gibson, L.F.; George, A.M.** (1998). Co-migration of RAPD-PCR amplicons from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters* 164:35-38.
- Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F.; Kato, N.** (1994). Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38:71-78.
- Overman, T.L.; Kessler, J.F.; Seabolto, J.P.** (1985). Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid NFT for identification of members of the family *Vibrionaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 22: 778-781.
- Page, M.** (1999). The reactivity of beta-lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design* 5:895-913.
- Paton, R.; Miles, R.S.; Hood, J.; Amyes, S.G.B.** (1993). ARI-1: Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2:81-88.
- Peters, G.; Faisal, M.; Lang, T.; Ahmed, I.** (1988). Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Diseases of Aquatic Organisms* 4: 83-89.
- Poirel, L.; Naas, T.; Nicolas, D.; Collet, L.; Bellais, S.; Cavallo, J.D.; Nordmann, P.** (2000). Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:891-897.
- Popoff, M.** (1984). Genus III. *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936, 398AL, p. 545-548. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.1*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 397-410.
- Popoff, M.; Coynault, C.; Kiredjian, M.; Lemelin, M.** (1981). Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Current Microbiology* 5: 109-11422.
- Rademaker, J.L.W.; de Bruijn, F.J.** (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews* (Caetano-Anollés, G.; Gresshoff, P.M., Eds), pp. 151-171. John Wiley and Sons, New York.
- Rasmussen, B.A.; Bush, K.** (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(2):223-232.

- Rasmussen, B.A.; Bush, K.; Keeney, D.; Yang, Y.; Hare, R.; O'Gara, C.; Medeiros, A.** (1996). Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(9):2080-2086.
- Rasmussen, B.A.; Gluzman, Y.; Tally, F.P.** (1990). Cloning and sequencing of the class B beta-lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34:1590-1592.
- Rasmussen, B.A.; Keeney, D.; Yang, Y.; Bush, K.** (1994). Cloning and expression of a cloxacillin hydrolyzing enzyme and a cephalosporinase from *Aeromonas sobria* AER 14M in *Escherichia coli*: requirements for an *E. coli* chromosomal mutation for efficient expression of the class D enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38:2078-2085.
- Riccio, M.L.; Franceschini, N.; Boschi, L.; Caravelli, B.; Cornaglia, G.; Fontana, R.; Amicosante, G.; Rossolini, G.M.** (2000). Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allele variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1229-1235.
- Richmond, M. H.; Sykes, R. B.** (1973). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in Microbial Physiology* 9:31-88.
- Rossolini, G.M.; Zanchi, A.; Chiesurin, A.; Amicosante, G.; Satta, G.; Guglielmetti, P.** (1995). Distribution of *cphA* or related carbapenemase-encoding genes and production of carbapenemase activity in members of the genus *Aeromonas*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(2):346-349.
- Sanchagrín, F.; Dufresne, J.; Levesque, R.C.** (1998). Molecular heterogeneity of the L-1 metallo-beta-lactamase family from *Stenotrophomonas maltophilia*, including carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:1245-1248.
- Schmidt, A** (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environment bacteria associated with four danish rainbow trout farms. *Applied Environmental Microbiology* 66(11): 4908-4915.
- Schubert, R.H.W.; Hegazi, M.; Wahlig, W.** (1990a). *Aeromonas enteropelogenes* species nova. *Hyg. Med.* 15: 471-472.
- Schubert, R.H.W.; Hegazi, M.; Wahlig, W.** (1990b). *Aeromonas ichthiosmia* species nova. *Hyg. Med.* 15: 477-479.
- Schubert, R.H.W.; Hegazzi, M.** (1988). *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene A* 268: 34-39.
- Segatore, B.; Massidda, O.; Satta, G.; Setacci, D.; Amicosante, G.** (1993). High specificity of *cphA*-encoded metallo-beta-lactamase from *Aeromonas*

hydrophila AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37:1324-1328.

Senda, K.; Arakawa, Y.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ichiyama, S.; Shimokata, K.; Kato, N.; Ohta, M. (1996). Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:349-353.

Shannon, K.; King, A.; Phillips, I. (1986). Beta-lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 17: 45-50.

Spratt, G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264: 388-393.

Talon, D.; Mulin, B.; Thouverez, M. (1998). Clonal identification of *Aeromonas hydrophila* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *European Journal of Epidemiology* 14:305-310.

Talon, D.; Dupont, M.J.; Thouverez, M.; Michel-Briand, Y. (1996). Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Bacteriology* 80:277-282.

Tan, Y.-T.; Tillet, D.; Mckay, I. (2000). Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Molecular Medicine Today* 6:309-314.

Therrien, C.; Levesque, R. (2000). Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 251-262.

Thompson, J.; Malamy, M. (1990). Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* beta-lactamase II. *Journal of Bacteriology* 172:2584-2593.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Tipper D. J.; Strominger J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* 54(4):1133-41.

van Belkum, A.; Scherer, S.; van Alphen, L.; Verbrugh, H. (1998). Short-sequence repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(2):275-293.

Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J.R. (1991). Distribution of DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19(24):6823-6831.

Versalovic, J.; Schneider, M.; de Bruijn, F.J.; Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using the repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5:25-40.

Villari, P.; Crispino, M.; Montuori, P.; Bocciai, S. (2003). Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1):697-701.

Villari, P.; Pucino, A.; Santagata, N.; Torre, I. (2000). Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp. in ready-to-eat foods in Italy. *Journal of Food Protection* 63:1754-1757.

Walsh, T.R.; Hall, L.; Assinda, S.J.; Nichols, W.W.; Cartwright, S.J.; MacGowan, A.P.; Bennett, P.M. (1994). Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochem Biophys Acta* 1218:199-201.

Walsh, T.R.; Neville, W.A.; Haran, M.H.; Tolson, D.; Payne, D.J.; Bateson, J.H.; et al. (1998). Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-beta-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:436-439.

Walsh, T.R.; Neville, W.A.; Haran, M.H.; Tolson, D.J.; Payne, D.J.; Bateson, J.H.; MacGowan, A.P.; Bennett, P.M. (1998). Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-beta-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:436-439.

Walsh, T.R.; Payne, D.J.; MacGowan, A.P.; Bennett, P.M. (1995). A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomal mediated inducible beta-lactamases: cephalosporinases, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35:271-279.

Walsh, T.R.; Stunt, R.A.; Nabi, J.A.; MacGowan, A.P.; Bennett, P.M. (1997). Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40:171-178.

Wang, Z.; Fast, W.; Valentine, A.; Benkovic, S. (1999). Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology* 3:614-622.

Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35:147-151.

Wayne, L.J.; Brenner, D.J.; Colwell, R.R.; Grimont, P.A.D.; Kandler, P.; Krichevsky, M.I. Moore, L.H.; Murray, R.G.E.; Stackebrandt, E.; Starr, M.P.; Trüper, H.G. (1987). *International Journal on Systematic Bacteriology* 37: 463-464.

Weisburg, W.G.;; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2):697-703.
Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Reviews* 51: 221-271.

Woodford, N.; Palepou, M.-F.I.; Babini, G.S.; Holmes, B.; Livermore, D.M. (2000). Carbapenemases of *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum*: distribution of *blaB* and characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *blaB3*, in the type strain, NCTC 10016. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1448-1452.

Yang, Y.; Bush, K. (1996). Biochemical characterization of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase AsbM1 from two *Aeromonas sobria* AER14M: a member of a novel subgroup of metallo-beta-lactamases. *FEMS Microbiology Letters* 137:193-200.

VI.

ANEXOS

Anexo 1: Marcadores de peso molecular para DNA

Na tabela seguinte apresenta-se o tamanho correspondente a cada uma das bandas existentes nos marcadores de peso molecular para DNA utilizados neste trabalho.

	Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (pb)	Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus (pb)	Mass Ruler™ DNA Ladder High Range (pb)	Mass Ruler™ DNA Ladder Low Range (pb)	Lambda/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> (pb)
1	10000	3000	10000	1031	21226
2	8000	2000	8000	900	5148
3	6000	1500	6000	800	4973
4	5000	1200	5000	700	4268
5	4000	1031	4000	600	3530
6	3000	900	3000	500	2027
7	2500	800	2500	400	1904
8	1500	700	2000	300	1584
9	1200	600	1500	200	1375
10	1031	500		100	947
11	900	400		80	831
12	800	300			564
13	700	200			
14	600	100			
15	500				
16	400				
17	300				
18	200				
19	100				

Anexo 2: "Primers"

Na tabela seguinte é apresentada a listagem dos "primers" utilizados no decorrer deste trabalho. Para cada "primer" apresenta-se a temperatura de "melting", a sequência nucleotídica, o produto e o procedimento onde foi usado.

"Primer"	Tm (°C)	Sequência 5'-3'	Produto	Procedimento
Aer-R	64,2	GCCTTGATCAGCGCTTCGTAGTG	CphA/ImiS	PCR
Aer-F	67,6	GCGGGGATGTCGCTGACGCAG	CphA/ImiS	PCR
Eric1	60,3	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA	Elementos ERIC	rep-PCR
Eric2	62,1	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Elementos ERIC	rep-PCR
REP1R	46	NNNICGICATCIGGC	Elementos REP	rep-PCR
REP2R	44	NCGICTTATCIGGCCTAC	Elementos REP	rep-PCR
BOX9R	57	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Elementos Box	rep-PCR
FD1	47	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	rDNA16S	ARDRA
RD1	44	AAGGAGGTGATCCAGCC	rDNA16S	ARDRA

Anexo 3: Endonucleases de restrição

Na tabela seguinte é apresentada a listagem das endonucleases de restrição utilizadas no decorrer deste trabalho. Para cada ER apresenta-se a sequência de reconhecimento e a temperatura de reacção.

ER	T reacção (°C)	Sequência reconhecida
<i>EcoRI</i>	37	G*AATTC
<i>BamHI</i>	37	G*GATCC
<i>MboI</i>	37	*GATC
<i>AluI</i>	37	AG*CT
<i>PstI</i>	37	CTGCA*G
<i>HaeIII</i>	37	GG*CC