

## ANÁLISE DE *PSEUDOMONAS* SPP. E A CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES NO LABORATÓRIO REGIONAL DE DIAGNÓSTICO

ESTEFANI RINALDI<sup>1</sup>; SILVIA LADEIRA<sup>2</sup>; LUIZ FILIPE SCHUCH<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – estefanirinaldi@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – s.ladeira@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – lfdschuch@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Pseudomonas* é um gênero de bactérias constituído por um grande número de espécies, as quais encontram-se amplamente distribuídas na natureza, apenas algumas espécies são patogênicas ao homem e animais como: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida* (BUDZIKIEWICZ, 2004). *Pseudomonas* são bastonetes gram-negativos médios, não esporulados, móveis, são bactérias oportunistas, muito presente em infecções mistas (ROBINSON *et al.*, 2019) e de acordo com o reportado por FALCONE, M., GALFO, V., TISEO, G. (2024) diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* expressam níveis diferentes de resistência a antibióticos carbapenêmicos, devido a produção de  $\beta$ -lactamases, tendo grande importância sua identificação em infecções hospitalares.

Também são classificadas em dois grupos, *Pseudomonas* fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) e as não fluorescentes, além disso algumas cepas produzem pigmentos como a piocianina, piorrubina, piomelanina e pioverdina, sendo a última fluorescente sob luz ultravioleta (UV). As características fenotípicas dessas culturas facilitam a identificação das cepas, porém diferentes cepas podem produzir diferentes quantidades de pigmento (BUDZIKIEWICZ, 2004), e as não produtoras de pigmentos apresentam maior desafio para classificação de espécie por apresentar características fenotípicas e bioquímicas similares (QUINN *et al.*, 1994). Atualmente é possível associar as características fenotípicas com as genotípicas, com o sequenciamento genético, havendo evolução taxonômica das espécies de *Pseudomonas* (LALUCAT *et al.* 2022).

O objetivo do estudo foi avaliar a eficiência dos métodos microbiológicos de caracterização de gênero e espécie de *Pseudomonas* no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

### 2. METODOLOGIA

Foi realizado um levantamento de 41 casos confirmados de *Pseudomonas* sp. no período de 2019 a 2024. As bactérias foram isoladas a partir de materiais, enviados ao LRD, de cães (25), gatos (8), ruminantes (4), animais silvestres (3) e equinos (1) que apresentavam queixas de lesões dermatológicas (20), otites (8), doenças de trato respiratório (6), cistite (3), úlcera de córnea (2) e diarreia (2). No ano de 2024 foi realizado o perfil bioquímico das culturas para caracterização da *Pseudomonas* sp. de 5 isolados. As bactérias foram semeadas em ágar sangue ovino 5%, ágar MacConkey e repicadas posteriormente em ágar Mueller-Hinton para melhor observação da coloração da colônia e produção de pigmentos, essas culturas foram incubadas a 35 °C de 24 a 48 horas.

Para caracterização dos isolados realizou-se a coloração de Gram das colônias isoladas, que foram então observadas em microscópio com aumento de

1000x para observação dos isolados bacterianos. Além disso, foram realizadas as provas de catalase, oxidase, motilidade, produção de gelatinase, nitrato redutase e urease bem como o perfil fermentativo utilizando meio de cultura base com adição do carboidrato testado (glicose, sacarose, lactose, maltose, manitol e frutose) em uma concentração de 10% e acrescido de um indicador de pH (vermelho de fenol). Os cultivos foram observados sob luz ultravioleta (UV) para determinar a presença de fluorescência das colônias. O método para verificar a presença de piocianina consiste no cultivo da bactéria em caldo nutriente e incubação por 24 horas a 35 °C, posteriormente foi adicionado 1mL de clorofórmio nessa cultura, após algumas horas é possível observar a mudança de coloração da solução no fundo do tubo para azul esverdeado, diferentes cepas expressam diferentes níveis de produção de piocianina (OLIVEIRA; ADIL. 2018).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As colônias cresceram em todos os meios, apresentavam o cheiro característico adocicado, mucóides brilhantes com bordas irregulares e com uma coloração variável de cinza a amarela-esverdeada. No meio de ágar sangue cresceram colônias  $\beta$ -hemolíticas, no meio de MacConkey foi observado colônias lactose negativas com alguns isolados já indicando pigmentação verde, no meio de Mueller-Hinton foi mais bem demonstrado a coloração das colônias com algumas evidenciando uma coloração amarela ou esverdeada. Ao microscópio com aumento de 1000x foram observadas bactérias em forma de bacilos médios, gram negativas, catalase positiva e oxidase positiva. Além disso as provas de gelatinase foram positivas em todos os isolados e urease negativa.

Tabela 1 - Capacidade do isolado de fermentação do açúcar, (+) = houve fermentação, (-) = não houve fermentação.

Placas	Glicose	Lactose	Maltose	Sacarose	Frutose	Manitol
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

O perfil de açúcares apresentou isolados pouco fermentativos, o perfil dos isolados 1, 2, 4, e 5 foi compatível com duas espécies a *P. alcaligenes* ou *pseudoalcaligenes* (OLIVEIRA; ADIL. 2018), porém o restante dos isolados não foi possível caracterização a nível de espécie. O teste de descarboxilase foi utilizado a arginina, lisina, e ornitina, obtendo resultados positivos em todos os isolados.

Na caracterização fenotípica foi observado a coloração da colônia, fluorescência sob luz ultravioleta (UV) e presença de pigmentos produzidos.

Tabela 2 - Coloração dos isolados em placas de MacConkey e Mueller-Hinton, fluorescência da colônia em câmara de luz Ultravioleta (UV) e presença de pigmentos visíveis em placa e pelo método de extração por clorofórmio.

Amostras	Cor da colônia	Fluorescente em UV	Pigmento
1	Amarela-esverdeada	Sem fluorescência	Verde (+)
2	Amarela-esverdeada	Fluorescente (+)	Amarelo (+)
3	Cinza-verde	Sem fluorescência	Verde (++)
4	Cinza-rosada	Sem fluorescência	Sem pigmento
5	Cinza-amarela	Fluorescente (++)	Amarelo (++)

Alguns isolados como o 3 apresentaram pigmentação verde evidente, em outras colônias a produção de pigmentos era discreta, porém ainda observável, o isolado 2 apresentou leve fluorescência em luz ultravioleta, enquanto o isolado 5 apresentou fluorescência intensa, evidenciando a produção de pigmento não visível a luz natural, esse pigmento chamado pioverdina é característico do grupo das *Pseudomonas* fluorescentes. O método de extração de pigmentos foi realizado nas colônias, o pigmento se concentra junto ao clorofórmio no fundo do tubo de ensaio formando uma coloração verde azulada sugerindo a presença de piocianinas, o terceiro isolado teve a maior produção de pigmentos azuis característicos, outros isolados produziram algum tipo de pigmentação em menor intensidade. É necessário associar o isolamento bacteriano com a biologia molecular com o sequenciamento genômico ou a caracterização da espécie patogênica de interesse como a *Pseudomonas aeruginosa*, através do método de qPCR. Além disso com auxílio das técnicas moleculares a taxonomia de muitas espécies de *Pseudomonas* foram reclassificadas, combinando as características fenotípicas e genotípicas, a caracterização por métodos moleculares pode ser um aliado no diagnóstico desses patógenos.

#### 4. CONCLUSÕES

Podemos concluir com o presente trabalho que a caracterização bacteriológica das espécies de *Pseudomonas*, apresenta um desafio principalmente das espécies não produtoras de pigmentos, que apresentam resultados idênticos na caracterização de perfil fermentativo e outros testes realizados. A combinação das características fenotípicas e genotípicas se mostra essencial para uma classificação taxonômica mais precisa e eficiente, demonstrando a importância de integrar abordagens moleculares na rotina diagnóstica. Os isolados aqui obtidos serão usados em análises moleculares posteriores.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUDZIKIEWICZ, H. Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (Fluorescent and Non-Fluorescent Pseudomonas spp.). In: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Viena: Springer-Verlag/Wien, 2004. p. 83-237.
- FALCONE, M.; GALFO, V.; TISEO, G. Not all carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains are alike: tailoring antibiotic therapy based on resistance mechanisms. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Itália, v. 37, n. 0, 2024.

LALUCAT, J.; GOMILA, M.; MULET, M.; ZARUMA, A.; GARCÍA-VALDÉS, E. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 1, 2022. p. 126289. ISSN 0723-2020.

MICHEL-BRIAND, Y., BAYSSE, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, **Biochimie**, França, v. 84, p. 499-510, 2002, ISSN 0300-9084.

OLIVEIRA, S.; ADIL K. V. **Guia Bacteriológico Prático: Identificação, patogenicidade e imunidade**. Canoas: Ed. ULBRA, 272p. 2018.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994.

ROBINSON, V. H.; PATERSON, S.; BENNETT, C.; STEEN, S. I. Biofilm production of *Pseudomonas* spp. isolates from canine otitis in three different enrichment broths. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 218–e67, 2019.