

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE BIOMEDICINA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA**

**Presença do gene *qacEΔ1* em cepas de *Acinetobacter* sp.  
multirresistentes de origem clínica e de efluente hospitalar**

Maysa Lucena de Souza

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2012.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE BIOMEDICINA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA**

**Presença do gene *qacEΔ1* em cepas de *Acinetobacter sp.*  
multirresistentes de origem clínica e de efluente hospitalar**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção de grau em Biomedicina.

Maysa Lucena de Souza

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gertrudes Corção

Co-orientadora: Natália Canal, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maurício e Rosane, pelo incentivo ao estudo e pelo apoio às minhas escolhas, bem como pelo exemplo de responsabilidade e honestidade que representaram para mim.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por mais esta conquista, pois a ti, Senhor, devo tudo o que tenho e tudo o que sou.

À minha família pela dedicação, amor e carinho, bem como pelo apoio necessário para minha formação. Foram indispensáveis seus conselhos, incentivos e paciência que tiveram comigo.

À minha orientadora Dra. Gertrudes Corção, por ter me recebido para realização deste trabalho com profissionalismo, orientação de qualidade e por todo ensinamento a mim concedido.

À minha co-orientadora Natália Canal, pelos conhecimentos que me transmitiu e pelo auxílio e paciência.

Aos meus colegas do laboratório 166 que tornaram o dia-a-dia mais agradável e descontraído com nossas conversas e risadas, assim como pela torcida e pelas palavras de conforto para os pequenos problemas do cotidiano.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul que me proporcionou uma formação de qualidade.

Aos meus amigos queridos, ao meu amor e aos colegas de faculdade que participaram de todas as etapas da minha formação, seja na ajuda pessoal, como profissional e que proporcionaram anos inesquecíveis da minha juventude.

## ÍNDICE

RESUMO.....	7
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	8
2. ARTIGO.....	14
2.1 Resumo.....	15
2.2 Introdução.....	16
2.3 Materiais e métodos.....	18
2.3.1 Isolados de <i>Acinetobacter</i> sp. analisados.....	18
2.3.2 Seleção de isolados analisados.....	18
2.3.3 Extração de DNA.....	19
2.3.4 Detecção do gene <i>qacEΔ1</i> por reação em cadeia da polimerase.....	20
2.4 Resultados.....	21
2.5 Discussão.....	22
2.6 Conclusão.....	25
2.7 Referências.....	27
2.8 Tabela 1.....	29
2.9 Tabela 2.....	30
3. CONCLUSÃO GERAL.....	31
4. REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....	32
5. ANEXOS.....	33

## RESUMO

*Acinetobacter* sp. é um patógeno oportunista de importância clínica frequentemente relacionado com infecções em diversos sítios do corpo humano e é capaz de adquirir mecanismos e genes de resistência a agentes antimicrobianos com facilidade. Os compostos de quaternário de amônio (QAC) são largamente utilizados como anti-sépticos e desinfetantes em ambientes hospitalares, no entanto, têm apresentado problemas de resistência por bactérias Gram-negativas, como por *Acinetobacter* sp. A presença do gene *qacEΔ1* confere resistência ao QAC, sendo este gene encontrado em integrons de bactérias Gram-negativas e pode ser responsável por este perfil de resistência. No presente estudo 29 isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, 22 de origem clínica e sete de efluente hospitalar, foram testados quanto a presença do gene *qacEΔ1* através da realização da técnica de PCR. Os mesmos isolados foram testados em estudo anterior quanto a presença de bomba de efluxo e os resultados comparados ao da presença do gene *qacEΔ1*. Verificou-se a presença do gene em 13 isolados, sendo que em cinco destes isolados, *qacEΔ1* pode ser o fator essencial para resistência ao QAC e nos demais o perfil de resistência foi associado também à presença de bomba de efluxo. Além disso, em cinco isolados não foi identificado nem a presença do gene, nem da bomba de efluxo, de forma que, estes devem ter outros mecanismos de resistência ao quaternário de amônio. Desta maneira, pode-se inferir que a presença do gene *qacEΔ1* possivelmente está associada a resistência ao QAC nos isolados que o apresentaram.

**Palavras chaves:** *Acinetobacter baumannii*; composto de quaternário de amônio; gene *qacEΔ1*.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A significância das bactérias patogênicas encontradas no meio ambiente e que causam doenças em humanos sempre foi relevante, pois acarreta infecções em todo o mundo. Atualmente muitas destas bactérias responsáveis por diversos tipos de infecções são caracterizadas por um perfil de multirresistência a antimicrobianos utilizados na rotina do tratamento, tornando-o ainda mais difícil.

O aumento da resistência a antimicrobianos e também a compostos desinfetantes tem causado preocupação aos órgãos de saúde pública em todo mundo. Bactérias que antes apresentavam uma patogenicidade questionável, hoje são vistas como causadoras de infecções importantes. Um dos grandes problemas é o uso inadequado de agentes antimicrobianos que pode promover esta seleção de bactérias resistentes.

A dispersão de bactérias multirresistentes no ambiente é um fator importante para a disseminação da resistência, facilitando a introdução de genes de resistência em ecossistemas bacterianos naturais. Um dos meios mais envolvidos nesta disseminação é o meio hídrico como os efluentes hospitalares, onde a ausência de um tratamento adequado de esgoto hospitalar proporciona este fato.

Um dos microorganismos presentes em efluentes hospitalares é o gênero *Acinetobacter* sp., um cocobacilo Gram-negativo, não fermentador, aeróbico considerado um patógeno oportunista de importância clínica que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos, podendo ocasionar infecções em diversos sítios do corpo humano. Eles são comumente associados à colonização da pele de pacientes hospitalizados e têm sido associados com infecções graves, como infecções causadoras



de pneumonia, bacteremia urinária, infecções do trato urinário, infecções de feridas e meningite mundial (Misbah *et al.*, 2005).

Dentro deste gênero, a espécie *Acinetobacter baumannii* se destaca pela sua presença em surtos de infecções nosocomiais que se tornaram freqüentes em hospitais em todo o mundo, causando alta mortalidade se não devidamente controlados. Estes microrganismos são muito versáteis, crescendo em amplas faixas de temperatura e pH, e tais propriedades explicam a capacidade dos mesmos persistirem em condições úmidas ou secas no ambiente hospitalar, contribuindo assim para a sua transmissão (Abbo *et al.*, 2005).

Além disso, *Acinetobacter* sp. tem uma capacidade inata de aceitar prontamente DNA exógeno, incluindo determinantes genéticos para a resistência aos antimicrobianos. A sua capacidade intrínseca para desenvolver rapidamente multirresistência antimicrobiana e para sobreviver em longo prazo sobre superfícies secas também pode desempenhar um papel crucial nas infecções adquiridas em hospitais (Kawamura-Sato *et al.*, 2010).

A resistência a antimicrobianos pode ser atribuída devido ao sinergismo entre a redução da entrada da droga (principalmente pela diminuição da permeabilidade da membrana externa) e a expulsão da droga (via bomba de efluxo), o que se resume em uma menor suscetibilidade aos antimicrobianos (Magnet *et al.*, 2001). Isso somado à alta capacidade de adquirir fatores genéticos de resistência e à sua resistência intrínseca contribuem para a persistência de *Acinetobacter* sp. multirresistentes no ambiente hospitalar.

Biocidas, incluindo anti-sépticos e desinfetantes, são muito utilizados em hospitais e outros serviços de saúde para a contenção de microrganismos em

equipamentos médicos e ambientes hospitalares. Em particular, os desinfetantes desempenham um papel importante no controle e prevenção de Infecções Associadas à Assistência à Saúde (Kawamura-Sato *et al.*, 2010). Antimicrobianos, detergentes, desinfetantes e resíduos industriais, como metais pesados, geralmente são lançados ao mesmo tempo em corpos d'água, exercendo uma atividade seletiva neste ambiente. Desta maneira, o efluente não só constitui uma forma de disseminação de organismos resistentes, mas também se torna uma via pela qual genes de resistência são introduzidos em ecossistemas bacterianos naturais (Baquero *et al.*, 2008).

A presença de um gene de resistência em seu genoma também pode ser um fator pelo qual a bactéria adquire um perfil de resistência. Os genes de resistência geralmente estão localizados em integrons, os quais são sistemas de recombinação naturais que permitem a captura e expressão de cassetes gênicos (Moura *et al.*, 2007). Os integrons são compostos de dois segmentos conservados, o segmento conservado 5' (5'-CS) e o segmento conservado 3' (3'-CS), separados por uma região interna variável na qual podem ser inseridos genes de resistência a antimicrobianos, contribuindo para o fenótipo de multirresistência (Hall *et al.*, 1991). Integrons têm sido encontrados em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* sp. em todo o mundo, principalmente integrons de classe 1 que são mais comumente encontrados, e tem-se sugerido que os isolados multirresistentes podem servir como um reservatório de genes de resistência (Gallego & Towner, 2001).

Cassetes gênicos compreendem uma fase de leitura aberta e um sítio de recombinação, necessário para sua integração no integron (Moura *et al.*, 2007). Estes cassetes são capturados pelos integrons e geralmente contém genes de resistência a antimicrobianos e podem ser disseminados para outros patógenos no ambiente hospitalar

(Partridge *et al.*, 2009; Gallego & Towner, 2001). Além disso, dependem do promotor do integron para realização da sua transcrição, pois não possuem promotor próprio (Recchia & Hall, 1995).

Os compostos de quaternário de amônio (QAC) são largamente utilizados como antissépticos e desinfetantes devido à sua ação surfactante e à baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbiocida. Esses compostos são considerados antimicrobianos de pequeno espectro de ação, por atuarem sobre bactérias não esporuladas, causando uma perda estrutural da organização e da integridade da membrana citoplasmática destas bactérias, juntamente com outros efeitos prejudiciais para o crescimento bacteriano. Agem também sobre fungos e vírus com envoltório lipídico, inativando-os, não sendo, porém, capazes de inativar esporos bacterianos, micobactérias e vírus sem envoltório (McDonell *et al.*, 1999).

Entretanto, bactérias Gram-negativas têm apresentado resistência a QAC presentes em desinfetantes de uso hospitalar e doméstico, indicando que estas bactérias adquiriram um possível mecanismo de resistência (Miyagi *et al.*, 2000). Em estudos anteriores a fim de avaliar a prevalência de integrons em vários ambientes naturais, verificou-se que integrons de classe 1 estavam presentes em 3,8% dos isolados bacterianos (tanto bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas) em ambientes contaminados por compostos de quaternário de amônio (Gaze *et al.*, 2005).

A presença de um gene de resistência ao QAC localizado na região conservada do integron é um possível mecanismo para resistir à ação microbicida deste composto, fato este que pode selecionar isolados multirresistente aos antimicrobianos. A resistência de *A. baumannii* ao composto quaternário de amônio propicia a sua seleção dentre as

não resistentes e promove sua sobrevivência em hospitais, bem como em efluentes hospitalares, que pode proporcionar o acometimento de pacientes imunocomprometidos.

Genes de resistência a antimicrobianos encontrados em isolados estão localizados em integrons que por sua vez são constituídos de duas regiões conservadas e uma variável. A região conservada 3' do integron de classe 1 geralmente inclui o gene *qacEΔ1* que confere resistência a desinfetantes, o gene *sul1* que promove resistência sulfonamidas e uma fase de leitura aberta (ORF5) de função desconhecida (Figura 1). O *qacEΔ1* foi descrito como uma versão modificada do gene *qacE*, um gene que codifica a resistência a compostos de quaternário de amônio e corantes tais como brometo de etídio, localizados em integrons de classe 1 de Gram-negativas (Paulsen *et al.*, 1993). Desta maneira, bactérias que abrigam estes integrons de classe 1 também são resistentes aos desinfetantes como QAC.

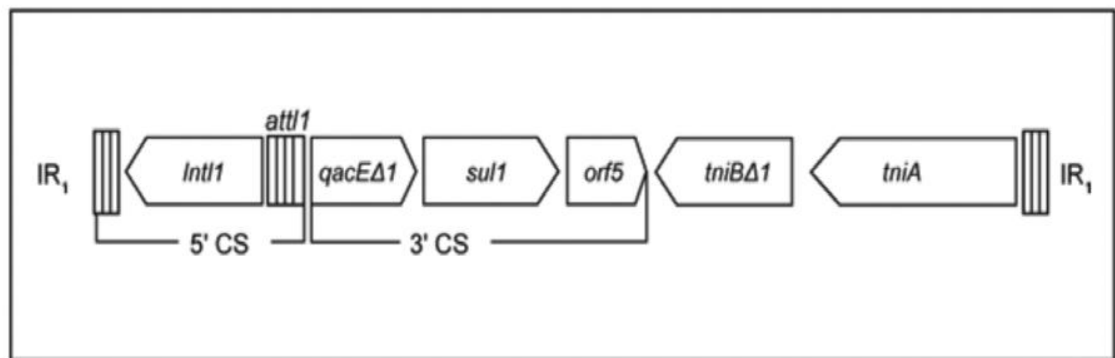


Figura 1: Estrutura esquemática da composição do Integron de classe 1. FONTE: Mendes *et al.* (2006).

Pouco se sabe sobre a ocorrência de genes *qacE/EΔ1* e sobre a correlação desses genes com a resistência ao QAC. Porém em estudo anterior em relação a análise de isolados clínicos multirresistentes a antimicrobianos, foi relatado que o gene *qacEΔ1* sozinho estava presente em 81% dos isolados, indicando uma alta prevalência de

integrons (Kücken, *et al.*, 2000). Devido a este problema de saúde pública que vem se desenvolvendo, é de grande importância o estudo da causa desta resistência para posterior controle dessa disseminação das bactérias multirresistentes.

## 2. ARTIGO

Este artigo será submetido ao Brazilian Journal of Microbiology e as normas para preparação e formatação do manuscrito encontram-se, em anexo, no final do trabalho:

### **Presença do gene *qacEΔ1* em cepas de *Acinetobacter* sp. multirresistentes de origem clínica e de efluente hospitalar**

<sup>1</sup>Maysa Lucena de Souza; <sup>2</sup>Natália Canal; <sup>3</sup>Gertrudes Corção

<sup>1</sup>Acadêmica em Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

<sup>2</sup>Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

<sup>3</sup>Professor Associado III do Departamento de Microbiologia e membro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Endereço para correspondência: Sarmiento Leite, 500.

Porto Alegre, RS, Brasil

Cep: 90050-170

Tel/Fax: 55 51 33083445

Contato por: [maysa\\_luce@hotmail.com](mailto:maysa_luce@hotmail.com); [naticanal08@yahoo.com.br](mailto:naticanal08@yahoo.com.br); [corcao@ufrgs.br](mailto:corcao@ufrgs.br)

## RESUMO

*Acinetobacter* sp. é um patógeno oportunista de importância clínica frequentemente relacionado com infecções em diversos sítios do corpo humano e é capaz de adquirir mecanismos e genes de resistência a agentes antimicrobianos com facilidade. Os compostos de quaternário de amônio (QAC) são largamente utilizados como anti-sépticos e desinfetantes em ambientes hospitalares, no entanto, têm apresentado problemas de resistência por bactérias Gram-negativas, como por *Acinetobacter* sp. A presença do gene *qacEΔ1* confere resistência ao QAC, sendo este gene encontrado em integrons de bactérias Gram-negativas e pode ser responsável por este perfil de resistência. No presente estudo 29 isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, 22 de origem clínica e sete de efluente hospitalar, foram testados quanto a presença do gene *qacEΔ1* através da realização da técnica de PCR. Os mesmos isolados foram testados em estudo anterior quanto a presença de bomba de efluxo e os resultados comparados ao da presença do gene *qacEΔ1*. Verificou-se a presença do gene em 13 isolados, sendo que em cinco destes isolados, *qacEΔ1* pode ser o fator essencial para resistência ao QAC e nos demais o perfil de resistência foi associado também à presença de bomba de efluxo. Além disso, em cinco isolados não foi identificado nem a presença do gene, nem da bomba de efluxo, de forma que, estes devem ter outros mecanismos de resistência ao quaternário de amônio. Desta maneira, pode-se inferir que a presença do gene *qacEΔ1* possivelmente está associada a resistência ao QAC nos isolados que o apresentaram.

**Palavras chaves:** *Acinetobacter baumannii*; composto de quaternário de amônio; gene *qacEΔ1*.

## 2.2 INTRODUÇÃO

O aumento relativo de bactérias patogênicas multirresistentes encontradas no meio ambiente tem causado preocupação aos órgãos de saúde pública em todo mundo. Bactérias que antes apresentavam uma patogenicidade questionável, hoje são vistas como causadoras de infecções importantes. Muitas destas bactérias são caracterizadas por um perfil de multirresistência a antimicrobianos utilizados na rotina do tratamento, tornando-o ainda mais difícil. Um dos grandes problemas é o uso inadequado de agentes antimicrobianos que podem promover o surgimento de bactérias resistentes, bem como a dispersão das mesmas, principalmente em meio hídrico como efluentes hospitalares, onde a ausência de um tratamento adequado de esgoto hospitalar proporciona este fato.

Um dos microrganismos presentes em efluentes hospitalares são os membros do gênero *Acinetobacter* sp., um cocobacilo Gram-negativo, não fermentador, aeróbico considerado um patógeno oportunista de importância clínica que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos, podendo ocasionar infecções em diversos sítios do corpo humano. Eles são comumente associados à colonização da pele de pacientes hospitalizados e têm sido associados com infecções graves, como infecções causadoras de pneumonia, bacteremia urinária, infecções do trato urinário, infecções de feridas e meningite meningocócica [12].

Entre este gênero, a espécie *Acinetobacter baumannii* se destaca pela sua presença em surtos de infecções nosocomiais que se tornaram frequentes em hospitais por todo o mundo, causando alta mortalidade quando não devidamente controlados. Estes microrganismos são muito versáteis, crescendo em condições variadas de temperatura e pH, e tais propriedades explicam a capacidade dos mesmos persistirem em



condições úmidas ou secas no ambiente hospitalar, contribuindo assim para a sua transmissão [1].

Biocidas, incluindo anti-sépticos e desinfetantes, são frequentemente utilizados em hospitais e outros serviços de saúde para a esterilização de equipamentos médicos e de ambientes hospitalares. Entre eles, os compostos de quaternário de amônio (QAC) são largamente utilizados como antissépticos e desinfetantes devido à sua baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbicida. Estes produtos são geralmente eliminados ao mesmo tempo na água de forma inadequada e sem cuidados, exercendo uma atividade seletiva para as bactérias resistentes [9,2].

Apesar do seu poder microbiocida, o QAC tem apresentado problemas de resistência por bactérias Gram-negativas em desinfetantes de uso hospitalar e doméstico, indicando que estas bactérias adquiriram um possível mecanismo de resistência [13]. A presença de um gene de resistência ao QAC localizado na região conservada do integron é um possível mecanismo para resistir à ação microbicida deste composto. A resistência de *Acinetobacter baumannii* ao composto quaternário de amônio propicia a sua seleção dentre as não resistentes e promove sua sobrevivência em hospitais, bem como em efluentes hospitalares, que podem proporcionar o acometimento de pacientes imunocomprometidos.

Genes de resistência encontrados em isolados bacterianos geralmente estão localizados em integrons, que por sua vez são constituídos de duas regiões conservadas (3'-CS e 5'-CS) separadas por uma região interna variável na qual frequentemente se encontram. A região conservada 3' do integron de classe 1 inclui o gene *qacEΔ1* que confere resistência a desinfetantes, o gene *sulI* que promove resistência a sulfonamidas e uma fase de leitura aberta (ORF5) de função desconhecida [15].

O *qacEΔ1* é considerado uma versão modificada do gene *qacE*, e são genes que conferem resistência ao QAC e corantes tais como o brometo de etídio [4]. Foi demonstrado que o gene *qacEΔ1* pode ter evoluído do gene *qacE* a partir da inserção de um segmento de DNA em sua extremidade 3' entre os códons 94 e 95. O gene *qacEΔ1* está amplamente distribuído por todas bactérias Gram-negativas devido a sua localização na região conservada 3' de integrons de classe 1 [15].

O presente estudo teve como objetivo pesquisar a presença do gene *qacEΔ1* em cepas de *Acinetobacter baumannii* portadoras de integrons de classe 1, mais especificamente na região conservada 3', para justificar a sobrevivência das mesmas a certas concentrações de produtos químicos de limpeza contendo quaternário de amônio.

## **2.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.3.1 Isolados de *Acinetobacter* sp. analisados**

Os isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* utilizados no presente estudo são provenientes de quatro hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil e as de amostras de efluente, de três hospitais também de Porto Alegre e foram isolados e identificados em um estudo anterior [6]. A coleta dos isolados clínicos bem como de amostras de efluente hospitalar foi obtida no mesmo período, sendo os isolados clínicos recolhidos junto aos laboratórios de análises clínicas de cada hospital. Após isolamento e identificação, todos os isolados foram estocados em caldo BHI com 15% de glicerol e mantidos em freezer a -20°C.

### **2.3.2 Seleção dos isolados analisados**

Um total de 29 isolados bacterianos pertencentes a espécie *Acinetobacter baumannii* foram selecionadas para este estudo, dos quais 22 são isolados clínicos e sete

são isolados de amostras de efluente hospitalar. Os isolados foram selecionados por serem resistentes ao composto quaternário de amônio estabelecido através do teste de concentração inibitória mínima (CIM) em caldo realizado em estudo anterior [10]. O quaternário de amônio foi testado nas concentrações de 0,0625% a 0,0001%. Os isolados foram considerados resistentes para o quaternário de amônio quando sua concentração inibitória mínima se mostrou maior que 0,001% [5].

Dentre os isolados, dois foram utilizados como controle positivo (IC146 e IC322) e três como controle negativo (IC233 e IC261) para identificação da presença do gene *qacEΔ1*, de acordo com o valor de concentração inibitória mínima que eles apresentaram.

### **2.3.3 Extração de DNA**

Todos os isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizados neste estudo tiveram seus DNAs extraídos segundo Sambrook *et al.* (1989) com algumas alterações [20]. Foram cultivados em caldo BHI a 37°C por um período de 24h. Após a incubação, um volume de cultura crescida foi aliqotado em microtubos e centrifugada a 13000rpm por 5 minutos. O pellet então foi suspenso em 700µL de TES, homogeneizado e centrifugado novamente a 13000rpm por 5 minutos. Foi adicionado 500µl de TE1 e homogeneizado. Foi adicionado 12,5 µL de Lisozima e incubada a 37°C por uma hora. Após esfriar a temperatura ambiente, as amostras receberam 108µL de SDS 20% a 60°C e 5µL de Proteinase K (20mg/ml) e foram incubadas a 60°C por 15 min. Um volume igual de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1 foi adicionado e centrifugado a 13000rpm por 5 minutos, resultando em um sobrenadante contendo o DNA bacteriano. Ao sobrenadante coletado foi adicionado 8µl NaCl 5M e 500µL de Isopropanol 100% e deixado, no mínimo, dez minutos no gelo. Após este período, a

amostra foi centrifugada a 13000rpm por 15 minutos e o pellet lavado com 100µL de Etanol 70% e centrifugado a 13000rpm por mais 5 minutos. Foi retirado o máximo de líquido da amostra, deixando apenas o pellet a secar a temperatura ambiente para evaporar todo o etanol. Este pellet é então suspenso em 50µL de TE2 e adicionado 10µL de RNase (10mg/ml), resultando em uma amostra com DNA bacteriano, o qual foi submetido à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene *qacEΔ1*

#### **2.3.4 Detecção do gene *qacEΔ1* por reação em cadeia da polimerase**

Para amplificação do gene *qacEΔ1* foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores: 3CSF2 (5'- TCA GGT CAA GTC TGC TT – 3') em combinação com o oligonucleotídeo reverso qac R (5'- GCA GCG ACT TCC ACG ATG – 3') complementar ao segmento da região conservada 3'CS do integron de classe 1, na qual está localizado o gene *qacEΔ1*. Como alguns isolados foram negativos para este par de oligonucleotídeos, foram utilizados também os oligonucleotídeos qac F (5'- GGC TTT TTC TTG TTA TCG CA – 3') e qac R (5'- GCA GCG ACT TCC ACG ATG – 3') complementares ao segmento do gene *qacEΔ1*.

As reações ocorreram para um volume total de 25 µl, contendo DNA bacteriano 1:5 da amostra, 1x de tampão *Taq* de reação de polimerase, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPs, 1 unidade de *Taq polimerase* 5µ/µL, 1µM de oligonucleotídeo. A reação de PCR para amplificação do gene *qacEΔ1* utilizou as seguintes condições para ambas as combinações de oligonucleotídeo: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, e 34 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento do oligonucleotídeo por 1 minuto a

57°C, e extensão por 2 minutos a 72°C e por último uma extensão final por 10 minutos a 72°C. Foi utilizado o termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

Os produtos da técnica de PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo em uma corrida a 80V por cerca de uma hora. Os produtos amplificados de 420pb com o par 3'CSF2 e qac R e de 340pb com o par qac R e qac F, quando presentes, foram visualizadas em luz ultravioleta, indicando a presença do gene *qacEΔ1* na seguinte amostra.

## 2.4 RESULTADOS

A detecção do gene *qacEΔ1* pela técnica de reação em cadeia da polimerase com o primeiro par de oligonucleotídeos 3'CSF2 e qacR, para a região conservada 3' do integron, foi realizado com os 29 isolados de *Acinetobacter baumannii*. Apenas um isolado foi positivo para a presença do gene de resistência ao composto quaternário de amônio, enquanto os demais não amplificaram o fragmento correspondente ao gene, mesmo com CIM maior que 0,001%.

Uma segunda reação em cadeia da polimerase foi realizada com um segundo par de oligonucleotídeos qacF e qacR específicos para a sequência do gene *qacEΔ1*. Verificou-se que para os 22 isolados clínicos testados oito amplificaram, e entre os sete isolados de efluente hospitalar, cinco amplificaram, indicando que estes isolados possuem o gene de resistência ao composto quaternário de amônio. Portanto, foi verificada a presença do gene em um total de 13 isolados (Tabela 1). Estes mesmos isolados foram testados anteriormente quanto a presença de bomba de efluxo como meio de resistência a antimicrobianos e ao composto de quaternário de amônio através da

análise da concentração inibitória mínima (CIM) na presença e ausência do inibidor de bomba de prótons carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP) [10].

Entre os 13 isolados, cinco destes apresentaram o gene *qacEΔ1* e não demonstraram possuir mecanismo de bomba de efluxo, havendo a possibilidade de apenas a presença do gene ser essencial para a resistência nestes isolados e os demais puderam ser relacionados com a presença de bomba de efluxo. Além disso, em outros cinco isolados não foi identificado nem a presença do gene nem da bomba de efluxo, indicando outros possíveis mecanismos de resistência nos mesmos.

## 2.5 DISCUSSÃO

A maioria dos estudos sobre o aumento da resistência de isolados bacterianos se retém a análise de multirresistência a antimicrobianos, porém poucos procuram a possibilidade de surgimento de isolados resistentes a produtos anti-sépticos e desinfetantes utilizados na rotina de limpeza de um ambiente hospitalar, uma vez que já se tem visto uma redução das atividades bactericidas de desinfetantes em isolados clínicos de *Acinetobacter* sp. [9].

Alguns fatores podem favorecer a aquisição de multirresistência: o primeiro é a habilidade de sobreviver no ambiente e em reservatório humano, o segundo é a aquisição de elementos genéticos, como plasmídeos, transposons e integrons, e o terceiro fator é a resistência intrínseca destes microrganismos [21]. Isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* têm demonstrado possuir uma capacidade natural para a aquisição de material genético, o que facilita a aquisição de genes de resistência e virulência [3].

Os 29 isolados de *Acinetobacter baumannii* foram testados para a presença do gene de resistência a quaternário de amônio *qacEΔ1* com dois pares de oligonucleotídeos. No primeiro PCR com o par desenhado para a região conservada 3' do integron apenas um isolado apresentou-se positivo. Isso pode ser explicado pela possibilidade da região 3' estar truncada e desta forma o oligonucleotídeo não consegue se anelar com eficiência, uma vez que foram relatados integrons de classe 1 sem a região 3' conservada, com conseqüente ausência do gene *qacEΔ1* que se encontra neste segmento, embora sejam integrons não clássicos [19].

A presença de bomba de efluxo em *Acinetobacter baumannii* como um meio de resistência a antimicrobiano já foi demonstrado na literatura. Em 2001, o sistema AdeABC de bomba de efluxo, foi identificado em isolados multirresistentes a antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* [14].

Os mecanismos moleculares de *Acinetobacter baumannii* que determinam a susceptibilidade diminuída a desinfetantes ainda permanecem desconhecidos. Além da possibilidade de presença do gene que confere resistência, o papel da extrusão ativa e o envolvimento do sistema de efluxo AdeABC na diminuição da suscetibilidade a biocidas em *Acinetobacter baumannii* também foi demonstrado por um estudo de Rajamohan G. *et al.* (2010). Para isto, Rajamohan testou o efeito do inibidor de bomba de próton carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP), na suscetibilidade dos biocidas em isolados clínicos, verificando que a adição do composto diminuiu a concentração inibitória mínima de vários biocidas, incluindo o composto quaternário de amônio de duas a doze vezes [18].

Da mesma forma, esta redução da CIM a composto de amônio com a presença de CCCP foi observada em alguns isolados clínicos e de efluente hospitalar em estudo

anterior, incluindo os isolados analisados neste estudo [10]. Assim, a redução da concentração inibitória mínima para QAC devido à adição de CCCP nos permitiu determinar a presença de bomba de efluxo nestes isolados.

Com os resultados do presente estudo verificamos a presença do gene *qacEΔ1* responsável pela resistência ao QAC, assim como o uso de bomba de efluxo, que em conjunto geralmente participam na resistência dos isolados de *Acinetobacter* sp. Na Tabela 2 estão apresentados em conjunto os resultados deste trabalho para presença do gene de resistência para QAC, assim como valores de CIM para o quaternário de amônio e a diminuição da concentração inibitória mínima na presença do inibidor CCCP determinada em um estudo anterior, bem como o possível mecanismo de resistência utilizado por estes isolados.

Os cinco isolados que foram considerados resistentes pelo teste de concentração inibitória mínima e foram negativos para a presença de bomba de efluxo e do gene, podem ser portadores de outros tipos de bomba de efluxo que não são inibidas por CCCP, mas podem ser inibidas por outras moléculas inibidoras. Vários inibidores de bombas foram descritos, dentre eles, o fenil-arginina- $\beta$ -naftilamina (PABN), o 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP) e o carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP), este último utilizado nos isolados do presente estudo [16].

Uma menor suscetibilidade de bactérias Gram-negativas a compostos antissépticos quando comparadas a Gram-positivas está relacionada à presença da membrana externa de natureza lipoprotéica que age como uma barreira, limitando a entrada de muitos tipos de agentes antimicrobianos quimicamente não relacionados [13]. Apesar de não se conhecer o mecanismo exato de resistência ao QAC por estas bactérias parece estar relacionada a uma adaptação fisiológica em resposta a mudanças



ambientais, onde se acredita que possa envolver uma regulação metabólica induzida pela presença do biocida, principalmente com alterações na membrana externa das células, uma vez que o modo principal de ação de QAC contra células microbianas é a interação com as membranas celulares que causam perturbações e vazamento do conteúdo celular [13, 8, 11].

Além de expressão de bombas de efluxo, a diminuição da expressão de porinas foi relatada como parte da resistência intrínseca ao QAC demonstradas em bactérias Gram-negativas [7]. Alterações na expressão de porinas, por exemplo, pode ser um mecanismo de resistência ao QAC que resulta na diminuição da permeabilidade dos agentes antimicrobianos através da membrana externa da célula bacteriana, impedindo a difusão de moléculas para o interior da célula [17, 13]. Contudo, também há relatos de uma resistência adquirida, onde mudanças relatadas na susceptibilidade para QAC foram associadas à hiperexpressão de bombas de efluxo e a permeabilidade reduzida ou a estabilização da membrana através de modificações em lipopolissacarídeos (LSP), fosfolipídios, ou proteínas de membrana, como em *Pseudomonas aeruginosa* que se observou um aumento no conteúdo do íon  $Mg^{+}$  na composição do LPS, fortalecendo as ligações entre eles [7].

## **2.6 CONCLUSÃO**

Neste estudo foi possível verificar a presença do gene *qacEAI* de resistência ao QAC em alguns isolados analisados, assim como o da presença de bomba de efluxo inibida por CCCP de forma que estes mecanismos estão envolvidos na resistência aos desinfetantes contendo composto quaternário de amônio. Entretanto, é necessário pesquisar outros possíveis mecanismos de resistência que estes isolados podem

apresentar para inferir com maior clareza quais os mecanismos determinam sua multirresistência. Porém, não podemos descartar a importância destes mecanismos analisados, já que estavam presentes na maioria dos isolados de *Acinetobacter baumannii* estudados.

## 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abbo, A.; Navon-Venezia, S.; Hammer-Muntz, O.; Krichali, T.; Siegman-Igra, Y.; Carmeli, Y. (2005) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Emerging infectious diseases. 11, 22-29.
- [2] Baquero, F.; Martínez, J.L.; Cantón R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology. 19, 260-265.
- [3] Bart, A.E.; Hassan, K.A.; Paulsen, T.; Brown, M. H. (2011) Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. BMC Genomics. 12, 126.
- [4] Chuanchuen, R.; Khemtong, S.; Pandungtod, P. (2007) Occurrence of *qacE/qacEA1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* from poultry and swine. Southeast Asian J. Trop Med Public Health. 38 (5), 855-862.
- [5] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 15th Informational Supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005).
- [6] Ferreira, A.E.; Marchetti, D.P.; Cunha, G.R.; Oliveira, L.M.; Fuentefria, D.B.; Bello, A.G.D.; Barth, A.L.; Corção, G. (2011) Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 44 (6), 725-730.
- [7] Hegstad, K.; Langsrud, S.; Lunestad, B.T.; Scheie, A.A.; Sunde, M.; Yazdankhah, S.P. (2010) Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? Microb Drug Resist. 16 (2), 91-104.
- [8] Ioannou, C.J.; Hanlon, G.W.; Denyer, S.P. (2007) Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 51, 296-306.
- [9] Kawamura-Sato, K.; Wachino, J.; Kondo, T.; Ito, H.; Arakawa, Y. (2008) Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 61, 568-576.
- [10] Marchetti, D.P.; (2010) Presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* spp, Rio Grande do Sul, Brasil, 35p. (Trabalho de Conclusão de curso de Graduação em Farmácia em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. UFRGS)
- [11] McDonnell, G.; Russell, A.D.; (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clin Microbiol Rev. 12, 147-79.

- [12] Misbah, S.; Hassan, H.; Yusof, M.Y.; Hanifah, Y.A.; AbuBakar, S. (2005) Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. Singapore Med J. 46, 461-464.
- [13] Miyagi, F.; Timenetsky, J.; Alterthum, F.; (2000) Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar. Rev. Saúde Pública. 34 (5), 444-448.
- [14] Nemeč, A.; Maixnerová, M.; Reijden, T.J.K.; Broek, P.J.; Dijkshoorn, L. (2007) Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 60, 483–489.
- [15] Paulsen, I.T.; Littlejohn, T.G.; Radstrom, P.; Sundstrom, L.; Skold, O.; Swedberg, G.; Skurray, R.A. (1993) The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. Antimicrob Agents Chemother. 37, 761-768.
- [16] Pannek, S.; Higgins, P.G.; Steinke, P.; Jonas, D.; Akova, M.; Bobneet, J.A.; Scifert, H.; Kens, W.V. (2006) Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 57, 970–974.
- [17] Perez, F.; Hujer, M.A.; Hujer, K.M.; Decker, B.K.; Rather, P.N.; Bonomo, R.A. (2007) Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 51 (10), 3471-3484.
- [18] Rajamohan, G.; Srinivasan, V.B.; Gebreyes, W.A.; (2010) Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 65, 228-232.
- [19] Sáenz, Y.; Vinué, L.; Ruiz, E.; Somalo, S.; Martinez, S.; Rojo-Bezares, B.; Zarazaga, M.; Torres, C. (2010) Class 1 integrons lacking *qacEΔ1* and *sull* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. Veterinary Microbiology. 4772-4776.
- [20] Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.; (1989) Molecular cloning – a laboratory manual, 2<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [21] Vila, J.; Martí, S.; Sánchez-Céspedes J. (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 59, 1210-1215.

**2.8 TABELA 1:** Resultado da verificação da presença do gene *qacEΔ1* dos isolados de *Acinetobacter baumannii*.

	Isolados	Presença do gene <i>qacEΔ1</i>
	Isolados clínicos	IC 146
IC 322		+
IC 233		-
IC 297		+
IC 261		-
IC 304		-
IC 273		+
IC 264		+
IC 194		+
IC 188		-
IC 123		-
IC 317		-
IC 280		-
IC 266		-
IC 298		-
IC 147		-
IC 205		-
IC 122		+
IC 254		-
IC 104		+
IC 103		-
IC 283		-
Isolados de efluente hospitalar	A81	+
	A26	-
	A16	-
	G9	+
	O3	+
	O6	+
	O18	+

**2.9 TABELA 2:** Correlação entre os resultados referentes a presença do gene *qacEΔ1*, a concentração inibitória mínima (CIM) para o composto quaternário de amônio e CIM com adição do inibidor da bomba de próton CCCP.

	Isolados	Presença do gene <i>qacEΔ1</i>	QAC		Mecanismo
			CIM (%)*	CIM+CCCP (%)*	
Isolados clínicos	IC 146	+	0,0156	0,0156	Gene
	IC 322	+	0,0156	0,0156	Gene
	IC 233	-	0,0001	Sensível	Sensível
	IC 297	+	0,0001	Sensível	Sensível
	IC 261	-	0,0001	Sensível	Sensível
	IC 304	-	0,0039	0,0039	Outro mecanismo
	IC 273	+	0,0039	<0,001	Gene + Bomba
	IC 264	+	0,0078	0,0039	Gene + Bomba
	IC 194	+	0,0078	0,0078	Gene
	IC 188	-	0,0039	0,0009	Bomba
	IC 123	-	0,0156	<0,0001	Bomba
	IC 317	-	0,0039	0,0039	Outro mecanismo
	IC 280	-	0,0078	0,0039	Bomba
	IC 266	-	0,0039	0,0039	Outro mecanismo
	IC 298	-	0,0019	<0,0001	Bomba
	IC 147	-	0,0039	0,0039	Outro mecanismo
	IC 205	-	0,0019	<0,0001	Bomba
	IC 122	+	0,0019	<0,0001	Gene + Bomba
	IC 254	-	0,0078	0,0039	Bomba
	IC 104	+	0,0078	0,0039	Gene + Bomba
	IC 103	-	0,0078	0,0039	Bomba
	IC 283	-	0,0156	0,0156	Outro mecanismo
	Isolados de efluente hospitalar	A81	+	0,0078	0,0078
A26		-	0,0039	<0,0001	Bomba
A16		-	0,0039	<0,0001	Bomba
G9		+	0,0019	<0,0001	Gene + Bomba
O3		+	0,0078	0,0078	Gene
O6		+	0,0019	<0,0001	Gene + Bomba
O18		+	0,0019	<0,0001	Gene + Bomba

\*Dados obtidos de estudo anterior (Marchetti *et. al*, 2010).

### 3. CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo foi possível notar que os isolados de *Acinetobacter baumannii* podem apresentar diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, ilustrando que a interação entre estes diferentes mecanismos resultam em uma multirresistência. Porém até hoje estes padrões ainda não foram descritos em relação à resistência a compostos de quaternário de amônio e a outros desinfetantes. Por este motivo, a busca de um mecanismo de resistência ao QAC é interessante e a avaliação da presença do gene *qacEΔ1* determina um caminho para melhor compreensão desta resistência.

Através dos resultados obtidos neste estudo foi possível verificar a presença do gene de resistência *qacEΔ1* ao QAC em alguns dos isolados de *Acinetobacter baumannii* analisados, demonstrando que a presença do gene pode indicar resistência, corroborando com a idéia de resistência adquirida geneticamente. No entanto, a maioria dos isolados indicou uma resistência por meio da união do mecanismo de bomba de efluxo e presença do gene quando correlacionados este estudo com uma pesquisa anterior sobre a presença de bomba de efluxo em isolado de *Acinetobacter baumannii*. Entretanto, mais estudos devem ser desenvolvidos com objetivo de elucidar os mecanismos de resistência a compostos utilizados na limpeza de ambientes hospitalares como o quaternário de amônio de forma a correlacionar a presença de um gene *qacEΔ1* a outros meios de resistência e relatar com melhor clareza a função genética envolvida neste perfil multirresistente de isolados de *Acinetobacter baumannii*.

#### 4. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

Gallego, L.; Towner, K.J. (2001) Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. *J. Med. Microbiol.* 50, 71-77.

Gaze, W.H.; Abdousslam, N.; Hawkey, P.M., Wellington, M.H. (2005) Incidence of Class 1 Integrons in a Quaternary Compound-Polluted Environment Quaternary Ammonium. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(5), 1802-1807.

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

Kawamura-Sato, K.; Wachino, J.; Kondo, T.; Ito, H.; Arakawa, Y. (2010) Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 65, 1975-1983.

Kücken, D.; Feucht, H.; Kaulfers, P. (2000) Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* 183, 95-98.

Magnet, S.; Courvalin, P.; Lambert, T. (2001) Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 3375-3380.

Mendes, R.E.; Castanheira, M.; Pignatari, A.C.C.; Gales, A.C. (2006) Metallo- $\beta$ -lactamases. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 42 (2), 103-111.

Moura, A.; Henriques, I.; Ribeiro, R.; Correia, A. (2007) Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 60, 1243-1250.

Partridge, S. R.; Tsafnat, G.; Coiera, E.; Iridell, J.R. (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 757-784.

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



## **5. ANEXOS**

### **NORMAS PARA PUBLICAÇÃO**

#### **Submission of a manuscript**

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of Microbiology is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

#### **Publication of a manuscript**

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a pre requisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

### **ETHICS:**

When the study, described in the manuscript, is related to experiments carried out with human beings and/or animals, author(s) must inform, within the text, if the research project has been approved by the Research Ethics Committee of their institution, according to the Declaration of Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>).

Experimental studies involving animals should follow the guidelines established by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996), and the *Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*(COBEA) (Ethical Principles for Animal Experimentation of the Brazilian College of Animal Experimentation).

### **Preparation of a manuscript**

The manuscript should be submitted as **one single WORD file**. This single file should include: the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research papers**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (200 to 250 words)
- Three to five key-words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements (optional)
- References

For **short communications**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 50 words)
- Three to five key-words
- Text not divided in topics
- Acknowledgements (optional)
- References

For **mini-reviews**, the **WORD** file should contain:

- Title

- Authors and Affiliations
- Abstract (200 to 250 words)
- Three to five key-words
- Text
- Acknowledgements (optional)
- References

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The lines in each page of the manuscript should be numbered too. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

*Research papers* and *mini-reviews* consist of 20 pages, including references, tables and figures.

*Short Communications* should be restricted to 10 pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission (*Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*) and the units are to be used according to SI (*International Systems of Units*).

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. When authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples:

Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that...Do not use capital letters.

## **SUGGESTED REVIEWERS**

Authors may submit suggestions of reviewers to evaluate the manuscripts. The following information must be provided: reviewer name, e.mail address, and the home institution.

## **USE OF PLANT EXTRACTS IN MICROBIOLOGICAL EXPERIMENTS**

Articles that present studies with plant extracts, or other complex substances, will be accepted only after identification of compounds.

Authors may need, or wish, to use professional language editing services to improve papers in English and, therefore, overall quality. This assistance is suggested either before an article is submitted for peer review or before it is accepted for publication. Non-native English speakers and international authors who would like assistance with their writing, may likely consider the following options:

- American Journal Experts, English Editing: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: [joroberts@uol.com.br](mailto:joroberts@uol.com.br)
- ATO Traduções: [www.atotraining.com.br](http://www.atotraining.com.br)

## **ORGANIZATION**

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting

journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature.

However, the introduction should not be an extensive review of the

literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state,

country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

**a. Journal article**

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S.; Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and

coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

**b. Paper or chapter in a book**

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens.* Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

**c. Book**

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology - an introduction.* ASM Press, Washington, D.C.

**d. Patent**

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

**e. Thesis and Dissertations**

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental.* São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).



#### **f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)**

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

#### **g. Publication in the web**

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

#### **h. Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection.

Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

**TABLES:** Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution.  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FIGURES:** Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution.  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**PHOTOGRAPHS:** Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution.  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)).