

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Acinetobacter* ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DOS GENES 16S rRNA e *rpoB*

SILVA, Juliano Dellazen¹, CORÇÃO, Gertrudes¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; juliano_p59@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* está amplamente distribuído no solo e na água e tem emergido como importante patógeno nosocomial. Até o momento, foram descritas 27 espécies de *Acinetobacter* reconhecidas e validadas, 6 espécies propostas e 28 classificadas como genospecies. Porém faltam métodos precisos que identifiquem isolados de *Acinetobacter* a nível de espécie. Vários métodos moleculares têm demonstrado serem adequados para este propósito. Entretanto, o sequenciamento do gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossomal (rRNA), atualmente utilizado para a identificação de diversas espécies bacterianas, mostra falhas na distinção de espécies estreitamente relacionadas de *Acinetobacter*, devido a baixa natureza polimórfica do gene 16S rRNA nestas cepas. Estudos demonstram que a análise do gene *rpoB*, que codifica a porção β da RNA polimerase, é um método confiável e rápido para a identificação de espécies de *Acinetobacter*.

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo identificar 16 isolados de origem clínica e 3 de efluente hospitalar de *Acinetobacter* sp., através da amplificação e sequenciamento de um fragmento do gene 16S rRNA e do gene *rpoB* e verificar qual é o mais discriminativo.

METODOLOGIA

•A extração de DNA dos isolados foi realizada por fervura conforme descrito por Misbah et al. (2005), com modificações.

•Para a identificação das espécies de *Acinetobacter* foi empregada a PCR de um fragmento dos genes 16S rRNA e *rpoB* (FIGURA 1).

•Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e os amplicons foram purificados utilizando o kit de purificação (Innsorb Fragment Clean Up 250) e submetidos ao sequenciamento automatizado (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer).

•A pesquisa da homologia da sequência nucleotídica foi realizada utilizando a ferramenta BLAST, na qual as sequências foram alinhadas e comparadas com sequências já publicadas de diferentes espécies de *Acinetobacter*.

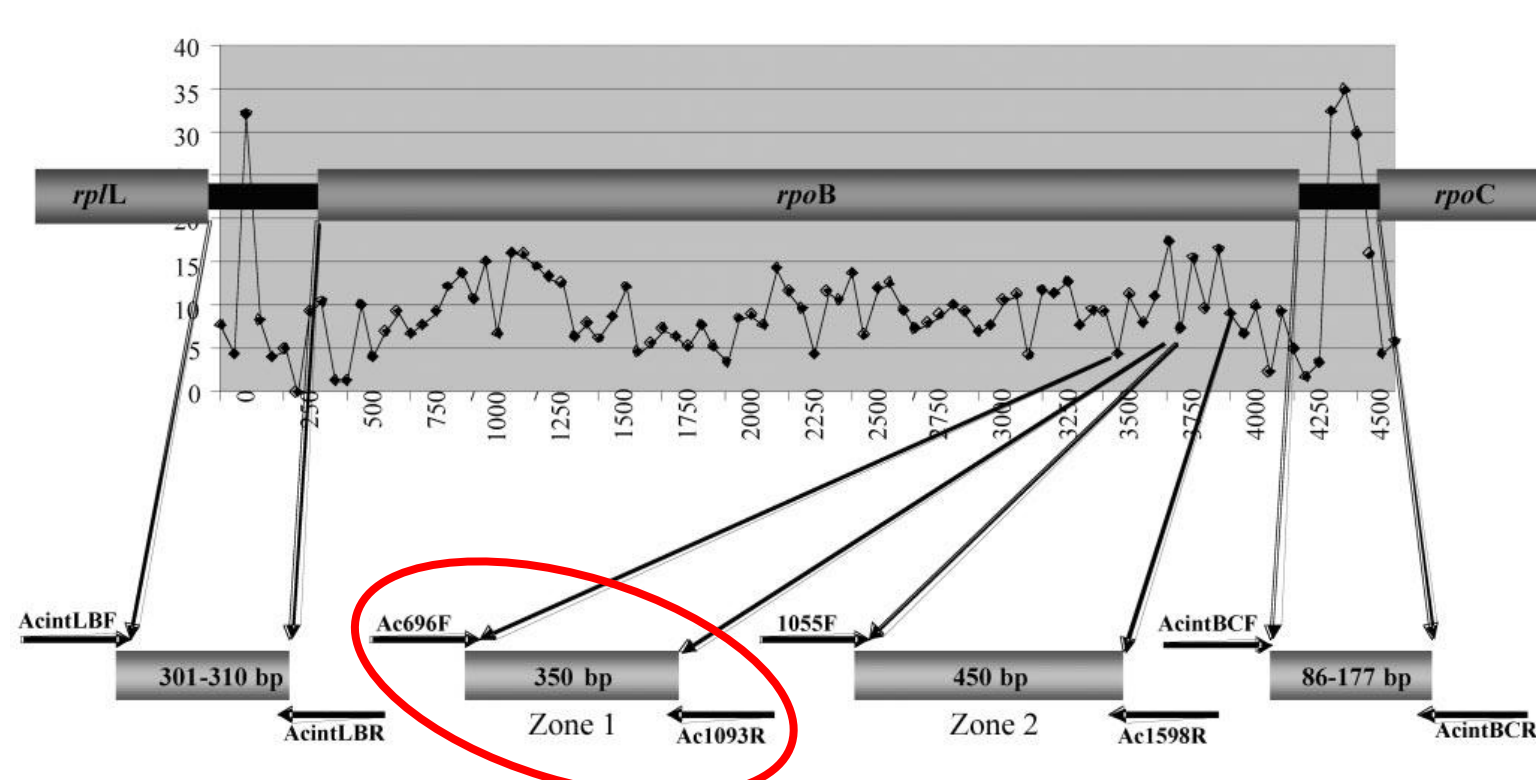


FIG. 1: Estrutura esquemática do gene *rpoB* e sequências espaçadoras de *Acinetobacter* sp. Eixo X indica a posição dos nucleotídeos e eixo Y indica a porcentagem de variabilidade por 50 nucleotídeos (LA SCOLA, et al., 2006). Círculo vermelho indica o fragmento amplificado neste trabalho e os primers utilizados.

LA SCOLA, B.; GUNDI, V. A. K. B.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 827-832, 2006.

RESULTADOS

Nos resultados obtidos através da amplificação do gene 16S rRNA, 15 isolados apresentaram 100% de similaridade com a espécie *A. baumannii*; 1 isolado (IC 269) apresentou similaridade de 100% com as espécies *A. baumannii*, *A. soli*, *A. junii*, *A. venetianus* e *A. ursingii*; 1 isolado (IC 70) teve similaridade máxima de 96% com as espécies *A. baumannii*, *A. soli*, *A. beijerinckii*, *A. radioresistens*, *A. lwoffii* e *A. junii*. Observou-se que a segunda espécie mais próxima apresentou alto grau de similaridade (98%) em 15 isolados, próximo do ponto de corte da faixa de similaridade que é de 98,7% a 99% para que a espécie seja determinada. Dos 13 isolados nos quais o gene *rpoB* foi amplificado, 12 apresentaram 100% de similaridade com a espécie *A. baumannii* inclusive os dois isolados (IC 269 e IC 70) que não tiveram sua espécie definida pela amplificação do gene 16S rRNA e 1 isolado teve similaridade de 99% com a espécie *A. baumannii*. Já para o gene *rpoB*, a segunda espécie mais próxima apresentou similaridade de 97 a 96%, não sendo considerada uma vez que se encontra fora do ponto de corte (TABELA 1).

TABELA 1: Resultado da análise das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

ISOLADOS	Identificação pelo gene 16S rRNA		Identificação pelo gene <i>rpoB</i>	
	Primeira espécie mais próxima (% similaridade dos nucleotídeos)	Segunda espécie mais próxima (% similaridade dos nucleotídeos)	Primeira espécie mais próxima (% similaridade dos nucleotídeos)	Segunda espécie mais próxima (% similaridade dos nucleotídeos)
IC 23	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 32	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus/schindleri</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 53	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus/junii/schindleri/radioresistens</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (99%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 70	<i>A. baumannii/soli/beijerinckii/beijerinckii/radioresistens/lwoffii/junii</i> (96%)	<i>A. venetianus</i> (95%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 133	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 147	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
IC 186	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus/junii</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 188	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii/calcoaceticus</i> (96%)
IC 220	<i>A. baumannii</i> (100%)	*	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 269	<i>A. baumannii/soli/junii/venetianus/ursingii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus</i> (97%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 283	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus</i> (98%)	**	**
IC 289	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus/junii</i> (98%)	**	**
IC 294	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus/junii/schindleri</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/pittii</i> (97%)
IC 299	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus/junii</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
IC 301	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
IC 302	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus/junii/schindleri</i> (98%)		
G47	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/calcoaceticus/junii/schindleri</i> (98%)	**	**
O17	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus</i> (98%)	**	**
O6	**	**	**	**

* Isolado não apresentou segunda espécie similar.

** Isolados cujo resultado do sequenciamento é aguardado.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que pela análise da sequência do gene 16S rRNA não pôde-se distinguir a espécie de *Acinetobacter* de 2 isolados (IC 269 e IC 70). Tais cepas foram identificadas como pertencentes a espécie *A. baumannii* pela análise da sequência do gene *rpoB*. Todos isolados submetidos até o momento a amplificação do gene *rpoB*, tiveram sua espécie corretamente definida, com grau de similaridade entre 99 a 100% com a primeira espécie, enquanto que a segunda espécie mais próxima apresentou similaridade abaixo do ponto de corte, não sendo considerada. Desta forma conclui-se que o gene *rpoB* apresentou maior poder discriminatório para as espécies de *Acinetobacter* estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FERREIRA, A. E. Caracterização molecular e detecção de genes de resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas e de efluente hospitalar. Tese de doutorado apresentada no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.
- LA SCOLA, B.; GUNDI, V. A. K. B.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 827-832, 2006.
- MISBAH, S.; HASSAN, H.; YUSOF, M. Y.; HANIFAH, Y. A.; ABUBAKAR, S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Medical Journal*, v. 46, n. 9, p. 461-464, 2005.
- PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v.21, n. 3, p. 538-582, 2008.
- STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 1043-1047, 2002.