



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA UFG

ADAILTON PEREIRA DOS SANTOS

PERFIL DE RASTREAMENTO DE RESISTÊNCIA DAS
***Pseudomonas aeruginosa* E ACOMPANHAMENTO DA ROTINA**
EDUCACIONAL

Goiânia
2018

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Adailton Pereira dos Santos

Título do trabalho: PERFIL DE RASTREAMENTO DE RESISTÊNCIA DAS *Pseudomonas aeruginosa* E ACOMPANHAMENTO DA ROTINA EDUCACIONAL

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Adailton Pereira dos Santos
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Leiliana Carla Carneiro
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 12 / 07 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

ADAILTON PEREIRA DOS SANTOS

**PERFIL DE RASTREAMENTO DE RESISTÊNCIA DAS
Pseudomonas aeruginosa E ACOMPANHAMENTO DA
ROTINA EDUCACIONAL**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal
de Goiás.

Orientadora: Prof^a Dra. Lilian
Carla Carneiro
Co-orientadora: Prof^a Dra.
Carla Afonso da Silva
Bitencourt Braga

Goiânia 2018

Santos, Adailton Pereira dos
PERFIL DE RASTREAMENTO DE RESISTÊNCIA DAS
Pseudomonas aeruginosa E ACOMPANHAMENTO DA ROTINA
EDUCACIONAL [manuscrito] / Adailton Pereira dos Santos. - 2018.
xiv, 114 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro; co-orientadora Dra.
Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Antibiograma. 2. Resistência Antimicrobiana. 3. β -lactâmicos. 4.
Genes. 5. Diagnóstico Molecular. I. Carneiro, Lilian Carla, orient. II.
Título.

CDU 561.23

Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado realizada por **Adailton Pereira dos Santos**. Aos vinte e nove dias do mês de junho de 2018, às 14:30 horas, reuniu-se na Sala 402-IPTSP/UFG, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada: "**Perfil de rastreamento de resistência das pseudomonas aeruginosas e acompanhamento da rotina educacional**", como parte de requisitos necessários à obtenção do título de Mestre, área de concentração **Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas**.

A Presidente da Comissão julgadora, **Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro**, iniciando os trabalhos concedeu à palavra ao candidato, para exposição em até 50 minutos do seu trabalho. A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o candidato durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato aprovado ou reprovado.

Banca Examinadora

Aprovado(a)/Reprovado(a)

Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro - Presidente
Profa. Dra. Mônica Santiago Barbosa - Membro
Prof. Dr. André Corrêa Amaral - Membro
Profa. Dra. Mônica de Oliveira Santos - Suplente
Prof. Dr. Aroldo Moraes Vieira Filho - Suplente

Aprovado
Aprovado
Aprovado

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o candidato **Adailton Pereira dos Santos** **Habilitado** () Não habilitado. Nada mais havendo a tratar, eu, **Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura:

Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro - Presidente
Profa. Dra. Mônica Santiago Barbosa - Membro
Prof. Dr. André Corrêa Amaral - Membro
Profa. Dra. Mônica de Oliveira Santos - Suplente
Prof. Dr. Aroldo Moraes Vieira Filho - Suplente

Carneiro
Mônica
Amorim

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Sem modificações

Adailton Pereira dos Santos
Adailton Pereira dos Santos

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Acadêmico: Adailton Pereira dos Santos

Orientadora: Professora Dra. Lilian Carla Carneiro

Membros Titulares:

- 1. Professor Dr. André Corrêa Amaral - IPTSP/UFG**
- 2. Professora Dra. Mônica Santiago Barbosa - IPTSP/UFG**
- 3. Professora Dra. Lilian Carla Carneiro - IPTSP/UFG**

Membros Suplentes:

- 1. Professora Dra. Mônica de Oliveira Santos- Unifan**
- 2. Professor Dr. Aroldo Moraes Vieira Filho – Unifan**

Data: 29/06/2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela bondade e proteção infinita em tudo que faço na minha vida;

A Alessandra minha esposa, pelo amor, pelo companheirismo e por tudo o que representa para mim;

A Sara, minha filha, pelo amor, carinho e alegria;

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e educação. A minha irmã, por todo o apoio e incentivo; aos meus sobrinhos, por todo o amor e alegria e a toda a minha família.

A Profa. Lílian Carla Carneiro, pelos ensinamentos, orientação, dedicação e incentivo a minha carreira científica;

A Profa. Carla Afonso, pela ajuda prestada, orientação e ensinamentos transmitidos;

A profa. Lara Leão, pela disponibilidade e colaboração em ceder amostras para experimento;

A Célia Malveste, pela amizade, dedicação e por ceder amostras para este estudo;

A Caroline Barros e Juliana Almeida pela amizade e por cederem amostras para execução desse estudo;

A Andressa Liberal, pelo companheirismo, disponibilidade e ensinamentos transmitidos;

A todos os amigos do LAFEBIM, pelos ensinamentos, disponibilidade e alegria;

A todos que de forma direta e indireta me incentivou a fazer esta pós-graduação.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	x
Lista de figuras	xi
Lista de quadros	xii
Símbolos, siglas e abreviaturas	xiii
Resumo	xvi
Abstract	xvii
Introdução	18
1. Referencial teórico	21
1.1. Infecções bacterianas	21
1.2. IRAS causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.3. Mecanismos de Resistência	23
1.3.1. β -lactamases	23
1.3.2. Produção de Metalo β -lactamase	25
1.3.3. Bomba de efluxo	27
1.3.4. Perda de Porina	30
1.3.5. Produção de Metilase	31
1.4. Resistência intrínseca e adquirida	32
1.5. Resistências de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
1.6. Definições para o grau de resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
1.7. Classificação dos antimicrobianos	37
1.8. Classificação dos β -lactâmicos	38
1.8.1. Penicilinas	39
1.8.2. Cefalosporinas	40
1.8.3. Carbapenêmicos	40
1.8.4. Monobactâmicos	41
1.8.5. Inibidores das β -lactamases	41
1.9. Mecanismo de ação dos β -lactâmicos	43
2. Genes de Resistências à β -lactâmicos	46
2.1. Gene <i>blaOXA</i>	46
2.2. Gene <i>blaIMP</i>	48
2.3. Gene <i>blaSME</i>	48
2.4. Gene <i>blaCMY</i>	49
2.5. Gene <i>blaDHA</i>	49
2.6. Gene <i>blaTEM</i>	50
2.7. Gene <i>blaKPC</i>	50
2.8. Gene <i>blaCTX-M</i>	51
2.9. Gene <i>blaSHV</i>	51
2.10. Gene <i>blaNDM</i>	52
2.11. Gene <i>blaGIM</i>	52
2.12. Gene <i>blaVIM</i>	53
2.13. Gene <i>blaSIM</i>	54
2.14. Gene <i>blaSPM</i>	54
3. Diagnóstico fenotípico e molecular	54

4. Métodos de susceptibilidade aos antimicrobianos	56
5. Métodos Moleculares	57
5.1. Reação em cadeia da Polimerase – PCR	57
5.2. PCR em tempo real	58
5.3. Sistema Sybr Green	59
6. Objetivos	61
6.1. Objetivo Geral	61
6.2. Objetivos específicos	60
7. Métodos	62
7.1. Metodologia	62
7.2. Amostras Clínicas	62
7.3. Ativação bacteriana	63
7.4. Teste de Antibiograma	63
7.5. Teste fenotípico para detecção de ESBLs	64
7.6. Teste fenotípico para detecção de Carbapenemases	64
7.7. Teste fenotípico para detecção de Ampicilinas	65
7.8. Teste fenotípico para detecção de Metallo- β -lactamases	66
7.9. Extração de DNA plasmídial	67
7.10. Quantificação de DNA	68
7.11. PCR em Tempo Real	68
7.12. Sensibilidade e reprodutibilidade analítica	71
7.13. Especificidade do diagnóstico	71
7.14. Regressão linear	72
8. Resultados e discussão	73
9. Conclusões	88
10. Referências bibliográficas	90
11. Apêndices	110
12. Anexos	111

TABELAS

Tabela 1.	66
Antimicrobianos utilizados para teste de susceptibilidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> conforme o CLSI(2017).	
Tabela 2.	76
Dados relativos das resistências às ESBLs, testadas neste estudo para <i>P. aeruginosa</i> .	
Tabela 3.	78
Levantamento bibliográfico referente às resistências fenotípicas das betalactamases frente aos genes de resistência correspondente.	
Tabela 4.	81
Correlação entre as resistências fenotípica e genotípica dos 99 isolados de <i>P. aeruginosa</i> .	
Apêndices	
Tabela 5.	110
Resultados de antibiograma das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

FIGURAS

Figura 1. Principais mecanismos de resistência aos antibacterianos.	24
Figura 2. Mecanismo de hidrólise de antimicrobiano β -lactâmico por ESBL	24
Figura 3. Método de dupla difusão do disco	27
Figura 4. Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de <i>P. aeruginosa</i>	28
Figura 5. Famílias de bombas de efluxo	30
Figura 6. Mecanismo de transdução mediado por bacteriófagos	33
Figura 7. Mecanismo de transformação (adaptado).	34
Figura 8. Mecanismo de conjugação.	34
Figura 9. Inibidores das beta-lactamases com os respectivos antibióticos associados em sua estrutura química.	42
Figura 10. Inibição da síntese da parede celular.	44
Figura 11. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.	56
Figura 12. Porcentagem de resistência e sensibilidade das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , frente aos antimicrobianos testados.	73

QUADROS

Quadro 1. Classificação dos antimicrobianos.	37
Quadro 2. Divisão dos grupos de antibióticos β -lactâmicos, estrutura química e sítio de ação.	38
Quadro 3. Correlação entre a classificação das β -lactamases	45
Quadro 4. Genes que codificam as enzimas β -lactamases	47
Quadro 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de resistência à β -lactâmicos deste estudo.	70

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AMI – Amicacina

AMP – Ampicilina

AMPC- Ampicilinase

ATM – Aztreonam

BLBLI – Betalactamase / inibidor de betalactamase

C3G – Cefalosporina de terceira geração

CAZ – Ceftazidima

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center Disease Control*).

CEPCD - Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças

CFO – Cefoxitina

CFZ – Cefazolina

CIP – Ciprofloxacina

CLI – Clindamicina

CLSI – Instituto Clínico e Padrões laboratoriais (*Clinical Institute and Laboratory Standards*).

CPE – *Enterobacteriaceae* produtora de carbapenemase (*Enterobacteriaceae producing carbapenemase*).

CPM – Cefepime

CRA – *Acinetobacter* resistente à carpapenems (*Acinetobacter resistant to carpapenems*)

CRE – *Enterobacteriaceae* resistente à carbapenêmicos (*Enterobacteriaceae resistant to carbapenems*).

CRO – Ceftriaxona

CRX – Cefuroxima

EGM – Elemento genético móvel

ERI – Eritromicina

ESBL– Beta-lactamase de espectro estendido (*Extended-spectrum betalactamase*).

EUCAST – Comitê Europeu de Susceptibilidade Antimicrobiana

GEN – Gentamicina

GNB – Gram-negative bacilli - Bacilos Gram-negativos

IMP – Imipenem

IRAS – Infecções Relacionadas a Saúde

LNZ – Linezolida

LPS – Lipopolissacarideo

MBL – Metallo betalactamase

MDR – Multidroga resistente

MIC – Concentração mínima inibitória (*Minimum inhibitory concentration*).

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBP – Proteína ligadora de penicilina (*Penicillin Binding Protein*).

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEN – Penicilina

PENC - Penicilinase

PPT – Piperaciclina + tazobactam

PSSA – *Staphylococcus aureus* susceptível à penicilina (*Staphylococcus aureus susceptible to penicillin*).

RIF – Rifampicina

SBL – Serina betalactamase

SUT - Sulfametoxazol + trimetropim

TDR – Totalmente droga resistente

TEC – Teicoplanina

TET – Tetraciclina

TGH – Transferência de genes horizontal

VRE – *Enterococos* resistente à vancomicina (*Enterococci resistant to vancomycin*).

WHO- *World Health Organization*

XDR – Extremamente droga resistente (*Extremely drug resistant*).

RESUMO

As β -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico, inativando a ação de antibióticos β -lactâmicos. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar fenotipicamente e molecularmente 14 genes de resistência à β -lactamases expressos em *Pseudomonas aeruginosa* e correlacionar os resultados encontrados. Um total de 99 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* foi selecionado e o antibiograma foi realizado. A PCR em tempo real foi realizada usando o sistema Sybr Green para amplificar os genes correspondentes às resistências encontradas na fenotipagem. Das 99 amostras, 14 foram identificadas como fenotipicamente resistentes ao ATM antimicrobiano. Três/14 (21,4%) genes *blaSME*, *blaOXA*, *blaGIM* foram encontrados simultaneamente em três amostras. De acordo com o teste estatístico, ao avaliar os resultados de amplificação obtidos para o PPT, o método molecular foi mais sensível para a detecção do gene que codifica a resistência a múltiplos fármacos, apresentando valores de ($p < 0,05$). Esta informação sugere que a pesquisa genética é mais sensível e específica em comparação com o antibiograma.

Palavras-chave: Antibiograma, Resistência Antimicrobiana, β -lactâmicos, Genes, Diagnóstico Molecular.

ABSTRACT

β -lactamases are enzymes that hydrolyze the β -lactam ring, inactivating the action of β -lactam antibiotics. The objective of this work was to diagnose phenotypically and molecularly 14 β -lactamase resistance genes expressed in *Pseudomonas aeruginosa* and to correlate the results found. A total of 99 samples of *Pseudomonas aeruginosa* were selected and the antibiogram was performed. Real-time PCR is being performed using the Sybr Green system to amplify the genes corresponding to the resistances found in phenotyping. Three/14 (21.4%) genes *bla*SME, *bla*OXA, *bla*GIM were found simultaneously in three samples. According to the statistical test, when evaluating the amplification results obtained for PPT, the molecular method was more sensitive for the detection of the gene coding for multidrug resistance, presenting values of ($p < 0.05$). This information suggests that gene research is more sensitive and specific compared to the antibiogram.

Key-words: Antibiogram, Antimicrobial Resistance, β -lactams, Genes, Molecular Diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um importante patógeno causador de infecções do trato respiratório em pacientes com fibrose cística. Patologia de origem genética, com manifestações clínicas pulmonares obstrutivas crônicas e insuficiência pancreática exócrina caracterizada pelo transporte defeituoso de cloretos, especialmente nas células exócrinas dos pulmões, pâncreas e glândulas sudoríparas (DAVIS, 2006). Esta morbidade pode ser desencadeada até pela água presente em equipamentos de terapia respiratória, que pode atingir facilmente pacientes internados, principalmente em uso de antimicrobianos e submetidos a procedimentos invasivos (SANTOS, 2013).

Este micro-organismo da família Pseudomonadaceae (PALLERONI et al., 1973), caracteriza-se como bastonete Gram-negativo, reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas; revelando mobilidade através de um único flagelo denominado polar monotríqueo. Esta bactéria produz os pigmentos pioverdina e piocianina que são fluorescentes difusíveis no meio de cultura. Algumas cepas produzem um pigmento avermelhado (piorrubina) ou preto (piomelanina) (POLLACK, 2003).

A resistência aos antibióticos pode acontecer naturalmente a partir da habilidade bacteriana de se adaptar. O uso indiscriminado de antimicrobianos permite maior exposição às bactérias e oportuniza a aquisição de mecanismos de resistência. A resistência antimicrobiana tornou-se um problema de saúde

pública em nível mundial (FIGUEIREDO, VIANNA e NASCIMENTO, 2013). Foram observados valores elevados de resistência da *P. aeruginosa* à gentamicina, imipenem, meropenem, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, aztreonam e à *piperacilina+tazobactam* (MATOS et al., 2014).

O mais efetivo e um dos primeiros mecanismos de resistência bacteriana, capaz de inativar o antimicrobiano são as β -lactamases, enzimas catalizadoras que hidrolisa o anel β -lactâmico, tornando inativa a ação do antibiótico. Dessa forma, o antimicrobiano não age contra as enzimas responsáveis pela síntese de parede celular bacteriana (HIRSCH e TAM, 2010). Os β -lactâmicos pertencem a classe de antimicrobianos mais utilizados clinicamente; estes fármacos são representados por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (PEREIRA, 2016).

As resistências antibacterianas são rotineiramente determinadas por técnicas fenotípicas clássicas. Os métodos de disco difusão e microdiluição em caldo são considerados os mais confiáveis para a detecção de todos os tipos de resistência mediadas por carbapenemases (BIALVAEI et al., 2015). Métodos de microdiluição em ágar e caldo têm como objetivo determinar a concentração mínima inibitória (MIC) do agente antimicrobiano, gerando uma inibição do crescimento da bactéria investigada (BIALVAEI et al., 2016).

A tecnologia utilizada nas reações de PCR, representa uma poderosa ferramenta em diagnósticos microbianos. Na área de diagnóstico bacteriano, pode se substituir as técnicas de cultura, especialmente quando são necessários ensaios para diagnóstico rápido e sensível. A precisão é definida como o grau de concordância das medidas em condições específicas, utilizando métodos

estatísticos, tais como desvio padrão ou limite de confiança (KRALIK e RICCHI, 2017).

Após identificar o micro-organismo, preconiza-se iniciar o tratamento com o antimicrobiano adequado. Para aplicação correta da antibioticoterapia, pontos fenotípicos úteis foram estabelecidos pelo Comitê Europeu de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST) e pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Entretanto, a avaliação do gene de resistência é importante para dificultar disseminação e auxiliar na contenção da resistência, o que justifica a necessidade de diagnósticos rápidos e precisos.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Infecções bacterianas

A infecção é uma das grandes preocupações encontradas dentro das unidades hospitalares. Nas Unidades de Terapias Intensivas (UTI), são manifestadas as infecções mais frequentes e as mais graves complicações ocorridas em pacientes hospitalizados. Esta realidade tem sido motivo de preocupação entre os órgãos governamentais e embora tenha sido criada uma regulamentação referente ao controle de infecções hospitalares na década de 80, a problemática continua sendo negligenciada no Brasil (MATOS et al., 2014).

As Infecções Relacionadas a Saúde (IRAS) representam um considerável problema de saúde pública, pois elevam os custos do tratamento do paciente, aumentam o tempo de permanência do indivíduo no hospital e como consequência, geram aumento dos riscos de morbidade e de mortalidade para os enfermos (HEGGENDORNN et al., 2016).

As IRAS não são somente uma complicação constante nos pacientes de terapia intensiva, mas também um dos mais acurados indicadores da qualidade assistencial prestada aos pacientes. Neste sentido, é de fundamental importância a adesão dos profissionais de saúde às medidas preventivas, observando e praticando as orientações sobre o controle das IRAS, a fim de

reduzir a incidência das enfermidades e promover uma assistência segura aos pacientes (FIGUEIREDO, VIANNA e NASCIMENTO, 2013).

1.2. IRAS causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

A espécie *P. aeruginosa* pode ser encontrada na pele, em superfícies de bancadas, pias, respiradores, desinfetantes, nos alimentos e na água, o que evidencia boa capacidade de adaptação da espécie ao ambiente (MATOS et al., 2014). As infecções comuns de *Pseudomonas* spp. são geralmente associadas à formação de biofilmes em tecidos naturais e implantes artificiais como válvulas cardíacas, próteses, cateteres (DANIS-WLODARCZYK et al., 2016).

A prevenção da colonização por *P. aeruginosa* envolve uma ação coordenada das células do sistema imune, incluindo células dendríticas, células T, macrófagos, neutrófilos, o que dificulta a persistência do micro-organismo no paciente. Os sintomas da infecção causada por *P. aeruginosa* depende da resposta imune do indivíduo e dos fatores de virulência bacterianos que, em grande parte, atuam para neutralizar a resposta imune do indivíduo (GELLATLY e HANCOCK, 2013).

Existe no Brasil um alto índice de infecção do trato respiratório, causado por *P. aeruginosa*, com um total de 66,7% das IRAS. Chama-se atenção também para as altas taxas de infecção do trato urinário (47,8%) e infecção de corrente sanguínea (15,8%). Em média, as infecções causadas por esse patógeno atingem pacientes na faixa etária de 13 a 97 anos, com uma média de idade de 52,81 anos. Foi notório o expressivo percentual de IRAS (47,78%) em pacientes com idade superior a 60 anos (SOUSA, OLIVEIRA e MOURA, 2016).

Diante da necessidade de adoção de melhores critérios na prescrição, dispensação e uso de antibióticos, faz-se necessário adequar as orientações e informações relacionadas ao uso consciente dos antimicrobianos (BARBOSA e LATINI, 2014).

1.3. Mecanismos de Resistência

Do ponto de vista bioquímico, as bactérias desenvolveram quatro principais mecanismos de resistência: (1) produção de β -lactamase, enzima que inativa ou modifica o antibacteriano; (2) expressão de bombas de efluxo que elimina o antibacteriano; (3) modificação do alvo, que diminui a afinidade do antibacteriano ou a síntese de um novo alvo e (4) alteração da permeabilidade da membrana externa, devido a perda ou a diminuição do diâmetro de uma porina (poro na membrana externa) (KARAIKOS et al., 2014; PÉRICHON e COURVALIN, 2009).

1.3.1. β -lactamase

A produção de β -lactamase por *P. aeruginosa* explica o porquê da sua sobrevivência em um foco infeccioso, apesar do uso de um antibiótico β -lactâmico (Tavares, 2001). O mecanismo 1 da Figura 1, demonstra onde a enzima é produzida a partir de um plasmídeo; mecanismo este, mais comum em bactérias gram negativas, frente aos β -lactâmicos (BUSH e JACOBY, 2010; PÉRICHON e COURVALIN, 2009, TAFUR al., 2008). Este mecanismo deve-se ao fato das bactérias expressarem enzimas capazes de modificar a estrutura dos antibacterianos, fazendo com que os farmacos percam a sua funcionalidade (BUSH e JACOBY, 2010).

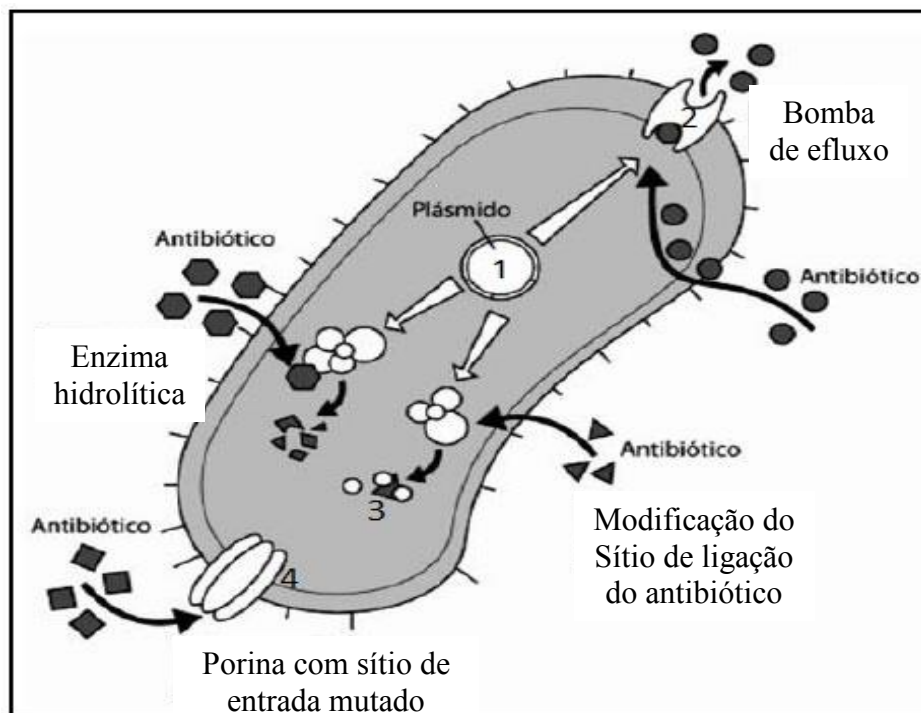


Figura 1: Principais mecanismos de resistência aos antibacterianos. **Fonte:** LEE et al., 2003.
 Legenda: 1 – Plasmídeo (produção de enzima); 2- Bomba de efluxo; 3 Modificação do sítio de ligação do antimicrobiano; 4- Porina com sítio de entrada mutado.

As enzimas β -lactamases são as mais prevalentes e têm a capacidade de hidrolisar a ligação amida do anel β -lactâmico presente nos antibióticos β -lactâmicos como representado na Figura 2 (BUSH e JACOBY, 2010). Na Figura 2 estão representados os mecanismos de resistência.

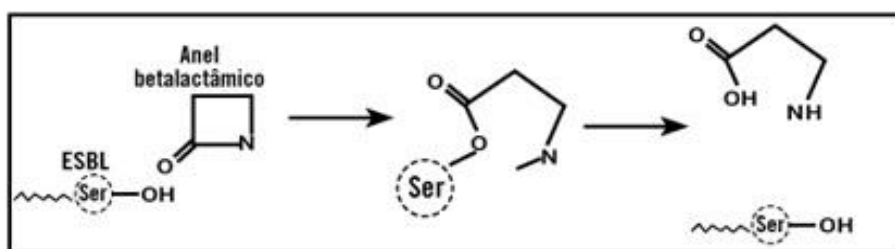


Figura 2: Mecanismo de hidrólise de antimicrobiano β -lactâmico por ESBL (beta-lactamase de espectro estendido). Legenda: Ser: serina. Fonte: adaptado: LIVERMORE, 1995.

1.3.2 Produção de Metallo β -lactamase

As Metallo β -lactamases (M β L) estavam presentes em poucos micro-organismos de relevância clínica até o início dos anos 90, mas sempre associadas com infecções oportunistas. Em *Bacteróides fragilis* foi encontrada a primeira M β L adquirida e a caracterização do gene *cfiA*, demonstrou que esta enzima poderia também ser mediada por elementos genéticos móveis (YAMAZOE et al., 1999). Posteriormente, foi observado no Japão, um isolado de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem e a outros antimicrobianos anti*Pseudomonas*, esses genes eram produtores de M β L e advinham de elementos genéticos móveis (WATANABE et al., 1991).

Seguindo uma tendência mundial, em 2002 isolados produtores de M β L começaram a ser descritos no Brasil, trazendo alto índice de informação de resistência aos carbapenêmicos. Com exceção do aztreonam, essas enzimas degradam todos os β -lactâmicos, incluindo as associações com inibidores comerciais de betalactamases, como tazobactam, clavulanato e sulbactam. (LICOPAN et al., 2010; SADER et al., 2005; GALES et al., 2003).

As imipenemases (IMP) são enzimas classificadas dentro do grupo das M β L (WATANABE et al., 1991), são elas: Seoul imipenemase (SIM) (LEE et al., 2005), São Paulo metallo-betalactamase (SPM-1) (TOLEMAN et al., 2002), Australian imipenemase (AIM) (YONG et al., 2007), Kyorin health science metallo-beta-lactamase (KHM-1) (SEKIGUCHI et al., 2008), Verona integron encoded metallo-beta-lactamase (VIM) (LAURETTI et al., 1999), Dutch imipenemase (DIM-1) (POIREL et al., 2009) e Tripoli M β L (TMB-1) (EL SALABI

et al., 2009) German imipenemase (GIM) (CASTANHEIRA et al., 2004), New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) (YONG et al., 2009).

As M β Ls são enzimas cuja atividade é dependente de cátions divalentes como o zinco ou cádmio, dessa forma, sua atividade pode ser inibida por quelantes de metais tais como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido 2-mercaptoacético (MAA) e 2-mercaptopropiônico (MPA) (ARAKAWA et al., 2000). A identificação das M β Ls em *P. aeruginosa* é uma urgência clínica e epidemiológica.

O método de dupla difusão do disco para detecção de isolados produtores de M β L, utilizando a ceftazidima (CAZ) como substrato, indicou o MPA como agente quelante de maior sensibilidade entre os inibidores utilizados, (ARAKAWA et al., 2000). Em seguida, foi relatado que o EDTA, em presença do substrato imipinem (IMP- inglês *IPM*), apresentou maior sensibilidade para detecção de isolados produtores de M β L, aplicando o teste de sinergismo com disco de EDTA (LEE et al., 2003; OH et al., 2003). O método de dupla difusão de disco para detecção de isolados produtores de M β L está representado na figura 3.

O EDTA, em baixas concentrações, na presença dos substratos CAZ e meropenem (MEM), aumenta sua eficácia e foi relatado para indicar a produção de M β L em isolados de resistência dos tipos VIM e IMP (MARCHIARO et al., 2005). O método utilizado por NEVES et al., (2011), foi o do disco combinado, técnica em que os possíveis inibidores foram adicionados diretamente sobre o disco contendo os antibióticos CAZ e/ou IPM e foi observada a inibição.

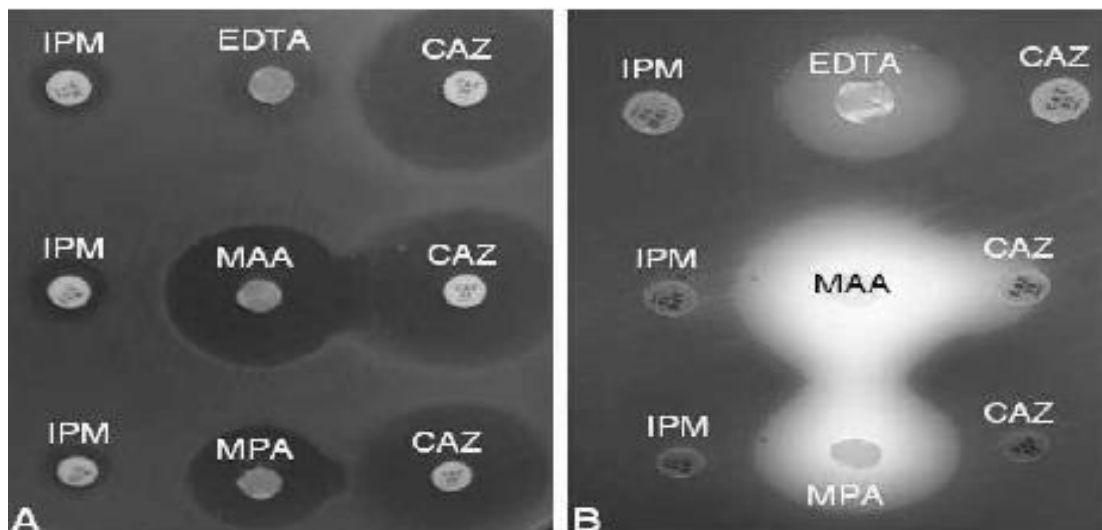


Figura 3: Método de dupla difusão do disco (A e B).

Fonte: NEVES et al., 2007.

Legenda: IPM: imipenem; MAA: ácido 2-mercaptoacético; CAZ: ceftazidima; MPA: ácido 2-mercaptopropiônico; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; SPM-1: São Paulo metallo-beta-lactamase; CIM: concentração inibitória mínima; VIM: Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

1.3.3. Bomba de efluxo

Este sistema é um mecanismo de transporte ativo para o exterior da célula, como forma de proteção contra o acesso indesejado de moléculas prejudiciais à bactéria (SAIER et al., 1998). Em *P. aeruginosa*, a principal função das bombas de efluxo é eliminar substâncias tóxicas ou metabólitos secundários, além de excretar moléculas sinalizadoras que direcionam a comunicação celular (KRIENGKAUYKIAT et al., 2005).

Estes sistemas de efluxo permitem a eliminação de grandes quantidades de moléculas, tais como metabólitos, detergentes, solventes orgânicos e antibacterianos. Os sistemas de bomba de efluxo aparecem como causa importante de multirresistência em *P. aeruginosa* e são, geralmente, agrupados em cinco famílias (NIKAIDO et al., 2012).

Os antibióticos fazem parte das substâncias tóxicas e sua eliminação prejudica a eficácia do tratamento. Existem genes envolvidos na codificação da bomba de efluxo e que se expressam de forma constitutiva, conferindo resistência para múltiplos antimicrobianos (PIDDOCK et al., 2006). No DNA cromossomal bacteriano de *P. aeruginosa*, há genes denominados multidrogas bomba efluxo (Mex), esses genes foram caracterizados como *MexAB-OprM* (POOLE et al., 1993), *MexCD-OprJ* (POOLE et al., 1996), *MexEF-OprN* (KÖHLER et al., 1997), *MexXYOprM* (MINE et al., 1999).

Em bactérias classificadas como Gram-negativas, as bombas de efluxo são formadas por um conjunto de proteínas que possibilitam o transporte de substâncias. Existe um conjunto de proteínas localizado na membrana interna, constituído por MexB, MexD, MexF ou MexY, outro conjunto de proteínas transmembrânicas localizado no periplasma e formado por MexA, MexC, MexE ou MexX e um terceiro conjunto de proteínas formadora do canal porina, localizado na membrana externa e constituído pelo conjunto proteico OprJ, OprM ou OprN (Figura 4).

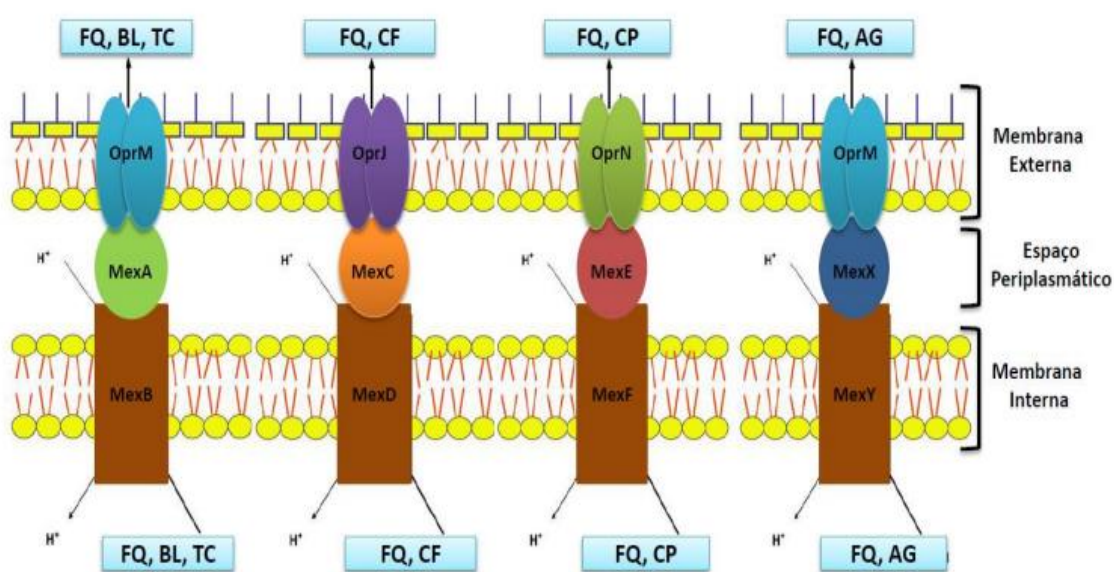


Figura 4: Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, indicando a localização das proteínas constituintes da bomba e ação preferencial a determinados tipos de substratos.

Legenda- FQ: fluoroquinolona; BL: β -lactâmico; TC: tetraciclina; CF: cefalosporina; CP: carbapenêmico; AG: aminoglicosídeo. Fonte: Adaptação de ASKOURA et al., 2011.

A bomba de efluxo desempenha atividade essencial em multirresistência de *P. aeruginosa* (NIKADO et al., 2012). Na Figura 4 o sistema se organiza em: 1. Proteína transportadora de membrana citoplasmática, que desempenha a função da bomba; 2. Proteína de membrana externa (porina), responsável por formar o canal extrusivo; 3. Proteína de fusão, localizada no espaço periplasmático, unindo os constituintes da bomba e o canal de extrusão (ASKOURA et al., 2011).

O aumento da expressão de bombas de efluxo inespecíficas pode originar resistências cruzadas a múltiplas classes de antibacterianos. As bombas de efluxo são compostas por proteínas transportadoras e estes transportadores podem ser classificados em cinco famílias: a família ABC (*ATP binding cassette*), MFS (*major facilitator*), MATE (*multidrug and toxic efflux*), RND (*resistance nodulation division*), SMR (*small multidrug resistance*) Figura 5 (WOLTER et al., 2013; LISTER et al., 2009).

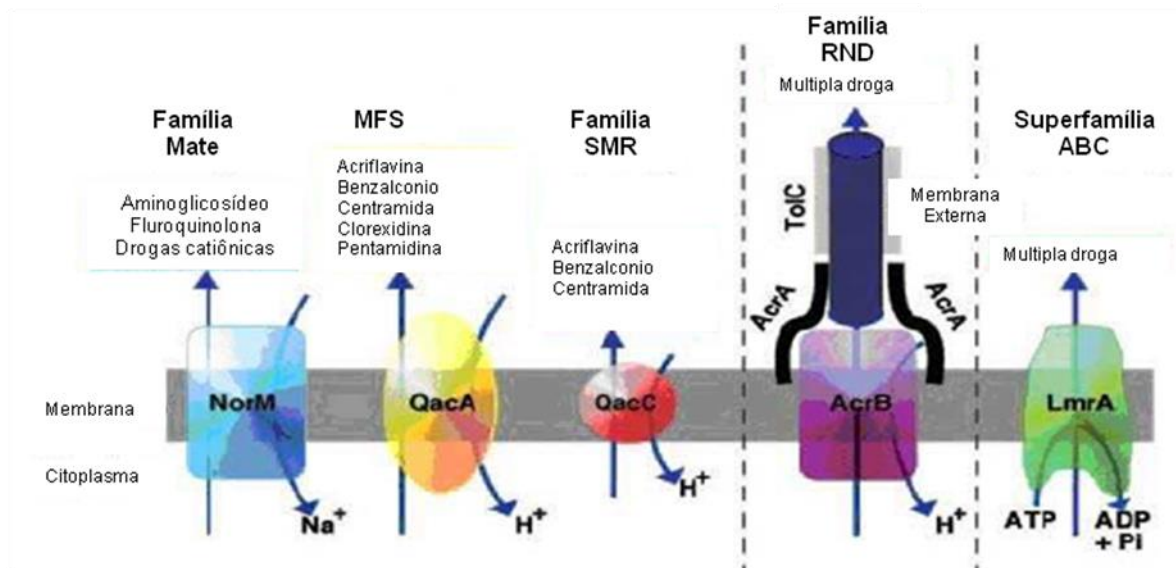


Figura 5: Famílias de bombas de efluxo (proteínas transportadoras). Legenda: Famílias de bombas de efluxo: superfamília cassete de ligação de ATP (ABC), família dos facilitadores principais (MFS), família resistência-nodulação-divisão (RND), família de extrusão de multidrogas e compostos tóxicos (MATE), família de baixa resistência a multidrogas (SMR). Fonte: PIDDOCK, 2006.

A hiperexpressão das bombas de efluxo está relacionada à resistência a várias drogas antimicrobianas de atividade contra as *Pseudomonas* spp. (XAVIER et al., 2010).

1.3.4. Perda de Porina

A bactéria *P. aeruginosa* apresenta porinas de membrana externa (OMPs) em sua composição, que fisiologicamente tem atividade contra compostos tóxicos, com canais constituídos de água para possibilitar a difusão passiva de solutos hidrofílicos através da membrana externa para dentro da célula (NIKAIDO et al., 1994).

As porinas são denominadas: OprC, OprD, OprE e OprF. A porina OprF é a mais abundante e a mais utilizada para difusão dos β -lactâmicos para o interior

da bactéria (LIVERMORE et al., 2002). OprC e OprE são utilizadas por alguns antimicrobianos, para penetrarem dentro do citoplasma bacteriano (VILA et al., 2002). As porinas das *P. aeruginosa* têm sido classificadas e caracterizadas segundo sua atividade, estrutura funcional, regulação e expressão (PAGÈS et al., 2008).

A porina OprD constitui canais transmembrânicos, acessíveis aos carbapenêmicos. A perda do canal OprD, induz a impermeabilidade mutacional, gerando resistência aos carbapenêmicos e susceptibilidade diminuída ao meropenem (OCHS et al., 1999; STUDEMEISTER et al., 1988).

1.3.5. Produção de Metilase

Enzimas metilases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, possuem a capacidade de modificar a estrutura do antimicrobiano, conferindo resistência antes que este se ligue ao alvo. As alterações enzimáticas realizadas nas subunidades dos ribossomos podem atingir tanto grupos aminas como hidroxilas, por processos de O-fosforilação ou O-adenilação, induzidas por fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANT) dependentes de ATP, ou por processo de N-acetilação, utilizando acetiltransferases (AAC), dependentes de acetil coenzima A (acetil-coA) (DAVIES et al., 1974).

As metilases 16S rRNA, isoladas de *P. aeruginosa*, são outro grupo de enzimas que induzem resistência utilizando um sistema de metilação sítio-específica (LINCOPAN et al., 2010, YAMANE et al., 2007 YOKOYAMA et al., 2003). A metiltransferase ribossomal “*ribosomal methyltransferase*” D (*RmtD*), é uma metilase 16S rRNA, foi encontrada em um isolado de *P. aeruginosa*,

produtora de M β L do tipo SPM-1, apresentando resist \hat{e} ncia fenot \hat{e} pica a todos os β -lact \hat{a} micos (SAFDAR et al., 2004).

1.4 Resist \hat{e} ncia intr \hat{i} nseca e adquirida

A resist \hat{e} ncia aos antibacterianos pode ser intr \hat{i} nseca e/ ou resist \hat{e} ncia adquirida (P \acute{E} RICHON e COURVALIN, 2009). As bact \acute{e} rias podem ser intrinsecamente resistentes a uma ou mais classes de agentes antibacterianos ou podem adquirir resist \hat{e} ncia a partir de nova muta \hat{c} o \hat{a} o gen \acute{e} tica ou atrav \acute{e} s da aquisi \hat{c} o \hat{a} o de genes de resist \hat{e} ncia a partir de outros micro-organismos (TENOVER, 2006).

A resist \hat{e} ncia natural \acute{e} advinda de altera \hat{c} o \hat{e} s fisiol \acute{o} gicas da esp \acute{e} cie bacteriana ou originada de um gene estrutural (P \acute{E} RICHON e COURVALIN, 2009). *P. aeruginosa* \acute{e} um organismo que apresenta resist \hat{e} ncia intr \hat{i} nseca a v \acute{a} rios substratos, devido a baixa permeabilidade da membrana externa, o que se deve ao n \acute{u} mero de sistemas de efluxo, como tamb \acute{e} m \grave{a} presen \hat{c} a de β -lactamases codificadas no DNA cromossomal (P \acute{E} RICHON e COURVALIN, 2009).

Resist \hat{e} ncia adquirida pode advir da troca de material gen \acute{e} tico entre os micro-organismos, podendo resultar em resist \hat{e} ncia a um ou mais antibi \acute{o} ticos. A transfer \hat{e} ncia de material gen \acute{e} tico pode ser horizontal ou vertical. Transfer \hat{e} ncia horizontal \acute{e} um processo em que um organismo transfere material gen \acute{e} tico para outra c \acute{e} lula que n \hat{a} o \acute{e} sua descendente e transfer \hat{e} ncia vertical \acute{e} quando um organismo recebe material gen \acute{e} tico do seu antecessor (HARBOTTLE et al., 2006).

A transferência horizontal é subdividida em três tipos: transdução, transformação e conjugação. O processo de reprodução no qual o DNA bacteriano é transferido de uma bactéria para outra, por meio de vírus denominados bacteriófagos é chamado de transdução (Figura 6) (THOMAS e NIELSEN, 2011).

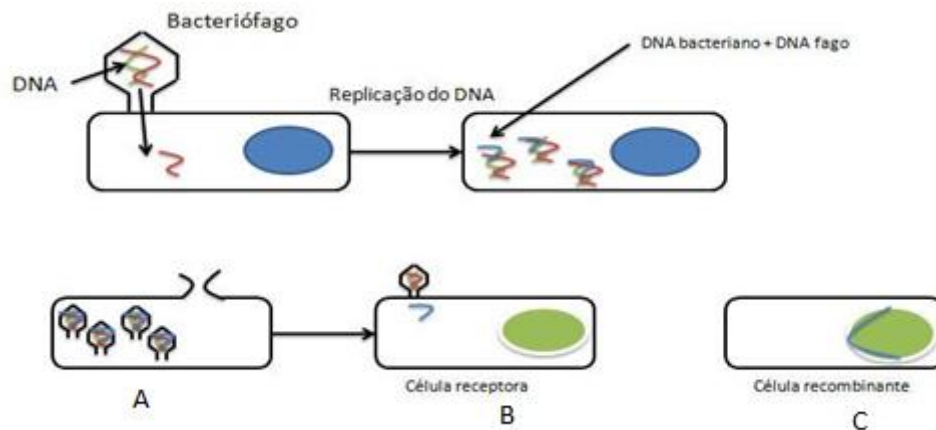


FIGURA 6: Mecanismo de transdução mediado por bacteriófagos

Fonte: http://www.libertaria.pro.br/antibioticos_intro.htm#2

Legenda: (A) Bactéria com material genético bacteriano encapsulado pelo fago;

(B) Penetração do material genético da célula A pelo fago na célula receptora;

(C) Bactéria recombinante (DNA da bactéria A recombinado no material genético da bactéria C).

A transformação é o processo de incorporação de material genético que se encontra livre em um meio, por uma célula bacteriana. É frequentemente identificado na troca de genes de virulência e patogenicidade de microorganismos do gênero *Pseudomonas* spp. (Figura 7) (SPRINGMAN et al., 2009),

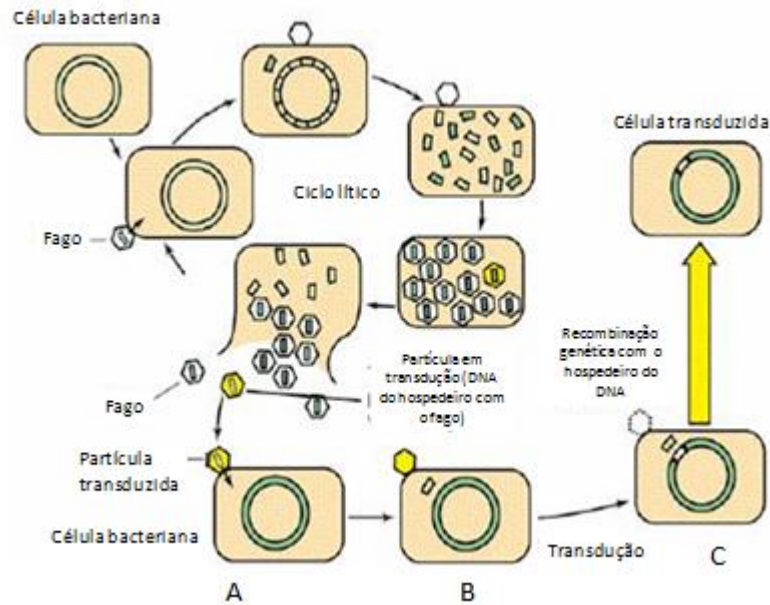


FIGURA 7: Mecanismo de transformação (adaptado).

Fonte: http://www.libertaria.pro.br/antibioticos_intro.htm#2

Legenda: (A) Inserção da partícula transduzida; (B) Partícula da bactéria; (C) adesão da partícula transduzida no genoma viral.

A conjugação está associada com a aquisição de material genético plasmidial entre uma célula doadora (F+) e outra célula receptora (F-). Muitos dos genes que codificam resistência são disseminados por plasmídeos, os quais podem ser adquiridos por bactérias patogênicas (Figura 8) (SORENSEN et al., 2005).



FIGURA 8: Mecanismo de conjugação.

Fonte: http://www.libertaria.pro.br/antibioticos_intro.htm#2 (Adaptado).

Legenda: (F+) bactéria doadora; (F-) bactéria receptora.

1.5. Resistências de *Pseudomonas aeruginosa*

Há relatos de que a multirresistência é uma característica das infecções causadas por *P. aeruginosa*. Considera-se que os percentuais de resistência são mais elevados nas amostras isoladas em UTI, refletindo a maior intensidade de uso de antimicrobianos neste ambiente e possível transmissão de cepas multirresistentes entre os pacientes (DELIBERALI et al., 2011). Segundo MATOS et al., (2014), a bactéria *P. aeruginosa* apresentou elevada resistência aos antibióticos tradicionais, gerando preocupação com a falência terapêutica relacionada ao uso destes medicamentos.

O cenário relativamente recente mostra uma rápida disseminação de bactérias com resistência múltipla aos antimicrobianos, limitando significativamente as opções terapêuticas disponíveis. Assim, conhecer os mecanismos de resistência em uma bactéria importante epidemiologicamente, como a *Pseudomonas aeruginosa*, é de extrema relevância na elaboração de estratégias relacionadas a adequação do tratamento e na elaboração de um conjunto de medidas para controle das IRAS (CRISTINA e DANTAS, 2015).

Os principais mecanismos relacionados com fenótipos multirresistentes de *P. aeruginosa* em hospitais brasileiros são produção de metalo- β -lactamases (M β L) do tipo SPM-1, produção de metilase 16S rRNA RmtD, perda de porina OprD e superexpressão de bombas de efluxo. Tais mecanismos podem explicar os altos índices de resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos. Medidas de vigilância e a precoce detecção de isolados com fenótipo multirresistente poderão contribuir para um controle epidemiológico efetivo (NEVES et al., 2011).

1.6. Definições para o grau de resistência de *P. aeruginosa*

Em 2008, houve um encontro entre representantes do Centro Europeu, para controle e prevenção de doenças e representantes do Centro de controle e prevenção de doenças com o intuito de formular estratégias para combater resistências associadas a bactérias multidrogas resistentes e a infecções associadas aos cuidados à saúde. A partir dessa reunião científica, criou-se um fórum, composto por membros do Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST), membros do Instituto de padronização de Laboratório Clínico (CLSI) e membros da associação de alimentos e drogas dos Estados Unidos (FDA) (CDC, 2013; EUCAST, 2008).

Após discussões do fórum, o grau de resistência bacteriana foi classificado em Multi Droga Resistente - MDR, Extensivamente Droga Resistente – XDR e Pan Droga Resistente - PDR. MDR significa resistente a mais de um agente antimicrobiano (HIDRON et al., 2008). As bactérias classificadas como XDR são epidemiologicamente resistentes a múltiplos antimicrobianos, mas também considera o perfil ameaçador de se tornar resistentes a todos ou quase todos os agentes antimicrobianos definidos para determinada classificação (PARK et al., 2009). Para que uma bactéria seja considerada PDR ela deve ser resistente a todas os fármacos utilizadas rotineiramente (FALAGAS, KOLETISI, BLIZIOTIS, 2005).

1.7. Classificação dos antimicrobianos

Os antimicrobianos listados no Quadro 1, são substâncias que têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento dos micro-organismos. São produzidos por bactérias ou fungos e podem ser naturais, semissintéticos ou totalmente sintetizados em laboratórios. O principal objetivo do uso de um antimicrobiano é o de prevenir ou tratar uma infecção, diminuindo ou eliminando os organismos patogênicos e se possível, com preservação da microbiota (MELO, DUARTE e SOARES, 2012).

Quadro 1. Classificação dos fármacos quanto ao potencial antimicrobiano

VARIÁVEL	CLASSIFICAÇÃO	EXEMPLO
Micro-organismos suscetíveis	Antibacterianos	Beta-lactâmico
	Antifúngicos	Griseofulvina
	Antivirais	Aciclovir
	Antiparasitários	Pirimetamina
Origem do antimicrobiano	Antibióticos: produzidos por micro-organismos	Aminoglicosídeo
	Quimioterápicos: sintetizados em laboratório	Sulfonamidas
Atividade antibacteriana	Bactericida: matam os micro-organismos	Quinolona
	Bacteriostático: inibem o crescimento dos micro-organismos, sendo necessária a atuação do sistema imunitário para eliminação do germe.	Macrolídeo
Mecanismo de Ação	Alteração de parede celular	Beta-lactâmico
	Alteração de membrana citoplasmática	Anfotericina B
	Interferência na replicação cromossômica	Antifúngicos/antivirais
	Inibição da síntese protéica	Aminoglicosídeo
	Inibição metabólica	Sulfonamida
Espectro de Ação	Espectro para Gram-positivas	Penicilina
	Espectro para Gram-negativas	Aminoglicosídeos
	Amplo espectro	Cloranfenicol
	Ativo sobre protozoários	Tetraciclina
	Ativo sobre fungos	Nistatina
	Ativo sobre espiroquetas	Eritromicina
	Ativo sobre riquetsias, micoplasma e clamídias	Macrolídeo
	Ativo sobre micobactérias	Estreptomicina
Ativo sobre algas	Anfotericina B	

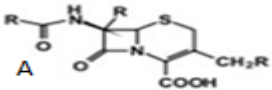
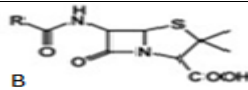
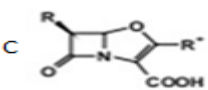
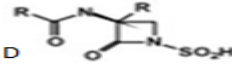
Fonte: (MELO, DUARTE e SOARES, 2012).

1.8. Classificação dos β -lactâmicos

A associação de diferentes tipos de cadeias lineares, juntamente com suas próprias características e estrutura, formado por dois anéis aromáticos, resulta em diferentes grupos de antibióticos β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases. Tem aumentado o uso de β -lactâmicos (Quadro 2), como parte de uma estratégia terapêutica, buscando aperfeiçoar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas destes antibióticos no tratamento de algumas infecções causadas por micro-organismos com sensibilidade reduzida (OLIVEIRA et al., 2012).

Os antimicrobianos podem ser classificados de várias maneiras, considerando seu espectro de ação, tipo de atividade antimicrobiana, grupo químico ao qual pertencem e mecanismo de ação. As principais classes de fármacos inibem os principais alvos: biossíntese da parede bacteriana, biossíntese de proteínas, biossíntese de ácidos nucleicos, metabolismo do ácido fólico e membrana celular (BRASIL, 2011).

Quadro 2. Divisão dos grupos de antibióticos β -lactâmicos, estrutura química e sítio de ação na parede celular.

GRUPO	ESTRUTURA QUIMÍCA
Penicilinas	 <p>A</p>
Cefalosporinas	 <p>B</p>
Carbapenêmicos	 <p>C</p>
Monobactâmicos	 <p>D</p>

FONTE: (adaptado de OLIVEIA et al., 2009).

Legenda: (A) estrutura química das penicilinas; (B) estrutura química das cefalosporinas; (C) estrutura química dos carbapenêmicos; (D) estrutura química dos monobactâmicos.

1.8.1. Penicilinas

As penicilinas foram os primeiros antimicrobianos usados na terapêutica. De origem natural ou sintética, são amplamente utilizadas para a maioria das infecções. São bactericidas e interferem na síntese da parede celular bacteriana. Com o surgimento de resistências bacterianas, este antibiótico recebeu o adição de um grupo amino na cadeia lateral, proporcionando um espectro de ação mais amplo e passou a ser comercializada como penicilina semissintética, denominada aminopenicilina, ampicilina e amoxicilina (CALIXTO et al., 2009).

As penicilinas são classificadas em: amoxicilina, amoxicilina associada ao clavulanato de potássio, ampicilina, benzilpenicilina ou penicilina G e oxacilina (MELO, DUARTE e SOARES, 2012). A penicilina produziu resistência, disseminada rapidamente, pela produção de β -lactamases (FERREIRA, MATILLA e CARNEIRO, 2011). Com esse agravamento, foram desenvolvidas as penicilinas resistentes às penicilinases, chamadas oxacilinas. Posteriormente, para ampliar a cobertura contra os bacilos gram-negativos, foram desenvolvidas as penicilinas sendo divididas em dois grupos, as carboxipenicilinas representadas por carbenicilina e ticarcilina e ureído-penicilina, representadas por mezlocilina, piperacilina e azlocilina (NILESON et al, 2010; MELO, DUARTE e SOARES, 2012).

Apesar das propriedades farmacológicas das penicilinas de amplo espectro, obtidas por associação com inibidores de β -lactamases, as bactérias

continuaram a produzir as enzimas β -lactamases, como a forma mais eficiente e comum dos micro-organismos se tornarem resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos (MANDELL et al., 2004).

1.8.2. Cefalosporinas

As cefalosporinas são antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, sendo sua classificação de acordo com suas atividades antimicrobianas, características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. As cefalosporinas podem ser de primeira geração (cefalotina, cefazolina, cefalexina e cefadroxila) (LIMA et al., 2016), de segunda geração (cefoxitina, cefuroxima e cefacior), (MURRAY et al., 1998), terceira geração (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) e cefalosporinas de quarta geração (cefepima), que possuem ação sobre bactérias gram-negativas, sendo eficazes contra *P. aeruginosa* (ANVISA, 2017).

1.8.3. Carbapenêmicos

Imipenem, meropenem e ertapenem são os carbapenêmicos disponíveis atualmente no Brasil. Apresentam amplo espectro de ação para uso em infecções sistêmicas e são estáveis à maioria das β -lactamases (OLIVEIRA et al., 2010). Devido a discretas diferenças com relação ao mecanismo de resistência, podem ser encontradas amostras sensíveis a um carbapenem e resistentes ao outro. Esse fenômeno é relativamente raro, está relacionado a mecanismo de resistência que envolve as porinas e tem sido descrito principalmente em cepas de *P. aeruginosa* (GUIMARÃES et al., 2010).

Com relação às indicações clínicas, por serem Fármacos de amplo espectro e com penetração na maioria dos sítios de infecção, podem ser

utilizados no tratamento de infecções em que exista uma forte suspeita de microbiota aeróbia e anaeróbia ou infecções causadas por organismos multirresistentes (ZAVASCKI et al., 2010).

1.8.4. Monobactâmicos

Foram descobertos em 1981 e são caracterizados por um anel monocíclico em sua estrutura. No Brasil, temos disponível o aztreonam (OPLUSTTIL et al., 2010). A respeito das indicações clínicas, as enterobacteriaceae são normalmente sensíveis ao aztreonam. Não deve ser usado como monoterapia em infecções graves por *P. aeruginosa* e mantém-se ativo em meios ácidos, sendo uma opção no tratamento de abscessos (LIVERMORE et al., 2011).

Os monobactâmicos naturais possuem baixa atividade antibacteriana, não tendo atividade contra micro-organismos gram-positivos ou anaeróbios estritos. Existem alguns compostos neste grupo, mas o único comercializado é o aztreonam, visto possuir elevada estabilidade para a maioria das β -lactamases (igual ou superior às cefalosporinas de 3^o Geração), sendo ativo contra bactérias gram-negativas aeróbias e facultativas (GEORGOPAPADAKOU et al., 1983).

1.8.5. Inibidores das β -lactamases

A adição de compostos com capacidade para inibir as β -lactamases, é uma das estratégias que se pode optar para diminuir os seus efeitos. Contendo a ligação amida do grupo beta-lactâmico, os inibidores de β -lactamases são estruturalmente semelhantes às penicilinas, mas possuem uma cadeia lateral

modificada, apresentando assim uma estrutura bicíclica. Esses aspectos estruturais fazem com que os inibidores se liguem de forma irreversível às beta-lactamases, agindo como substratos suicidas, tornando-as inativas (LEE et al., 2001). Os três inibidores mais utilizados na prática clínica são o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. Na Figura 9 apresenta-se a estrutura química destes inibidores e os antibióticos aos quais são normalmente associados.

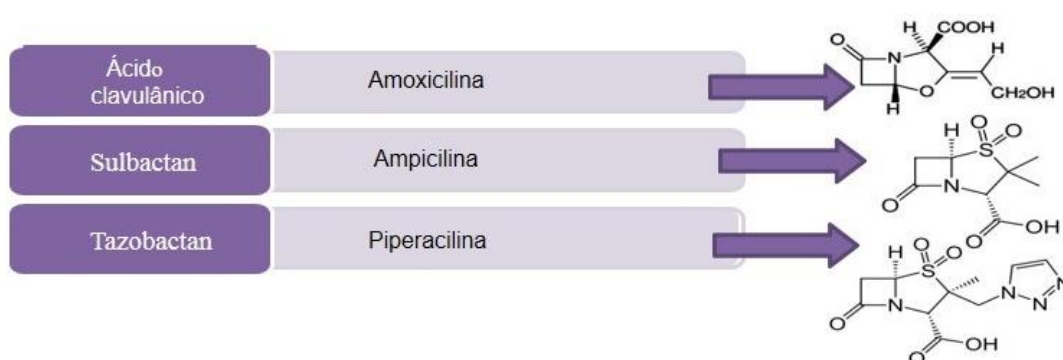


Figura 9: Inibidores das beta-lactamases com os antibióticos associados em sua estrutura química. Fonte: (ACOSTA et al., 2014).

O ácido clavulânico foi isolado a partir de *Streptomyces clavuligerus* em 1976. É um fraco inibidor das PBPs, atuando como um inibidor irreversível para β -lactamases da classe A. Por sua vez as Penicilinas apresentam no anel β -lactâmico, um átomo de oxigênio no lugar do elemento químico enxofre, demonstrando assim um anel oxazolidínico. Por último, o sulbactam é uma sulfona do ácido penicilânico e inibe as beta-lactamases da classe A e algumas de classe D e C (SOUSA, 2016).

1.9. Mecanismo de ação dos β -lactâmicos

As bactérias classificadas como Gram positivas possuem parede celular com uma espessa camada de peptidoglicano. Quando este tipo bacteriano entra em contato com a coloração de Gram, adquirem a cor púrpura ou azul, se fixada com cristal violeta. Entretanto, as bactérias que possuem parede celular mais delgada, apresentam uma segunda membrana lipídica, diferente da membrana plasmática, quando em contato com a coloração Gram, o lipídio da membrana mais externa é dissolvido no álcool e libera o primeiro corante, o cristal violeta (MELO, DUARTE e SOARES, 2012).

A penetração dos antibióticos β -lactâmicos na célula bacteriana está diretamente relacionada com a parede celular (MURRAY et al., 2005). O mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos resulta em parte da sua habilidade de interferir com a síntese do peptidoglicano responsável pela integridade da parede bacteriana. Os β -lactâmicos devem penetrar na bactéria através das porinas, presentes na membrana externa da parede celular, e posteriormente, a droga se liga e inibe as proteínas ligadoras de penicilina (PLP) responsáveis pela etapa final da síntese da parede bacteriana (BRASIL, 2017).

A figura 10 exemplifica o mecanismo de ação dos β -lactâmicos na parede celular bacteriana.

Quadro 3. Classificação de β -lactamases bacterianas, segundo Bush-Jacoby

Grupo segundo Bush-Jacoby (2009)	Grupo segundo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe Molecular (subclasse)	Substrato	Inibido por		Características de ESBL	Exemplo de enzimas
				AC ou TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Maior hidrólise de cefalosporinas que benzilpenicilina; hidrolisa cefamicinas Hidrólise aumentada de ceftazidima e muitas vezes outros oximino-lactâmicos	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cefalosporinas	Não	Não	Maior hidrólise de benzilpenicilina do que cefalosporinas	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillinas	Sim	Não	Hidrólise semelhante de benzilpenicilina e cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicillinas, cefalosporinas precoce	Sim	Não	Hidrólise aumentada de oximino-lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam)	TEM-1, TEM-2, SHV-1 TEM-3, SHV-2, CTX-M-15,
2be	2be	A	Cefalosporinas	Sim	Não	Resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	PER-1, VEB-1 TEM-30, SHV-10
2br	2br	A	Monobactâmicos	Não	Não	Hidrólise aumentada de oximino-lactâmicos combinada com resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2ber	NI	A	Penicillins	Não	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina	
2c	2c	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactâmicos	Não	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina, cefepima e ceftiprom	PSE-1, CARB-3 RTG-4
2ce	NI	A	Carbenicilina	Variável	Não	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2d	2d	D	Carbenicilina, cefepima	Variável	Não	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e oximino - lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2de	NI	D	Cloxacilina	Sim	Não	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e carbapenemes	OXA-23, OXA-48
2df	NI	D	Cefalosporinas Carbapenêmicos de espectro extendido	Variável	Não	Hidrólise de cefalosporinas. Inibido pelo ácido clavulânico, mas	CepA
2e	2e	A	Cephalosporinas de espectro extendido	Não	Não	não aztreonam	KPC-2, IMI-1, SME-1
2f	2f	A	Carbapenêmicos Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise aumentada de carbapenêmicos, oximino-lactâmicos, cefamicinas	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3a	3	B (B1)	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise de amplo espectro, incluindo carbapenêmicos, mas não monobactâmicos	L1, CAU-1, 1, FEZ-1 CphA, Sfh-1
		B (B3)					
3b	3	B (B2)	Cefalosporinas	Não	Não		
NI	4	Desconhecido					

Legenda: AC^a-ácido clavulânico; NI^b - não incluso; TZB^a-tazobactam

2. Genes de resistência à β -lactâmicos

Enzimas codificadas por genes localizados nos plasmídios ou nos cromossomos, com capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico, na ligação CO-N, promovendo a inatividade do antimicrobiano, são denominadas de β -lactamases. Estas proteínas especiais são importantes em bactérias classificadas como Gram-negativas, constituindo o principal mecanismo de defesa contra os β -lactâmicos, Quadro 4 (WILKE et al., 2005).

2.1. Gene *blaOXA*

As β -lactamases denominadas OXA (Oxacilinases), são um grupo de enzimas emergente. Suas estruturas moleculares agrupam-nas na classe D e o tipo de substratos em que atuam integra-as no grupo funcional 2d (MAGAGNIN et al., 2017). No entanto, foi identificada uma cepa de *P. aeruginosa*, isolada de um paciente na Turquia, no ano de 1991 (HALL et al., 1993). Porém, na década de 1980, esse organismo estava respondendo bem à cefalosporina de terceira geração e a ceftazidima e após aquisição do gene OXA, tornou-se resistente. Em particular, há cada vez mais relatos dessas enzimas sendo encontradas em plasmídeos (LU et al., 2013).

Quadro 4. Genes que codificam as enzimas β -lactamases

GENE	LOCALIZAÇÃO	TIPO	RESISTÊNCIA AO ANTIMICROBIANO	REFERÊNCIAS
<i>bla</i> _{SME}	Cromossomo	Carba	Penicilinas e Cefalosporinas	QUEENAN e BUSH, 2007
<i>bla</i> _{NDM}	Cromossomo Plasmídio	M β L/CARBA	Carbapenêmicos	WANG et al., 2015
<i>bla</i> _{IMP}	Cromossomo Plasmídio	Carba	Carbapenêmicos e Cefalosporinas	GALES et al., 2003 SENDA et al., 1996
<i>bla</i> _{OXA}	Cromossomo Plasmídio	Carba	Penicilinas, Cefalosporinas e Carbapenêmicos	WALTHER- RASMUSSEN; HOIBY, 2006
<i>bla</i> _{GIM}	Plasmídio	Carba	Penicilinas e Cefalosporinas	CASTANHEIRA et al., 2004
<i>bla</i> _{CTX-M}	Cromossomo	ESBL	Cefalosporinas	AL NAIEMI et al., 2006
<i>bla</i> _{KPC}	Plasmídio	Carba	Penicilinas e Cefalosporinas	QUEENAN e BUSH, 2007
<i>bla</i> _{SHV}	Cromossomo Plasmídio	ESBL	Penicilinas e Cefalosporinas	STÜRENBURG e MACK, 2003
<i>bla</i> _{VIM}	Cromossomo Plasmídio	Carba	Cefalosporinas e Carbapenemicos	MENDES et al., 2004 LAURETTI et al., 1999
<i>bla</i> _{SIM}	Plasmídio	Carba	Carbapenêmicos	LEE et al., 2005
<i>bla</i> _{SPM}	Plasmídio	MBL/Carba	Cefalosporinas e Carbapenêmicos	PASTERAN et al., 2005
<i>bla</i> _{DHA}	Plasmídio	AmpC	Cefalosporinas e Carbapenêmicos	LIVERMORE et al., 2006
<i>bla</i> _{CMY}	Plasmídio	AmpC	Cefalosporinas e Carbapenêmicos	CARATTOLI, 2009
<i>bla</i> _{TEM}	Plasmídio	ESBL	Penicilinas e Cefalosporinas	STÜRENBURG e MACK, 2003

Legenda: Carba – carbapenemase; ESBL – betalactamase de espectro expandido; MBL – metalo- β -lactamase; AmpC – Ampicilinase. O genes, a localização, o tipo de enzima e resistência aos antibióticos, foram detectados em *P. aeruginosa*.

2.2. Gene *blaIMP*

As primeiras enzimas classificadas como M β Ls foram as IMPs-1 (Imipenemases), encontradas pela primeira vez em *S. marcescens*, no Japão, em 1991 (POEREL et al., 2004). Outro estudo japonês demonstrou que pacientes infectados com M β Ls, mesmo após receber vários antibióticos, morreram devido à presença da enzima imipenemase, encontrada em *P. aeruginosa* (MIRSALEHIAN et al., 2010). Hospitais japoneses, entre 1991 e 1996, avaliaram 933 isolados de bacilos Gram negativos resistentes a ceftazidima, destes, 80 isolados possuíam o gene *blaIMP*-1 (HIRAKATA et al., 1998). As imipenemases são resistentes aos carbapenêmicos e às cefalosporinas (SENDA et al., 1996; GALES et al., 2003). São enzimas codificadas por cassetes gênicos, localizados no DNA cromossomo e/ou DNA plasmidial bacteriano (MENDES et al., 2004).

2.3. Gene *blaSME*

O gene *blaSME*-1 raramente é isolado e está confinado ao cromossomo das cepas de *S. marcescens* resistentes aos carbapenêmicos, foi detectada pela primeira vez na Inglaterra no ano de 1982, em duas cepas de *S. marcescens*. A disseminação de SME é feita via transferência para um elemento de DNA móvel e pode dificultar impedir o uso clínico de carbapenêmicos. Essa enzima cromossômica é capaz de hidrolisar penicilina, aztreonam e cefalosporinas, além de imipenem. Os genes SME, são encontrados em ilhas genômicas de profágos, dentro do cromossoma de *S. marcescens* (MARTÍNEZ-MARTÍNEZA E GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

2.4. Gene *bla*CMY

As CMY são enzimas AmpC que fazem parte do grupo das betalactamases, associadas a transposons ou integrons, localizados em plasmídeos conjugativos. Tem origem nas betalactamases AmpC cromossômicas, oriundas de *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* e *hafnia* s pp.. Estas enzimas têm sido descritas em *P. aeruginosa*. Entre as AmpC plasmidiais, os tipos CMY-2 são os mais frequentemente relatados em todo o mundo (JAFARI et al., 2013; AYALA et al., 2016). Estas enzimas são resistentes a cefalosporinas e carbapenêmicos (CARATTOLI, 2009).

2.5. Gene *bla*DHA

As DHA são classificações de enzimas AmpC, que fazem parte do grupo das betalactamases, sua transferência gênica está associada a transposons e/ou integrons, localizados em plasmídeos conjugativos. A DHA-1 (ampicilinase), é uma variação da betalactamase AmpC, mediada por DNA plasmídeo. Pertencente à família DHA e foi encontrada em *P. aeruginosa*, revelando resistência à cefalosporinas de amplo espectro tais como as quinolonas, cloranfenicol, carbapenêmicos e tetraciclina; codificam vários genes de resistência a antibióticos (NAJAFI et al., 2015; LIVERMORE et al., 2006).

2.6. Gene *bla*TEM

A enzima classificada como TEM (Temoneira) foi a primeira β -lactamase codificada por elemento genético móvel em *Escherichia coli*, a amostra positiva foi isolada de um paciente chamado Temoniera, nome que designou a enzima TEM-1 (DATTA et al., 1965). Esta enzima é capaz de hidrolizar antibióticos β -lactâmicos de espectro estendido, tais como penicilinas, cefalosporinas e monobactâmico (aztreonam). É tipicamente codificada por plasmídeos e transposons, que podem ser transferidos entre espécies bacterianas (WELDHAGEN et al., 2003). Essa proteína de resistência, já foi descrita em *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenza* e *Neisseria gonorrhoeae* (PFEIFER et al., 2010; RAWAT et al., 2010).

2.7. Gene *bla*KPC

A enzima classificada como KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) é produzida por bactérias gram-negativas (enterobactérias), que confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos: meropenem, ertapenem, imipenem, além de inativar os agentes β -lactâmicos: cefalosporinas, penicilinas e o aztreonam (LANDMAN et al., 2005; KITCHEL et al., 2009). As carbapenemases do tipo KPC são incluídas na classe A (AMBLER, 1980) ou grupo 2f de Bush (BUSH et al., 1995), elas são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (QUEENAN e BUSH, 2007). Embora mais frequente na *Klebsiella pneumoniae*, a KPC pode ser identificada em outras bactérias, a saber: *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*,

Salmonella spp., *E. coli* e *Pseudomonas spp.* (DIENSTMANN et al., 2010). É codificada por DNA plasmidial que pode ser transferido espécies bacterianas (WELDHAGEN et al., 2003; QUEENAN E BUSH, 2007).

2.8. Gene *bla*CTX-M

A betalactamase do tipo CTX-M (cefotaximase), pode ter sido originada da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata*, devido ao seu alto grau de homologia (BONNET, 2004). As ES β L do tipo cefotaximase são codificadas por genes *bla*CTX- M, localizados em plasmídeos. Estas enzimas conferem resistência a todas as cefalosporinas de espectro ampliado, entretanto, apresentam como substratos preferenciais a cefotaxima e a ceftriaxona (BONNET 2004; CARTELLE et al., 2004; ROSSOLINI et al., 2008).

A enzima CTX-M foi a primeira descrita em *P. aeruginosa* e foi observada em 2004, em isolados recuperados de amostras de escarro de um paciente com fibrose cística em Amsterdã (AL NAIEMI et al., 2006). A CTX-M-2 também foi encontrada em um isolado de *P. aeruginosa* identificada em um paciente hospitalizado no Brasil em 2005 (PICÃO et al., 2009).

2.9. Gene *bla*SHV

A denominação da sigla SHV vem de uma propriedade bioquímica variável sulfidrílica (“sulphydryl variable”) (TZOUVELEKIS e BONOMO, 1999). Esta β -lactamase é raramente relatada em *P. aeruginosa* (MANSOUR et al., 2009; HOCQUET et al., 2010). Os genes que codificam ESBLs são geralmente encontrados em plasmídeos e aqueles que codificam ESBLs dos tipos *bla*CTX-

M, *bla*TEM e *bla*SHV, são os principais grupos (PATERSON et al. 2003, JEMIMA E VERGHESE, 2008).

Em geral as enzimas do tipo SHV são encontradas em cepas de *K. pneumoniae*, mas tem sido encontradas também em *P. aeruginosa* (BRADFORD, 2001; WU et al, 2003).

2.10. Gene *bla*NDM

A enzima denominada betalactamase do tipo NDM (New Delhi metalobetalactamase), foi relatada pela primeira vez em 2009, na cidade de Nova Delhi, na Índia. O surgimento da NDM-1 implica em uma nova geração de bactérias multirresistentes (NORDMANN et al., 2005). Apesar de ter sido detectada pela primeira vez em enterobactérias fermentadoras, esta enzima já foi encontrada também em não fermentadores de glicose, como *P. aeruginosa*, representando um risco maior para pacientes hospitalizados em estado crítico nas unidades de tratamento intensivo (KARTHIKEYAN et al., 2010). A capacidade de a enzima NDM ser resistente aos carbapenêmicos sugere que o gene codificante desta proteína provavelmente esteja localizado em plasmídeo conjugativo e em cromossomo (WANG et al., 2015).

2.11. Gene *bla*GIM

A proteína GIM (imipenemase) foi encontrada em um plasmídeo não transferível. Isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes foram obtidos em 2002, de diferentes pacientes em Dusseldorf, Alemanha. Estes isolados foram

provenientes do trato respiratório e apresentaram resistência a todos os antimicrobianos β -lactâmicos (CASTANHEIRA, 2004).

Análise filogenética demonstra que o antepassado comum mais recente do clone de *blaGIM*, pode ser datado de abril de 1993 e que na referida data, essa cepa já teria abrigado o *blaGIM-1*. Estudos demonstram uma expansão clonal de plasmídeo encontrado em *S. Marcescens*, que expressou o gene *blaGIM-1*, sua transferência pode ter ocorrido sem percepção, na ausência de uma triagem molecular padronizada e efetiva para carbapenemases (WENDEL et al., 2017).

2.12. Gene *blaVIM*

A proteína denominada VIM, é uma metalo-beta-lactamase, codificada por gene localizado em um integron, previamente isolado de ferida cirúrgica de um paciente da CTI (Centro de Terapia Intensiva), no Hospital Universitário de Verona na Itália, em 1997 (LAURETTI et al., 1999). VIM-1 foi a primeira variante a ser identificada em *P. aeruginosa* (LAHEY, 2007). O segundo grupo dominante de M β L adquirida é a subclasse VIM, também conhecida como M β L europeia, devido à prevalência desta enzima nos países do continente europeu (WALSH et al., 2005a). Entre os isolados de *P. aeruginosa*, *blaVIM-1* foi identificado pela primeira vez, em um conjunto de cassete de genes localizado no transposon Tn402 defeituoso, sua disseminação foi associada a diferentes estruturas genéticas e á hospedeiros bacterianos. A enzima VIM induz resistência aos carbapenêmicos (LEE et al., 2005; TATO et al., 2010).

2.13. Gene *bla*SIM

SIM (Seoul imipenemase) é uma enzima codificada pelo gene *bla*SIM, o gene foi rastreado por PCR, utilizando a cepa HN39 e posteriormente, foi sequenciado, identificando a variante *bla*SIM-1, que apresenta resistência fenotípica e genotípica contra carbapenêmicos. O gene que codifica a SIM-1 está localizado em um integron de classe 1 (LEE et al., 2005a; VAN DUUREN et al., 2017). De acordo com Senda et al., (1996), SIM é encontrada com facilidade em *P. aeruginosa* entre outras MβLs.

2.14. Gene *bla* SPM

SPM (São Paulo metalo-β-lactamase), é uma MβL descrita em isolados de *P. aeruginosa*, a partir de cultura de urina de paciente hospitalizado no complexo hospitalar São Paulo, São Paulo, Brasil, recebendo, portanto, o nome de SPM. A SPM-1 é de origem plasmidial e hidrolisa cefalosporinas e carbapenêmicos (TOLEMAN, 2002; GALES, 2003; PASTERAN et al., 2005).

3. Diagnóstico fenotípico e molecular

O uso de testes fenotípicos para detecção de metalo-enzimas se torna de extrema relevância no diagnóstico de micro-organismos produtores de MBL, principalmente quando várias metodologias são utilizadas concomitantemente. O E-test MBL e o disco combinado de ceftazidima com EDTA, demonstraram

serem de boa sensibilidade e de fácil execução e interpretação na detecção de metalo-enzimas (ZANOL, PICOLI e MORSCH, 2010).

Devido às limitações dos testes fenotípicos específicos para diagnóstico das carbapenemases, os métodos padrão-ouro para a detecção destas enzimas e detecção de genes de resistência, são baseados em técnicas moleculares, tais como PCR convencional, PCRs multiplex, sequenciamento e hibridação de DNA (DORTET et al., 2014)

Com o crescente surgimento de carbapenemases, o ensaio por PCR em tempo real e o sequenciamento, têm sido ferramentas muito importantes para definir a alta variedade dessas enzimas e também para determinar isolados clínicos que abrigam mais de uma betalactamase. As técnicas de PCR são geralmente aplicadas para o seu reconhecimento em estudos epidemiológicos (DALLENNE et al., 2010).

Por outro lado, métodos moleculares para diagnóstico de carbapenemase e também para outros genes de resistência, que apresentam importância clínica, traduzem em uma acessibilidade de técnicas de diagnóstico rápido, além de permitir a vigilância dessas infecções multirresistentes e a identificação precoce de surtos; podendo facilitar a distribuição de bactérias resistentes (SWAYNE et al., 2013).

Muitos trabalhos científicos utilizam a qPCR para caracterização genética dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Em *P. aeruginosa*, estes estudos baseiam-se na comparação dos resultados de diagnóstico molecular, definindo quantitativamente a produção reduzida ou a super expressão de determinados genes. Estudos demonstram que as *P. aeruginosa* apresentam

elevadas resistências, tornando necessário estudos moleculares que possibilitam caracterizar tais expressões fenotípicas (XAVIER et al., 2010).

4. Métodos de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os métodos de teste de susceptibilidade antimicrobiana são divididos em tipos baseados no princípio aplicado em cada sistema. Incluem: Difusão (*Kirby-Bauer* e *Stokes*) e Diluição (Método E-Test). O método de *Kirby-Bauer* está bem documentado e as zonas padrão de inibição foram determinadas para valores susceptíveis e resistentes (LEKSHMI, 2012). Uma representação do método *Kirby-Bauer* e *Stokes* (antibiograma) pode ser observado na Figura 11.

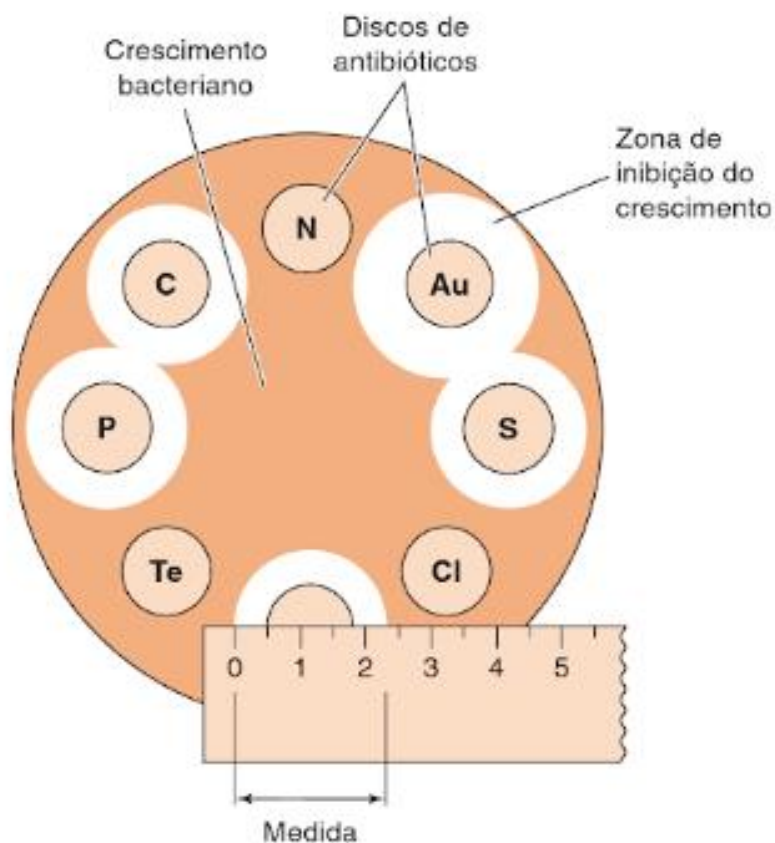


Figura 11: Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Fonte: LEVINSON, 2016.

Discos impregnados com antibióticos são posicionados na superfície de uma placa de meio sólido, previamente inoculada com organismo isolado do paciente. Após a incubação a 35 °C por 18 horas, período em que o antibiótico se difunde a partir do disco, determina-se o diâmetro da zona de inibição. O tamanho da zona de inibição é comparado com padrões, com a finalidade de determinar a sensibilidade do organismo ao fármaco (LEVINSON, 2016).

5. Métodos Moleculares

5.1. Reação em cadeia da Polimerase – PCR

A frase "Reação em cadeia da Polimerase" (PCR) foi utilizada primeiramente a mais de 30 anos, em um artigo que descrevia um novo modelo de amplificação de DNA. A primeira aplicação da PCR foi inviável devido ao uso do conhecido fragmento para amplificação, que necessitava ser adicionado à reação após cada etapa de desnaturação. A inovação crucial que promoveu o uso rotineiro da PCR foi a aplicação de uma polimerase termoestável, isolada de *Thermus aquaticus*. Isso propiciou, junto com a habilidade dos ciclos da PCR e componentes químicos, transmitir todo o reconhecimento da PCR, como uma escolha para uma amplificação enzimática específica de DNA *in vitro* (KRALIK, 2017).

Nota-se que para a reação de PCR, que incluem iniciadores, DNA polimerase, nucleotídeos, íons específicos, molde de DNA e a ciclagem; compreendendo as etapas da Desnaturação do DNA, Anelamento dos iniciadores e Extensão; não mudaram desde 1985. A invenção da PCR impulsionou as pesquisas em várias áreas da biologia e sua tecnologia tem

contribuído significativamente para o frequente nível de conhecimento humano em várias esferas das pesquisas (KRALIK, 2017).

5.2. PCR em tempo real

Embora a PCR tenha revolucionado a detecção de ácidos nucleicos, sua aplicação à análise quantitativa geralmente não é recomendada porque a PCR convencional só pode medir a concentração final de amplicons. Uma sequência alvo é amplificada exponencialmente durante a reação de PCR; contudo, na realidade, a concentração do ponto final não é proporcional à concentração inicial de DNA molde, devido a algumas limitações inerentes e aos vieses da PCR. Contrariamente à PCR convencional, o qPCR pode monitorar o progresso da amplificação do DNA em tempo real e visualizar a fase de amplificação exponencial (KIM, 2013).

Na PCR em tempo real, qPCR, a fluorescência é medida após cada ciclo e a intensidade do sinal fluorescente reflete a quantidade momentânea de amplicons de DNA na amostra naquele momento específico. Nos ciclos iniciais, a fluorescência é muito baixa para ser distinguível do *background*. No entanto, o ponto em que a intensidade de fluorescência aumenta acima do nível detectável, corresponde proporcionalmente ao número inicial de moléculas de DNA molde na amostra. Este ponto é chamado de ciclo de quantificação e permite a determinação da quantidade absoluta de DNA alvo na amostra de acordo com a curva de calibração construída de amostras padrões diluídas em série (geralmente diluições decimais) com concentrações conhecidas ou números de cópias. Além disso, o qPCR também pode fornecer resultados semi-quantitativos

sem padrões, mas com controles utilizados como material de referência. Neste caso, os resultados observados podem ser expressos como múltiplos superiores ou inferiores com referência ao controle (KRALIK, 2017).

Existem várias reações para detecção disponíveis que envolvem diversas moléculas fluorescentes, incluindo corantes não específicos de ligação à DNA, sondas de hidrólise, sondas de hibridização, sondas de luz, moléculas *beacons*, iniciadores *sunrises* e iniciadores *scorpions*. Embora cada método de detecção tenha características únicas, em todos os métodos, o nível de sinal de fluorescência reflete a quantidade acumulativa de amplicons alvo (KIM, 2013).

5.3. Sistema Sybr Green

SYBR Green I é um corante que se liga ao sulco menor do DNA de cadeia dupla (dsDNA), de uma maneira independente da sequência, emitindo fluorescência 1000 vezes maior do que quando não está ligado. O sinal de fluorescência aumenta à medida que mais amplicons se acumulam durante a ciclagem, o que permite o monitoramento em tempo real do aumento da concentração de amplicons (KIM, 2013).

Por conseguinte, para uma análise fiável, a amplificação por PCR não específica deve ser evitada. A especificidade de amplificação pode ser verificada por uma análise da curva de fusão que diferencia os fragmentos de DNA com base na diferença das temperaturas de fusão (T_m), em picos de fusão separados. A presença de amplicons indesejáveis pode assim ser claramente visualizada. Contudo, contrariamente aos estudos de cultura pura, a leitura da curva de fusão, está ligada apenas à especificidade de amplificação nos estudos de sistemas de culturas misturadas, em que diferentes populações microbianas,

que carregam sequências alvo variadas, são susceptíveis de existir, especialmente quando se utiliza um conjunto de iniciadores específicos de grupo que não visa uma população, mas um grupo taxonômico ou funcional. Isto novamente destaca a importância da especificidade do iniciador para quantificação confiável. Apesar de tais limitações, o *SYBR Green I* ainda é amplamente utilizado devido às suas aplicações, baixo custo, simplicidade e flexibilidade em comparação à outras opções (KIM, 2013).

6 OBJETIVOS

6.1. Objetivo Geral

Correlacionar as análises fenotípicas e moleculares de 14 genes de resistência à β -lactamases expressos em *Pseudomonas aeruginosa*.

6.2. Objetivos específicos

1. Realizar antibiograma para definir padrões fenotípicos de resistência das *P. aeruginosa*;
2. Realizar um levantamento bibliográfico de genes relacionados com a resistência fenotípica encontrada nas amostras testadas;
3. Identificar por qPCR do tipo Sybr Green, os genes de resistência às betalactamases: *bla*_{SPM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GIM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SME}, *bla*_{DHA}, *bla*_{CMY}, *bla*_{TEM};
4. Correlacionar os dados de resistência encontrados nos testes fenotípicos e moleculares;
5. Caracterizar o perfil plasmidial dos isolados de *P. aeruginosa*.

7 MÉTODOS

7.1. Metodologia

A metodologia deste estudo consistiu no isolamento de cepas bacterianas de *P. aeruginosa* com possíveis perfis de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos. Todo o material bacteriano utilizado é de repositório do Laboratório de Fenotipagem e Biologia Molecular (LAFEBIM) do Instituto de Patologia e Saúde Pública (IPTSP) – UFG, e por isso, não foi submetido ao comitê de ética em pesquisa.

7.2. Amostras Clínicas

Foram isoladas 99 amostras bacterianas da espécie *P. aeruginosa*, sendo todas as amostras de biorrepositório, oriundas de cânula de crianças traqueostomizadas - mucosas de tonsilas (89), córneas humanas (cinco) e de equipamentos respiratórios de unidades de terapia intensiva (UTIs) – (cinco).

As amostras de córneas humanas foram originárias do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO), do Hospital Hugol e do Banco de olhos da UFG e as amostras de Reanimadores Manuais, foram isoladas de uma UTI e de uma Unidade de Cuidados Intermediários (UCI), de um hospital público no Estado do Tocantins.

7.3. Ativação bacteriana

As amostras encontravam-se congeladas em caldo soja tripticaseína (TSB) suplementado com glicerol (20%). Para a ativação, elas foram descongeladas e semeadas em meios seletivos de acordo com a classificação da coloração de Gram, semeadas em ágar MacConkey. A semeadura foi realizada através da técnica de esgotamento de alça. Para a obtenção de colônias puras isoladas, as placas foram incubadas em estufa de 37°C por 24 horas sendo as placas incubadas a 37°C entre 24 a 72 horas.

Após o crescimento em meios seletivos, foi verificado se houve o isolamento de colônias. As amostras das quais se obteve colônias isoladas foram repicadas em ágar nutriente, para a obtenção em quantidade da massa de bactérias, oriundas de uma mesma unidade formadora de colônia. As placas com ágar nutriente foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

7.4. Antibiograma

O antibiograma foi realizado segundo metodologia de *Kirby e Bauer*, no qual inicialmente as bactérias semeadas em ágar nutriente foram transferidas, individualmente, com uso de alça bacteriológica, para solução salina 0,9%, e obtenção de uma suspensão compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, utilizaram-se *swabs* que foram embebidos na suspensão e semeadas na superfície de placas contendo ágar Mueller-Hinton. O *swab* foi passado em toda a superfície da placa, em três direções, seguindo angulações de 60° a cada mudança de direção.

Posteriormente, foram inseridos os discos de antibióticos utilizando-se pinças flambadas a cada disco de antibiótico manipulado. Os antibióticos utilizados seguiram os critérios estabelecidos pelo *The Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para *P. aeruginosa* e estão descritos na tabela 1. Em seguida as placas foram incubadas em estufa de 37°C, por 24 horas.

7.5. Teste fenotípico para detecção de ESBLs

O teste de para triagem de ESBLs foi realizado preparando-se inicialmente soluções para cada cada amostra, compatíveis com o grau 0,5 da escala de Mc Farland (1×10^6 UFC/mL), transferindo-se massa bacteriana para 5mL de salina 0,9%. Em seguida, placas de ágar Müller-Hinton foram semeadas em toda a superfície utilizando-se swabs embebidos nas soluções preparadas. Foi colocado no centro da placa um disco de amoxicilina com ácido clavulânico e distante 30 mm (de centro a centro) dos outros discos de beta-lactâmicos: ceftazidima (10 µg), ceftriaxona (30 µg) e aztreonam (30 µg). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 37°C durante 24 horas. O aumento do diâmetro do halo de inibição ou o aparecimento de zonas fantasma, distorção do halo ao redor do disco beta-lactâmico foram observadas após o tempo de incubação, pois indicam a presença de uma amostra produtora de ESBL.

7.6. Teste fenotípico para detecção de Carbapenemases

Um inóculo da cepa *E. coli* ATCC 25922 correspondente a 0,5 da escala de McFarland foi preparado por meio do método de crescimento ou da suspensão direta da colônia. A *E. coli* ATCC 25922 foi semeada em toda

a superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton utilizando-se swab. Em seguida, no centro da placa, foi colocado um disco de imipenem de 10 µg. Com auxílio de uma alça, foram feitas separadamente estrias de 3 amostras teste do centro do disco de beta-lactâmico até a periferia da placa de Petri, sem encostar no disco de beta-lactâmico. Da mesma maneira uma cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi semeada em estria como controle negativo, formando ao final uma cruz de estrias. As placas foram incubadas em estufa de 37°C durante 24 horas. Após o tempo de incubação, foi observado o crescimento da *E. coli* ATCC 25922 no halo de inibição do imipenem (distorção do halo de inibição). A amostra de *E. coli* ATCC 25922 é sensível ao imipenem e este crescimento só é possível quando a amostra teste produz uma enzima que foi capaz de inativar o imipenem.

7.7. Teste fenotípico para detecção de Ampicilinas

As amostras para o teste de triagem para metalo-beta-lactamases foram preparadas conforme descritas no item 4.5. No centro de cada placa um disco de cefoxitina (30 µg) foi colocado. Em seguida um disco de ceftriaxona (30 µg) foi colocado a 2 cm de distância (centro a centro) do disco de cefoxitina e um disco de ceftazidima (30 µg) também foi colocado a 2 cm do disco de cefoxitina. A amostra quando induzida por algum antibiótico beta-lactâmico normalmente produz quantidades elevadas de AmpC. É considerada produtora de AmpC, quando há formação de um achatamento do halo da ceftriaxona ou ceftazidima ou de ambos, pois a enzima produzida

irá inibir estes antibióticos, permitindo a ampliação do crescimento bacteriano.

7.8. Teste fenotípico para detecção de Metallo-beta-lactamases

As amostras para o teste de triagem para metallo-beta-lactamases foram preparadas conforme descritas no item 4.5. No centro de cada placa um disco de papel impregnado com 3 µl de uma solução de 2-ácido mercaptopropiônico (2-MPA) foi colocado. O 2-MPA é um agente quelante. Em seguida um disco de imipenem (10 µg) foi colocado a 2 cm de distância (centro a centro) do disco de 2-MPA e um disco de ceftazidima (30 µg) também foi colocado a 2 cm do disco de MPA. Em amostras produtoras de metallo-beta-lactamases, observa-se uma distorção do halo de inibição, com a ampliação da zona de inibição de crescimento da amostra bacteriana.

Tabela 1: Antimicrobianos utilizados para teste de susceptibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* conforme o CLSI(2017).

Antibióticos	Concentração µg
Aztreonam	30
Ceftazidima	30
Ciprofloxacina	5
Gentamicina	10
Imipenem	10
Piperaciclina / Tazobactam	100/10

Fonte: CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*.

Após o tempo de incubação, foi feita a leitura das placas de antibiograma, utilizando-se paquímetro como instrumentação para medir o diâmetro dos halos de inibição formados. A medida do halo de resistência foi feita em milímetros e a interpretação dos resultados foi realizada comparando-se os valores referenciais contidos no CLSI (2017).

7.9. Extração de DNA plasmidial

Para cada bactéria, foi feita a extração plasmidial segundo o manual do kit de extração FLEXIPREP da Pharmacia®, no qual foi inoculado colônias da bactéria teste contendo o plasmídeo de interesse em 5 mL de água peptonada e incubado à 37C, por 24 horas, sob agitação de 150 rpm. Uma alíquota de 1,5 mL foi centrifugada a 5.000 xg em tubos de plástico de 1,5 mL, por 30 segundos. O processo foi repetido três vezes.

O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de solução I (Tris – HCl pH 7,5-100 mM, EDTA - 10 mM, RNaseI 400/mL), homogenizado e adicionados 200 µL de solução II (NaOH – 0,2M, SDS 1%). O material foi misturado por inversão do tubo durante 5 minutos e adicionados 200 µL de solução III (acetato de sódio 3M, ácido acético 2M), homogenizado suavemente por inversão durante 5 minutos e centrifugado a 5.000 xg por 5 minutos, segundo instruções do fabricante.

O sedimento, correspondente ao DNA cromossomal foi descartado e o sobrenadante, contendo o DNA plasmidial, foi transferido para outro tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 420 µL de isopropanol e após, homogenizado no vortex e colocado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugado por 10 minutos a 5.000 xg, sendo o sobrenadante

desprezado e o precipitado deixado secar à temperatura ambiente.

O precipitado foi ressuspenso em 50 μ L de água destilada estéril, visualizado em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio e analisado por eletroforese.

7.10. Quantificação de DNA

Após execução do protocolo de extração de DNA plasmidial, as amostras foram mantidas congeladas para quantificação do material genético e demais análises. A etapa de quantificação foi realizada no aparelho Nanodrop e software compatível. A quantificação foi realizada individualmente utilizando-se água miliQ estéril como branco para uma adequada calibração entre a quantificação de cada amostra. As amostras cujas quantidades de material genético foram consideradas insuficientes tiveram sua extração repetida e requantificada pela mesma metodologia.

7.11. PCR em Tempo Real

Foram desenhados iniciadores específicos com base nas sequências depositadas no *GenBank* as quais estão descritas no quadro 5.

As reações foram preparadas utilizando-se o kit para PCR em Tempo Real do tipo *Sybr Green* (Sybr Green qPCR master mix LOW ROX – 100 reações x 25 μ L), adicionando-se o DNA e os iniciadores específicos para amplificação de cada gene. Para o controle positivo e endógeno da reação foi utilizado os iniciadores para amplificação do RNA 16S, e para o controle negativo, foi adicionado água no lugar do DNA.

As condições da técnica de PCR em Tempo Real foram padronizadas seguindo as instruções do fabricante. Os componentes foram descongelados em temperatura ambiente, posteriormente, preparar a mix de reação contendo: 2x Sybr Green Master Mix Low Rox e os oligonucleotídeos para amplificação da região alvo, descritos no quadro 5. Misturar no vórtex em seguida centrifugou rapidamente para coletar todo o volume da reação no fundo do tubo. Para manter os componentes viáveis os tubos permaneceram no gelo.

Quadro 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de resistência à β -lactâmicos deste estudo

Identificação do gene	Sequência gênica do 5' para o 3'	Temperatura de anelamento	Quantidade de bases	Acesso no GenBank	Tamanho do fragmento amplificado
<i>bla</i> OXA	Sense: GGCAGCGGGTCCCTTGTC Reverso: CGATAATGGGCTGCAGCGG	49,7 49,7	19 19	FN396876.1	171pb
<i>bla</i> IMP	Sense: CCAGCGTACGGCCACAGA Reverso: GGTGATGGCTGTTGCGGCA	49,6 50,3	19 19	NG035455.1	138pb
<i>bla</i> NDM	Sense: CGGCCGCGTGCTGGTG Reverso: GGCATAAGTCGCAATCCCCG	49,8 50,2	16 20	JN711113.1	182pb
<i>bla</i> SME	Sense:GGCGGCTGCTGTTTTAGAGAGG Reverso:TGCAGCAGAAGCCATATCACCTAAT	50,9 50,3	25 22	KJ188748.1	184pb
<i>bla</i> DHA	Sense: GCGGGCGAATTGCTGCAT Reverso: TGGGTGCCGGGTAGCG	49,8 50,1	18 17	NG041043.1	183pb
<i>bla</i> CMY	Sense: GGATTAGGCTGGGAGATGCTGAA Reverso: CCAGTGGAGCCCGTTTTATGC	50,1 49,6	23 21	NG041279.1	158pb
<i>bla</i> TEM	Sense: TCCGTGTCGCCCTTATTCCC Reverso: CCTTGAGAGTTTTCGCCCCG	49,6 49,6	20 20	KJ923009	165pb
<i>bla</i> SHV	Sense: GGCAGCGGGTCCCTTGTC Reverso: CGATAATGGGCTGCAGCGG	49,7 49,7	19 19	FN396876.1	171pb
<i>bla</i> VIM	Sense: GTTATGCCGCACCCACCCC Reverso: ACCAAACACCATCGGCAATCTG	50,3 49,7	19 22	NG036099.1	194 pb
<i>bla</i> SPM	Sense: CGAAAATGCTTGATGGGACCG Reverso: CACCCGTGCCGTCCAAATG	50,3 49,7	21 19	DQ145284.1	147pb
<i>bla</i> CTX	Sense: CTGAGCTTAGCGCGGCCG Reverso: AATGGCGGTGTTTAACGTCGG	50,1 50,0	18 21	FJ815279.1	189pb
<i>bla</i> GIM	Sense: CGGTGGTAACGGCGCAGTG Reverso: TGCCTGCTGCGTAACATCG	50,2 50,2	19 20	JX566711.1	149pb
<i>bla</i> KPC	Sense: GGCGGCTCCATCGGTGTG Reverso: GTGTCCAGCAAGCCGCCT	49,5 50,4	18 19	AF297554.1	155pb
<i>bla</i> SIM	Sense: GCACCACCGGCAAGCGC Reverso: TGTCTGGCTGGCGAACGA	50,8 50,0	17 19	EF125010.1	156pb

O protocolo de ciclagem foi padronizado nas condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; manutenção da desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento e extensão dos oligonucleotídeos a 60°C por 60 segundos; curva de *melting* a 65°C por 30 segundos.

Para o controle negativo foi utilizado uma reação nas mesmas condições citadas acima, substituindo a amostra biológica por água. Para o controle positivo foi utilizada uma amostra de DNA cromossomal, que foi amplificado com oligonucleotídeos específicos da região 16S.

7.12. Sensibilidade e reprodutibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi testada utilizando-se amostras clínicas de cultura conhecida. O limite de detecção foi avaliado pelo uso das amostras de sangue contaminado com quantidades conhecidas de bactérias carbapenemases resistentes. A reprodutibilidade foi medida com a dispersão de resultados dos ensaios em estudo, feitos em duplicatas.

7.13. Especificidade do diagnóstico

Para avaliar a especificidade do ensaio, foi utilizado agentes não alvo, como *Staphylococcus aureus* (gene *femA*), definido aleatoriamente, por ser um organismo gram-positivo, considerando que a maioria das resistências à betalactamases são advindas de bactérias gram-negativas. Se os testes não reagirem de forma cruzada, indicarão que o diagnóstico tem especificidade para amplificação das regiões alvo dos genes de interesse.

7.14. Regressão linear

Foi utilizado o Teste Exato de Fisher, um teste não-paramétrico que verifica se duas amostras independentes pertencem à mesma população. Ele foi utilizado porque os escores amostrais podem assumir valores pequenos (que é o caso das amostras) (AYRES et al., 2007).

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, dentre os 99 isolados de *P. aeruginosa*, 90% originaram de cânula de crianças traqueostomizadas, 5% de reanimadores manuais e 5% foram isolados de córneas. Ao avaliar a resistência aos antimicrobianos, 2/99 (2%) dos isolados, foram resistentes a todos os antibióticos testados neste estudo (aztreonam, ceftazidima, imipenem e piperacilina+tazobactam).

Ao avaliar o perfil de resistência dos isolados frente aos antimicrobianos da classe de β -lactâmicos, específicos para *P. aeruginosa*, acima descritos, os resultados demonstram que a maior sensibilidade antibiótica encontrada foi para piperacilina+tazobactam (95,9%) e a menor resistência encontrada foi para IMP (8,1%). Os dados estão detalhados na tabela 5 (Apêndice 1) e representados a seguir na Figura 12.

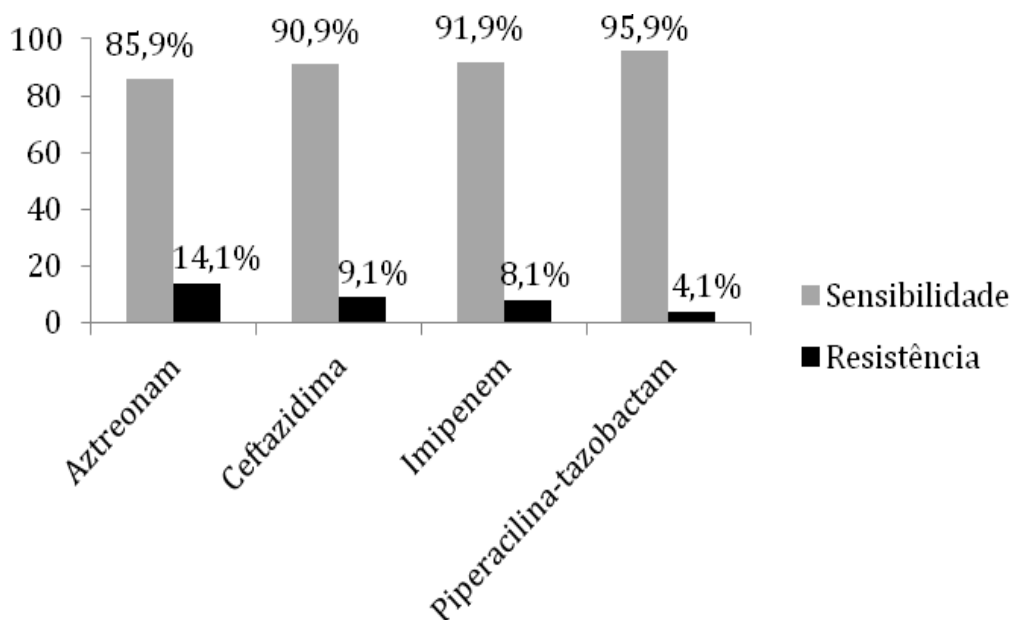


Figura 12: Porcentagem de resistência e sensibilidade das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, frente aos antimicrobianos testados.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com os encontrados em um estudo retrospectivo, que incluiu 192 pacientes diagnosticados com infecções causadas por *P. aeruginosa*, os pacientes foram internados no Hospital “Victor Babeş” Craiova, na Romênia, no período de 01 de janeiro de 2006 a 31 de dezembro de 2012. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 83,9% para aztreonam, 82,14% para *piperacilina+tazobactam* e para ceftazidima a sensibilidade foi de 73,8% (HUREZEANU et al., 2013). (MATOS et al., 2014), realizaram um estudo na UTI do hospital sentinela em Belém, Pará, no período de 2005 a 2010 e observaram valores elevados de resistência em *P. aeruginosa* à aztreonam, imipenem e *piperacilina+tazobactam*.

Um estudo foi desenvolvido em um hospital da rede privada em Goiânia GO, com capacidade para 64 leitos, sendo 11 destes destinados a Unidade de Terapia Intensiva. Os autores avaliaram 75 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados, provenientes de diversos espécimes clínicos. Foram encontrados 90,7% (68 isolados), resistentes à ceftazidima e 30,7% (23 isolados), resistentes ao aztreonam (GONÇALVES et al., 2009). Os percentuais de isolados resistentes à ceftazidima corroboram com os resultados encontrados nesta pesquisa.

Foi realizada uma análise para conferir se os isolados neste estudo apresentavam perfis de multi droga resistência e os dados obtidos revelaram positividade. De acordo com os experimentos de fenotipagem, 14/99 (14,1%) dos isolados de *P. aeruginosa* foram resistentes a ATM; simultaneamente, 6/14 (42,8%) dos mesmos isolados resistentes aos antimicrobianos aztreonam, apresentaram também resistência à CAZ, três/14 (21,4%) apresentaram resistência á IMP e 2/14 (14,8%), foram resistentes a PPT.

Outros dados demonstram que dos 99 isolados, nove (9,1%), apresentaram resistência a CAZ; simultaneamente 4/9 (44,4%), os mesmos isolados resistentes à ceftazidima, foram também resistentes à ATM, 3/9 (33,3%), foram resistentes a IMP e 2/9 (22,2%), foram resistentes à PPT.

Nesta pesquisa, também foram avaliadas as resistências para IMP e oito/99 (8,1%), das *P. aeruginosa*, apresentaram resistência; ao aprofundar as análises, notou-se que simultaneamente, três/8 (37,5%) dos isolados resistentes ao imipenem, foram também resistentes ao ATM e à CAZ e 2/8 (25%), foram resistentes à PPT.

Os testes de fenotipagem, dos 99 isolados, quatro/99 (4,1%) foram resistentes à PPT; simultaneamente, 3/4 (75%) dos isolados apresentaram resistência para ATM, 2/4 (50%), apresentaram resistência à CAZ e 2/4 (50%), foram resistentes ao IMP.

Estudo realizado na cidade de Varanasi, na Índia, demonstrou que todas as *P. aeruginosa* que produziram betalactamase, foram resistentes a múltiplos fármacos. A sensibilidade máxima (89,1%) foi observada para imipenem e uma atividade menor, quando comparada ao presente estudo, foi determinada para *piperacilina+tazobactam* (51,5%) (UPADHYAY, SEM e BHATTACHARJEE, 2010).

As análises dos resultados deste trabalho, foram observadas resistências quanto à ESBL, AmpC, CARBA e MBL, dos 99 isolados de *P. aeruginosa* e verificou-se que 82 (82,8%), apresentaram positividade para a produção de ampicilinase – AmpC e 100% dos isolados apresentaram resultados negativos para os demais testes, os dados estão explanados na tabela 2 e no apêndice 1.

Tabela 2. Dados relativos das resistências às ESBLs, testadas neste estudo para *P. aeruginosa*.

Amostras	ESBL	AmpC	Carba	MBL	Amostras	ESBL	AmpC	Carba	MBL	Amostras	ESBL	AmpC	Carba	MBL
1	-	+	-	-	34	-	+	-	-	67	-	+	-	-
2	-	+	-	-	35	-	+	-	-	68	-	+	-	-
3	-	+	-	-	36	-	+	-	-	69	-	+	-	-
4	-	+	-	-	37	-	+	-	-	70	-	+	-	-
5	-	+	-	-	38	-	+	-	-	71	-	+	-	-
6	-	+	-	-	39	-	-	-	-	72	-	+	-	-
7	-	+	-	-	40	-	-	-	-	73	-	+	-	-
8	-	+	-	-	41	-	+	-	-	74	-	+	-	-
9	-	+	-	-	42	-	+	-	-	75	-	+	-	-
10	-	+	-	-	43	-	-	-	-	76	-	-	-	-
11	-	+	-	-	44	-	+	-	-	77	-	+	-	-
12	-	+	--	-	45	-	-	-	-	78	-	+	-	-
13	-	+	-	-	46	-	+	-	-	79	-	+	-	-
14	-	+	-	-	47	-	+	-	-	80	-	+	-	-
15	-	+	-	-	48	-	+	-	-	81	-	+	-	-
16	-	-	-	-	49	-	+	-	-	82	-	-	-	-
17	-	+	-	-	50	-	+	-	-	83	-	-	-	-
18	-	+	-	-	51	-	-	-	-	84	-	+	-	-
19	-	+	-	-	52	-	-	-	-	85	-	+	-	-
20	-	-	-	-	53	-	+	-	-	86	-	+	-	-
21	-	+	-	-	54	-	-	-	-	87	-	+	-	-
22	-	+	-	-	55	-	-	-	-	88	-	+	-	-
23	-	+	-	-	56	-	+	-	-	89	-	+	-	-
24	-	+	-	-	57	-	+	-	-	90	-	+	-	-
25	-	+	-	-	58	-	+	-	-	91	-	+	-	-
26	-	+	-	-	59	-	+	-	-	92	-	+	-	-
27	-	+	-	-	60	-	+	-	-	93	-	+	-	-
28	-	+	-	-	61	-	+	-	-	94	-	+	-	-
29	-	+	-	-	62	-	-	-	-	95	-	-	-	-
30	-	+	-	-	63	-	+	-	-	96	-	-	-	-
31	-	+	-	-	64	-	+	-	-	97	-	+	-	-
32	-	+	-	-	65	-	+	-	-	98	-	-	-	-
33	-	+	-	-	66	-	+	-	-	99	-	+	-	-

Extended *Spectrum* betalactamases (ESβL); Metalo betalactamases (MβL); Ampicilinase (AmpC). Carbapenemase (CARBA).

Em um estudo desenvolvido em Goiânia, dentre os pacientes que apresentaram *Pseudomonas spp.*, 100% foram positivos para produção de AmpC (LIMA et al., 2015). Os dados dos autores colaboram para sustentar que

os isolados de *P. aeruginosa*, têm adquirido o gene com capacidade na produção das ampicilinases.

Foi realizado um levantamento bibliográfico para determinar quais as resistências fenotípicas encontradas neste estudo, que possuem genes descritos na literatura, codificantes da enzima betalactamase. O resultado do levantamento literário está demonstrado na tabela 3.

Tabela 3: Levantamento bibliográfico referente às resistências fenotípicas das betalactamases frente aos genes de resistência correspondentes.

Antimicrobianos	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{SME}	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{GIM}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SIM}
Aztreonam	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Ceftazidima	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Imipenem	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Piperaciclina + Tazobactam	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Legenda: O sinal positivo (+) implica na descrição prévia da literatura do gene em questão, bem como a relação com o respectivo antimicrobiano, enquanto o sinal negativo (-) indica que tal relação não foi encontrada na literatura.

A tabela 3 foi resultado de um levantamento bibliográfico de artigos realizados em diferentes países (Europa, Japão, Iram, Coréia e Brasil), caracterizando os possíveis genes que codificam resistência para os antimicrobianos utilizados em *P. aeruginosa* (JACOBY et al., 2005; LEE et al., 2005; WALSH., et al., 2005; PICOLI, 2008; DOGONCHIA et al., 2017).

Foi Identificada uma publicação advinda da França, onde os pesquisadores encontraram bactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL) (SHV, TEM e CTX-M) e carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP e NDM-1). Eles avaliaram 25 isolados de *P. aeruginosa*; destes 7 (28%) isolados, expressaram o gene *blaSHV*, 7(28%) isolados, expressaram o gene *blaTEM* (LÓPEZ-CAUSAPÉ et al., 2017).

Para sedimentação científica e construção da tabela 3, um outro estudo observacional prospectivo, realizado no Laboratório de Microbiologia do HC-UFGO, detectou pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa*, no período de maio de 2009 a dezembro de 2012 e por teste fenotípico, foi encontrado uma taxa de produção da enzima MBL de 21,4% (N= 12), dos quais 9 (75,0%) amostras, amplificaram os genes codificantes para MBL; dentre os genes amplificados encontrou 6 do tipo *blaSPM* (66,7%), 2 do tipo *blaVIM* (33,3%) e um isolado contendo *blaIMP* (CRISTINA e DANTAS, 2015).

Finalizando o levantamento para construção da tabela 3, um estudo desenvolvido em um hospital da rede privada localizado no município de Goiânia (GO), em parceria com o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. O gene *blaSPM* foi detectado em 26 (74,3%) dos 35 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentaram fenótipo positivo (GONÇALVES et al., 2009).

A partir dos resultados obtidos nos testes clássicos de fenotipagem, foram realizados experimentos de qPCR, utilizando a variante Sybr Green, para amplificação de genes plasmidiais, que codificam resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos. Os resultados da amplificação demonstraram que houve positividade para 12 (87,7%), dos 14 genes β -lactâmicos analisados neste trabalho. Foi utilizado o Teste Exato de Fisher, (teste não-paramétrico), para verificar a correlação estatística e a especificidade dos testes aplicados neste estudo, levando em consideração os resultados encontrados no antibiograma com os obtidos nas reações de qPCR. A correlação dos resultados fenotípicos e genotípicos estão na tabela 4.

Tabela 4: Correlação entre as resistências fenotípica e genotípica dos 99 isolados de *P. aeruginosa*.

Anti-microbiano	Isolados resistentes (N/99)	Isolados que amplificaram	Teste Exato de Fisher p para isolados	Genes β -lactâmicos	Multidroga resistente	Teste Exato de Fisher p para a resistência	Número de plasmídeo	Perfil plasmidial
ATM	14(14,1%)	3/14(21,4%)	0.69	blaSME	3/14(21,4%)	0.69	4	1,5 Kb
				bla OXA			4	2,5 Kb
				blaGIM			14	> 10 Kb
CAZ	9 (9,1%)	2/9 (22,2%)	0.23	blaKPC	2/9(22,2%)	0.23	2	1,5 Kb
				blaCTX-M			2	2,5 Kb
				blaVIM			8	> 10 Kb
				blaTEM				
IMP	8 (8,1%)	1/8 (12,5%)	0.98	blaSPM	2/8(25%)	0.16	1	1,5 Kb
				blaGIM			1	2,5 Kb
				blaOXA			6	> 10 Kb
PPT	4 (4,1%)	1/4 (25%)	0.18	blaDNM	2/4(50%)	<u>0.02</u>	3	> 10 Kb
				blaSME				
				blaVIM				
				blaTEM				
				blaSPM				

Neste estudo, das 99 amostras, foram identificadas 14 fenotipicamente resistentes ao antimicrobiano ATM. Ao analisar a presença dos genes que conferem resistência aos β -lactâmicos, dessas 14 amostras, em três (21,4%), foram encontrados simultaneamente os genes *blaSME*, *blaOXA*, *blaGIM*, outros genes foram isoladamente amplificados: *blaKPC*, *blaKPC*, *blaCTX-M*, *blaVIM*, *blaTEM* e *blaSPM*. Segundo o teste estatístico, ao avaliar os resultados de amplificação obtidos para o PPT, o método molecular foi mais sensível para detecção do gene que codifica a multidroga resistência, apresentando valores de ($p < 0,05$). Esta informação sugere que a pesquisa do gene é mais sensível e específica, em comparação com o antibiograma.

Gasparetto et al., (2007), realizaram um estudo em três hospitais universitários de Porto Alegre RS e encontraram em dois hospitais os genes *blaVIM* e *blaIMP*. Para o gene *blaVIM*, os isolados do hospital A apresentaram 67% de positividade gênica nas amostras de *P. aeruginosa* e no hospital B, 35,71% de positividade. O gene *blaIMP* apresentou 8,33% de positividade nos isolados do hospital A e 21,43% de positividade nos isolados do hospital B (MARCHIARO et al., 2005). Nota-se que houve uma divergência de percentuais encontrados nos isolados do estudo realizado em Porto alegre - RS, quando comparado com os isolados desta pesquisa. Essa diferença pode ser justificada pela distribuição heterogênea dos genes de resistência, de acordo com a regionalização.

Um estudo realizado por brasileiros publicaram que o gene codificante para a enzima SPM-1, descrita pela primeira vez por Tolleman et al., (2002), foi o mais prevalente em *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e produtoras fenotipicamente de MBL. O gene foi encontrado em percentuais superiores a

50% dos isolados, considerando as diferentes regiões geográficas (GONÇALVES et al., 2009; GALETTI, 2010). Entretanto, os genes *blaVIM* e *blaIMP*, que codificam resistência para as MβLs, também já foram identificados em isolados de *P. aeruginosa* (SADER et al., 2005; FRANCO et al., 2010; XAVIER et al., 2010).

No estudo de Zavascki e colaboradores (2006), foi demonstrado que a presença de *P. aeruginosa*, produtora de MBL, aumentou o risco na aplicação de terapia antimicrobiana inadequada, com consequente aumento da mortalidade dos pacientes acometidos. Este aspecto não foi avaliado no presente estudo, mas foi detectada uma porcentagem relativamente alta (9/12; 75%), de genes codificantes para MBL, entre os isolados fenotipicamente positivos.

No ano de 2005, um estudo de coorte, realizado no Hospital das Clínicas da UFU/MG, revelou uma importante mudança na epidemiologia gênica de isolados de *P. aeruginosa*, no qual foram encontrados apenas isolados que apresentaram o gene *blaSPM-1* (CEZÁRIO et al., 2009). A partir de 2011, foi relatada a disseminação de isolados produtores de MBL, com plasmídeos que contêm o gene *blaVIM* (CRISTINA e DANTAS, 2015).

Na Índia, foram isoladas 61 amostras de *P. aeruginosa* e destes isolados, em 34 amplificaram o gene *blaVIM* e em dois amplificaram o gene *blaIMP* (AMUDHAN et al., 2012). Foi desenvolvido um estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa*, em Uberlândia/MG, os genes *blaVIM*, *blaSPM* e *blaIMP* apresentaram perfis de resistência a vários β-lactâmicos (CRISTINA e DANTAS, 2015). De acordo com

(CHAKRABORTY, BASU e DAS, 2010) ao caracterizar o genótipo da *P. aeruginosa*, encontraram os gene *bla*CTX-M.

Segundo Rizek et al (2014), o gene KPC em *P. aeruginosa*, deveria ser diagnosticado por meio de técnica de PCR. Para avaliar a resistência ao carbapenem, os pesquisadores demonstram que esse agente etiológico pode abrigar mais de um gene de carbapenemase. A atenção deve ser focada na disseminação rápida de KPC e no fato de *P. aeruginosa* ser um reservatório desse mecanismo de resistência transmissível.

As pesquisas, foram identificados nove isolados com resistência fenotípica ao antimicrobiano CAZ. Dessas, 2/9 (22,2%), amplificaram-se simultaneamente os genes *bla*GIM, *bla*SME, *bla*OXA, *bla*SIM, *bla*CTX-M e *bla*NDM.

Três isolados resistentes aos antimicrobianos ATM, IMP e CAZ, amplificaram simultaneamente os genes *bla*SME e *bla*OXA. Foram analisadas também oito amostras (12,5%) resistentes a IMP, ao realizar a pesquisa dos genes de resistência aos β -lactâmicos, em um dos isolados foram amplificados os genes *bla*SME, *bla*OXA e *bla*GIM. Por outro lado, foram encontrados quatro isolados resistentes à PPT e em um deles (25%), foram amplificados os genes *bla*SME, *bla*VIM, *bla*TEM e *bla*SPM.

Dando suporte a presente pesquisa e sugerindo que os genes de resistência podem disseminar para diferentes continentes, relata-se que um estudo usando 892 isolados de *P. aeruginosa* coletados entre janeiro de 2009 a dezembro de 2012, no Hospital Memorial de Mackay - Taiwan, identificou que 90/892 isolados de *P. aeruginosa*, foram rastreados para os genes

carbapenêmicos; destes, 21/90 (23,33%), foram positivos para genes ESBL: *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX, *bla*OXA (LIU et al., 2017).

Das 99 amostras deste estudo, 64%, não apresentaram resistência fenotípica a nenhum dos 14 β -lactâmicos testados. Entretanto, 2/64 (3,1%) das amostras, amplificaram os genes *bla*SME, *bla*CTX-M, *bla*CMY, *bla*SPM, *bla*NDM, *bla*DHA, *bla*TEM. Essa informação mostra que se faz necessário investigar a expressão gênica, para determinar a sensibilidade e a eficiência de cada uma das duas técnicas envolvidas nessa pesquisa.

A partir da década de 1980, as técnicas moleculares, como a PCR, começaram a ser utilizadas como métodos alternativos aos métodos fenotípicos tradicionais, utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas, devido à sua alta sensibilidade e especificidade (HOFMANN, GRIOT e CHAIGNAT et al., 2008). Em função desse diferencial, a PCR é recomendada e prescrita pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como método diagnóstico para várias doenças infecciosas, inclusive para trânsito internacional (OIE, 2015).

A técnica de PCR permite identificar patógenos altamente zoonóticos, direto de tecidos, tornando o diagnóstico mais rápido e seguro ao laboratorista (ARAÚJO et al., 2014; GWIDA et al., 2016). Assim como tornou mais fácil e confiável o diagnóstico de doenças causadas por micro-organismos fastidiosos (HUM et al., 1997; BUIM et al., 2009).

Sete 7/14 (50%) dos isolados resistentes a ATM apresentaram positividade para a produção de AmpC; destes, 2/7 (28,5%) isolados abrigaram simultaneamente o gene *bla*SME. Um dos isolados apresentou separadamente os genes *bla*OXA, *bla*KPC, *bla*CTX-M e o outro isolado apresentou os genes

blaVIM, *blaTEM*, *blaSPM*. Dentre as amostras que apresentaram positividade para a produção de AmpC, 7/82 (8,5%) foram resistentes a ATM.

Cinquenta e cinco por cento (5/9), dos isolados resistentes a CAZ, apresentaram positividade para a produção de AmpC. Destas, 1/5 (20%) dos isolados, abrigaram os genes *blaSME*, *blaOXA*, *blaSIM*, *blaCTX-M* e *blaNDM*. Se avaliarmos este dado para o total das 99 amostras do estudo, 82 apresentaram produção de AmpC, dessa forma, foi identificado 5/82 (6,1%) resistentes simultaneamente á CAZ e á AmpC.

Três 3/8 (37,5%) dos isolados resistentes a IMP, produziram AmpC. Se considerarmos que o estudo iniciou com 99 amostras e que 82 delas foram resistentes às AmpC, avalia-se que há uma correspondência de 3/82 (3,6%), de amostras positivas para AmpC, entretanto, não foram encontrados genes que conferem resistência aos β -lactâmicos.

Dois 2/4 (50%), dos isolados resistentes a PPT produziram AmpC; destes, um 1/2 (50%), dos isolados amplificaram os genes *blaSME*, *blaVIM*, *blaTEM* e *blaSPM*. Ao considerar todas as amostras, 2/82 (2,4%), foram simultaneamente produtoras de AmpC e resistentes a PPT.

Estudo demonstra que todas as *P. aeruginosa* que produziram betalactamase AmpC positivas, foram resistentes a múltiplos fármacos. A sensibilidade máxima foi de 89,1%, observada para imipenem, seguido de 51,5%, para *piperacilina+tazobactam* (UPADHYAY, SEM e BHATTACHARJEE, 2010).

Foi realizada uma caracterização quanto ao número, peso molecular e presença de múltiplos plasmídeos, nos 35 isolados que apresentaram perfil de resistência. De acordo com as observações, encontrou-se plasmídeos > 10 Kb

em 14/14 isolados resistentes para ATM; em 8/9 resistentes a CAZ; em 6/8 resistentes a IMP; em 3/4 resistentes a PPT. Neste estudo, ficou esclarecido que a maioria dos isolados continham plasmídeos > 10 Kb. Foram também encontrados múltiplos plasmídeos em isolados resistentes a ATM (4/14), CAZ (2/9) e IMP (1/8). Dessa forma, se for considerado os pesos moleculares e a presença de múltiplos plasmídeos, com perfis diferentes, tais isolados tem maior chance de conter múltiplos genes de resistência, o que pode justificar a presença de MDR em algumas amostras.

De acordo com Cabral et al., (2012), a presença de MDR está usualmente localizada em plasmídeos que possuem capacidade de transferência para vários genes de resistência. Esta citação, colabora no presente estudo, ao considerarmos que há amostras de *P. aeruginosa*, isoladas de diferentes espécimes clínicas, nas quais foram encontrados perfis plasmidiais semelhantes.

9 CONCLUSÕES

- O estudo de resistência para *P. aeruginosa*, demonstrou que dentre as 99 isolados envolvidos na pesquisa, a maior resistência foi para o ATM (14,1%) e a menor resistência foi para PPT (4,1%).
- A maior sensibilidade antibiótica encontrada foi para *piperacilina+tazobactam* (95,9%) e a menor resistência encontrada foi para IMP (8,1%).
- 2,1% dos isolados, foram resistentes a todos os antibióticos testados (aztreonam, ceftazidima, imipinem e piperacilina+tazobactam).
- O percentual de MDR foi de 9,1%, sendo 5,05% representadas por crianças traquiostomizadas e 4,05% por isolados de RM.
- O percentual de bactérias produtoras de ESBL foi 0% uma vez que, o teste foi negativo para todos os isolados.
- 82,8% isolados apresentaram positividade para a produção de ampicilinase – AmpC.
- 100% dos isolados apresentaram resultados negativos para os demais testes MBL e carbapenemase.
- 50% dos isolados resistentes à ATM deram positivo para produção de AmpC e dois destes isolados abrigavam o gene *blaSME*.
- 55% dos isolados resistentes à CAZ e produtores de AmpC, 21,1% destes abrigaram os genes *blaSME*, *blaOXA*, *blaSIM*, *blaCTX-M* e *blaNDM*.
- 37,5% dos isolados resistentes à IMP e produtores de AmpC, não abrigaram genes que codificam resistência para os β-lactâmicos.

- Apenas 25% dos isolados que foram resistentes a PPT e produtores de AmpC, amplificou para os genes *blaSME*, *blaVIM*, *blaTEM* e *blaSPM*.
- 58% dos genes amplificados no qPCR (*blaSME*, *blaTEM*, *blaSPM*, *blaDHA*, *blaNDM*, *blaCMY*, *blaCTX-M*), não haviam sido detectados na fenotipagem, denotando a especificidade do método molecular em comparação à clássica metodologia fenotípica.
- O método molecular foi mais sensível para detecção do gene que codifica a multidroga resistência, apresentando valores de ($p < 0,05$). Esta informação sugere que a pesquisa do gene é mais sensível e específica, em comparação com o antibiograma.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEDEKERK, S. *et al.* Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microb**, v. 148, n. 8, p. 2371-81, 2002,
- AESCHLIMANN, J. R. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Pharmac**, v. 23, n. 7, p. 916-24, 2003,
- AL NAIEMI, N., DUIM, B., AND BART, A. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. **J. Med. Microbiol.** v. 55, p.1607–1608, 2006.
- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Sci.*, v.289, n.36, p.321-331, 1980.
- ANAB, F. *et al.* Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infections. **S. Plus**, v. 1, p. 2–5, 2012.
- ANVISA.Nota Técnica Nº 01/2013: Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multiresistentes,2013.
- ARAKAWA, Y. *et al.* Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 40-3, 2000.
- ASKOURA, M.; MOTTAWEA, W.; ABUJAMEL, T.; TAHER, I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **L. J. of Med**, v.13, n.6, 2011.

AYALA AT, ACUÑA HMB, CALVO MTA, MORALES JLV, CHACÓN EC. Emergencia de α -lactamasa *AmpC* plasmídica del grupo CMY-2 en *Shigella sonnei* y *Salmonella spp.* en Costa Rica, 2003-2015. **Rev Panam Salud Publica** v.40, n.1, p.70–75, 2016.

BARBOSA, L. A.; LATINI, R. O. Resistência bacteriana decorrente do uso abusivo de antibióticos : Informações relevantes para elaboração de programas educativos voltados para profissionais da saúde e para a comunidade . Ricardo Oliveira Latini². **Conf de estudos Izabela Hendrix**, v. 1, p. 0–11, 2014.

BENNETT, P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **Brit. J. of Pharmacol**, v.153, p.347-357, 2008.

BENZ R, HANCOCK RE. Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes. **Biochim Biophys Acta**, n. 646, p. 298–308, 1981.

BIALVAEI, A. Z., KAFIL, H. S., ASGHARZADEH, M., YOUSEF MEMAR, M., & YOUSEFI, M. Current methods for the identification of carbapenemases. **J of Chemotherapy**, v. 28, n.1, p.1–19. 2016.

BRASIL, A. N. DE V. S. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde e Resistência Microbiana. 2017.

BRASIL. Antibióticos. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo: São Paulo, 2011.

BRAYNER, Prevalence of the blaSHV Gene in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained from Hospital and Community Infections a Prevalence of the bla SHV Gene in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained from Hospital and Community Infections. n.11, 2016.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β lactamases. **Antimicrob Agents and chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents and Chemother**, Washington, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, Jun 2009.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri [documento na internet]. Atlanta, 2013. [Acesso em 25 jun 2018]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>>.

CHAKRABORTY, D.; BASU, S.; DAS, S. A Study on Infections Caused By Metallo Beta Lactamase Producing Gram Negative Bacteria in Intensive Care Unit Patients. **Am. J. Infect. Dis.**, v. 6, n. 2, p. 34–39, 2010.

CRISTINA R; DANTAS C. Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em Pseudomonas aeruginosa isoladas de sangue : produção de β -lactamases , perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carba. 2015. 110f. Tese de doutorado, **programa de pós graduação em imunologia e parasitologia aplicadas**. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2015.

DANIS-WLODARCZYK, K., VANDENHEUVEL, D., JANG, H. BIN, BRIERS, Y., OLSZAK, T., ARABSKI, M., ... DRULIS-KAWA, Z. A proposed integrated

approach for the preclinical evaluation of phage therapy in *Pseudomonas* infections. **Sc reports**, v. 6, p.28115, 2016.

DAVIES, R. B., AND E. P. ABRAHAM. Metal cofactor requirements of β -lactamase II. **Biochem. J.** v.143, p.129–135, 1974.

DELIBERALI, B. et al. Prevalência de bacilos Gram-negativos não fermentadores de pacientes internados em Porto Alegre-RS. p. 529–534, 2011.

DIAS, D. J. A. Estudo dos Principais Mecanismos de Resistência aos Antibióticos beta-lactâmicos em Bactérias Patogênicas de Gram negativo. **Dep. De Ciências Da Vida**, v. Mestrado, 2009.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2008; Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.1 (updated 27 April, 2010; last accessed 29 October, 2010).

FALAGAS, M E; KASIAKOU, S K. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clin. Infect. Dis.** V. 40, p. 1333- 41, 2005.

FERREIRA, A. P.; MATILLA, F.; CARNEIRO, C. Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. **Rev Pan Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 53–58, 2011.

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

GELLATLY, S. L., & HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **P and Dis**, v.67, n.3, p. 159–173. 2013.

GONÇALVES, D. C. P. S. et al. Detecção de metalo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Goiânia, Estado de Goiás. **Ver. da Soc. Bras. de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 411–414, 2009.

GEORGOPAPADAKOU, N., ET AL. Binding of monobactams to penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: relation to antibacterial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 23, pp. 98-104, 1983.

GRIGORENKO, V. G. et al. Study of Catalytic Properties of Recombinant β Lactamases TEM 1 and TEM 171 of the Molecular Class A. v. 70, n. 6, p. 268–269, 2015.

GUARDABASSI, L., SCHWARZ, S. & LLOYD, H. D. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J. of Antil Chemotherapy**, v. 54, p. 321–332, 2004.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectiva para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos agentes. **Quím. Nova**. v.33, n. 3, p.667 – 679, 2010.

HALL BG, BARLOW M. Revised Ambler classification of β -lactamases. **J Antimicrob Chemother**.v. 55, n. 6, p. 1050-1, 2005.

HARBOTTLE, H., et al. Genetics of antimicrobial resistance. **Anim Biotechnol**. n.17, p.111-124, 2006.

HEGGENDORNN LH, GOMES SWC, SILVA NA, VARGES RG, PÓVOA HCC. Epidemiological profile and antimicrobial susceptibility of microorganisms

isolated from nosocomial infections. **Rev Saúde e Meio Amb**, v.2, n.1, p. 25-48, 2016.

HIDRON AI, EDWARDS JR, PATEL J ET AL. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.29, p. 996–1011, 2008.

HUREZEANU, D. D. et al. Infections with *Pseudomonas aeruginosa* in patients admitted to the “ Victor Babe ş ” C. Hosp. of Infectious Diseases and **Pneumology** , Craiova. v. 13, n.1, p. 1–2, 2013.

KARAIKOS, I.; GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. **Exp Opinion on Pharmacother**, v. 15, n. 10, p. 1351-1370, 2014.

KITCHEL, B., J. K. RASHEED, J. B. PATEL, A. SRINIVASAN, S. NAVON-VENEZIA, Y. CARMELI, A. BROLUND, AND C. G. GISKE. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrob. Agents Chemother**. v.53, p. 3365–3370, 2009.

KÖHLER, T. et al. Differential selection of multidrug efflux system by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 11, p. 2540-3, 1997. KRALIK, P., & RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **F in Microbiol**, v. 8, p. 1–9. 2017.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; ALAM, M.; QUALE, J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. **J. Antimicrob. Chemother**, v.55 n., p.954-957, 2005.

LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H. B.; KIM, Y. A .;YONG, D. AND YUM, J. H. Modified Hodge and EDTA-disc synergy tests to screen metallo- β -lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **C. Microbiol and Infect**, v. 7, n. 2, p. 88-91, 2001.

LEE, K.; YONG, D.; YUM, J.H.; LIM, Y.S.; BOLMSTRÖM, A.; QWÄRNSTRÖM, A.; KARLSSON, A.; CHONG, Y. Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.2, p.942-944, 2005.

LIMA, V. N. et al. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microb Pathogenesis**, v. 99, n. August, p. 56–61, 2016.

LINCOPAN, N.; McCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V.C.; GALES, A.C.; MAMIZUKA, E.M. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.1, p.516-519, 2005.

LIU, C. P. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying the blaOXA-142 extended-spectrum β -lactamase gene in Taiwan. **J. of Microb, Immunology and Infection**, v. n. 1, p. 68–74, 2017.

LIVERMORE DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clin Infect Dis** v. 34, p. 634–640, 2002.

LÓPEZ-CAUSAPÉ, C. et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. **Scient Reports**, v. 7, n. 1, p. 5555, 2017.

LU, S. et al. Genomic and proteomic analyses of the terminally redundant genome of the *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP1: establishment of genus PaP1-like phages. v. 8, p. 62933, 2013.

LUZZARO, F.; DOCQUIER, J.D.; COLINON, C.; ENDIMIANI, A.; LOMBARDI, G.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.M.; TONIOLO, A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.2, p.648-650, 2004.

Magiorakos, A. P. A. Srinivasan , R. B. Carey , Y. Carmeli , M. E. Falagas, C. G. Giske , S. Harbarth⁷ , J. F. Hindler , G. Kahlmeter , B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens , A. Vatopoulos, J. T. Weber and D. L. Monnet. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect. Review**, 2011.

MANDELL, L. et al. *Helicobacter felis* , and *Helicobacter hepaticus* Bacteria Activate Innate Immunity via Toll-Like Receptor 2 but Not Toll-Like Receptor 4
Helicobacter hepaticus Bacteria Activate Innate Immunity via Toll-Like Receptor 2 but Not Toll-Like Receptor 4. **Infec and immunity**, v. 72, n. 11, p. 6446–6454, 2004.

MARCHIARO P; MUSSI MA; BALLERINI V; PASTERAN F; VIALE AM; VILA AJ; LIMANSKY AS. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of

metallo- β - lactamases in nonfermentative Gram-negative bacteria. **J Clinical Microbiol**, v.43, n.11, p.5648-5652, 2005.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZA L, GONZÁLEZ-LÓPEZC JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. **Enferm Infec Microbiol Clin**. v.32 n. 4, p. 4-9, 2014.

MASUDA, N.; OHYA, S. Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 9, p. 1847-51, 1992.

MATOS, E. C. O. DE et al. Prevalência de agentes microbianos e sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev P. de Med**, v. 28, n. 2, p. 35–43, 2014.

MELO, V. V.; DUARTE, I. D. P.; SOARES, A. Q. Guia Antimicrobianos. **Coord de Farmácia - H C da Universidade Federal de Goiás (HC - UFG)**, v. 1, p. 57, 2012.

MENDES, R. E. et al. First isolation of *bla*_{VIM-2} in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1433-4, 2004.

MENDES, R. E. et al. Integron Carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-16} and a Fused form of aminoglycoside resistant gene *aac*(6')-30/*aac*(6')-1b': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 12, p. 4693-702, 2004.

MIMA, T. *et al.* Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Immunol**, v. 49, n. 11, p. 999-1002, 2005.

MIMA, T. *et al.* Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. **J Bacteriol**, v. 189, n. 21, p. 7600-9, 2007.

MINE, T. *et al.* Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 415-7, 1999.

MIRSALEHIAN A., M. FEIZABADI, F. A. NAKHJAVANI, F. JABALAMELI, H. GOLI, AND N. KALANTARI. "Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients," **Burns**, v. 36, n. 1, p. 70–74, 2010.

MOREIRA, C. & MENDES, D. *Universidade de Évora – Laboratório de Biologia Molecular: Vectores de Clonagem*, 1998. Acessado em Nov. 24, 2018, disponível em: <http://materiais.dbio.uevora.pt/LBM/Foco/Vectores/vectores.html>

MURPHY, T. A. *et al.* Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 provides insights into variable zinc affinity of metallo- β -lactamases. **J. of Molecular Biology**, v. 357, n. 3, p. 890-903, 2006.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PEALLER, M. *Medical Microbiology*. 5 ed. **Elsevier Mosby**, USA, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S. & PFALLER, M.A. *Microbiologia Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 467-470, 1998.

NAJAFI K, KAFIL HS, SHOKRIAN S, AZIMI S, ASGHARZADEH M, YOUSEFI M, AGHAZADEH M. Virulence Genes and Antibiotic Resistance Profile of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Northwest of Iran. **J Pure Appl Microbiol**. n. 9, p. 383–389, 2015.

- NEU, H.C. The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 257,1064–1073, 1992.
- NEVES, P. R. Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem. 2010. Tese (Doutoramento) – **Fac de Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo.
- Nielsen JB, Skov MN, Jørgensen RL, Heltberg O, Hansen DS, et al. Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. **European J of Clinical Micro & Infect Dis**. v. 6, p. 773–778, 2011.
- NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **J Biol Chem**, v. 269, n. 6, p. 3905-8, 1994.
- NIKAIDO, H.; PAGES, J.M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 2, p. 340- 363, 2012.
- NORDMANN P, POIREL L, WALSH TR, LIVERMORE DM. The emerging NDM carbapenemases. **Trends Microbiol** . v. 19, n.12, p.588-95, 2011.
- NORDMANN P. AND L. POIREL, “Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes,” **Clin Microbiol and Infection**, v. 8, n. 6, p. 321–331, 2002.
- OCHS MM, MCCUSKER MP, BAINS M, HANCOCK RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. **Antimicrob Agents Chemother**, n. 43, p. 1085–90, 1999.
- OH, E. J. *et al.* Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and

comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. **J Microbiol Methods**, v. 54, n. 3, p. 411-8, 2003.

OLIVEIRA GUIMARÃES, D. et al. Universidade de São Paulo antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

OLIVEIRA, A.C.; PAULA A.O.; IQUIAPAZA, R.A.; LACERDA, A.C.S. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. **Rev Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 3, p. 89-86, 2012.

OPLUSTIL, C.P. et al., Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 2ª. Ed., São Paulo, Sarvier, 2004.

OSANO, E. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 1, p. 71-8, 1994.

PAGÈS, J. M. *et al.* The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 12, p. 893-903, 2008.

PALLERONI, N. J., KUNISAWA, R., CONTOPOULOU, R. & DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **Int J Syst Bacteriol** v. 23, p. 333–339. 1973.

PARK, H., LEE S.H., KIM, KIM, J.H & LIM, H.S. Polychlorinated biphenyl congeners in soils and lichens from King George Island, South Shetland Islands, Antarctica. **Ant Science**, v.22, p31-38, 2009.

PATERSON D.L., HUJER K.M., HUJER A.M., YEISER B., BONOMO M.D., RICE L.B. & BONOMO R.A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and

widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. **Antimic Agents and Chemotherapy** n.47, p. 3554-3560, 2003.

PATERSON, D. L., AND BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol.** n.18, p.657–686, 2005.

PEARSON, J. P. *et al.* Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **J Bacteriol**, v. 181, n. 4, p. 1203-10, 1999.

PEREIRA, G. J. S. Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos, v. 42, p.175–180, 2010.

PEREZ, F.; HUJER, A. M.; HUJER, K. M.; DECKER, B. K.; RATHER, P. N.; BONOMO, R. A. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimic Agents Chemotherapy**, v.51, p. 3471–3484, 2007.

PÉRICHON, D. & COURVALIN, P. Antibiotic Resistance. In M. Schaechter (Ed.), **Enc. of Microbiology** (3rd ed.). (pp. 193-204), 2009.

PFEIFER Y, CULLIK A, WITTE W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram- negative bacterial pathogens. **Int J Med Microbiol.**n.300, p. 371-9, 2010.

PFEIFER, Y. *et al.* Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 6, p. 371-379, 2010.

PICÃO, R. C. *et al.* Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimic Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3908–3913, 2009.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 382-402, 2006.

PITOUT, J.D., SANDERS, C.C. & SANDERS, W. E. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. **The American J of Med**, 103(1),51-59, 1997.

POIREL L., M. MAGALHAES, M. LOPES, AND P. NORDMANN, “Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla (SPM-1) surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil,” **Ant Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1406–1409, 2004.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MENDEL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R.; editors. Principles and practice of infectious disease. **4 ed. New York: C Liv stones**, p. 1980-1995, 2003.

POOLE, K. *et al.* Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **J Bacteriol**, v. 175, n. 22, p. 7363-72, 1993.

POOLE, K. *et al.* Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**, v. 21, n. 4, p. 713-24, 1996a.

QUILES, M. G. *et al.* Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Braz J of Med and Biol Research**, v. 48, n. 2, p. 174–177, 2015.

QUINTEIRA, S.; PEIXE, L. Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- β - lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: An ongoing dispersion process? **Ap and Envirom Microbiol**v. 72, n. 5, p. 3743–3745, 2006.

RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 263-74, 2010.

RIENGKAUYKIAT, J. et al. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 2, p. 565-70, 2005.

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

SAFDAR, N. et al. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A metaanalysis. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 8, p. 519-27, 2004.

SAIER JR, M. H. et al. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. **FASEB J**, v. 12, n. 3, p. 265-74, 1998.

SALABI E, A.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R. Novel subclasse of a group B1 metallo-beta-lactamase, TMB-1, in clinical and non-clinical Gram-negative bacteria from Libya. **49th Inter Confer in Antimicrob Agents and Chemoter (ICAAC)**. San Francisco, CA, USA. Set 12-15, Poster C1-1365, 2009.

SANTOS, MILENA DANDA VASCONCELOS. Tipagem molecular de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* por meio de análise de múltiplos locos VNTR (MLVA), 2013.

SEKIGUCHI, J. I. et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-{beta}-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 11, p. 4194 -7, 2008.

SENDA, K.; ARAKAWA, Y.; NAKASHIMA, K.; ITO, H.; ICHIYAMA, S.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; OHTA, M. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -

lactams, including carbapenems. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.40, n.2, p.349-353, 1996a.

SERRATIA, G.--PRODUCING et al. crossm Protracted Regional Dissemination of. v. 61, n. 3, p. 1–12, 2017.

SHANTHI AMUDHAN, M. et al. blaIMP and blaVIM mediated carbapenem resistance in pseudomonas and acinetobacter species in India. Journal of Infection Program. **Braz J Infect Dis**, v. 5, n. 4, p. 200-14, 2001.

SORENSEN, S. J.; BAILEY, M.; HANSEN, L. H.; KROER, N.; WUERTZ, S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. **N Reviews Microb**, v. 3, p. 700–710, 2005.

SOUSA, A. F. L. DE; OLIVEIRA, L. B.; MOURA, M. E. B. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares causadas por procedimentos invasivos em unidade de terapia intensiva. **Rev Preven de Infec e Saúde (REPIS)**, v. 2, p. 11–17, 2016.

SPRINGMAN S.M., K IENZLER P., C ASINI F., A SKARINEJAD A. Landslide riggering experiment in a steep forested slope in Switzerland . **17th Inter Confer of Soil Mechanics and Geotech Engineer**, Alexandria, Egypt, p. 1698-1701, 2009.

STUDEMEISTER AE, QUINN JP. Selective imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa associated with diminished outer membrane permeability. **Antimicrob Agents Chemother** n. 32, p.1267–8, 1988.

STURENBURG, E.; MACK, D.; Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J Infect**, v. 47, n. 4, p. 273-95, 2003.

- SUELEN BALERO DE PAULA; M.R.E. PERUGINI; F. E. CARRARA-MARRONI; S. F. YAMADA-OGATTA ET AL. presença de genes codificadores de esbl em isolados de pseudomonas aeruginosa produtores de carbapenemases.. in: ii congresso paranaense de microbiologia - SIMPÓSIO SUL-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 2016, . Resumos... Campinas, GALOÁ, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/cpm/trabalhos/presenca-de-genes-codificadores-de-esbl-em-isolados-de-pseudomonas-aeruginosa-produtores-de?lang=pt-br>>. Acesso em: 21 jun. 2018.
- TAFUR, J.D., TORRES, J.A. & VILLEGAS, M.V. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. **Assoc Colombiana de Infecto**, 12, 217226, 2008.
- TAMBER, S.; HANCOCK, R. E. W. Involvement of two related porins, OprD and OpdP, in the uptake of arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 260, n. 1, p. 23-9, 2006.
- TATO, M. et al. Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 54, n. 1, p. 320–327, 2010.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The Am J of Medicine**. 119, S3–S10, 2006.
- THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, Horizontal gene transfer Between bacteria. **Nat Rev**, v. 3, p. 711 – 721, 2007.
- TOLEMAN, M. A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, n. 5, p. 673-9, 2002.

VAN DUUREN, J. B. J. H. et al. Use of Single-Frequency Impedance Spectroscopy to Characterize the Growth Dynamics of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Scient reports**, v. 7, n. 1, p. 5223, 2017.

VILA, J.; MARCO, F. Interpretative reading of the non-fermenting Gram negative bacilli antibiogram. **Enf Infec Microbiol Clinical**, v. 20, n. 6, p. 304-10, 2002.

WACHINO, J. et al. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by ISEcp1. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3212-5, 2006.

WALSH, T. R. et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study. **The Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 5, p. 355–362, 2011.

WANG M, BORRIS L, AARESTRUP FM, HASMAN H. Identification of a *Pseudomonas aeruginosa* co-producing NDM-1, VIM-5 and VIM-6 metallo- β -lactamases in Denmark using whole-genome sequencing. **Int J Antimicrob Agents**, n.45, p. 324 –325, 2015.

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 1, p. 147-51, 1991.

WELDHAGEN GF, POIREL L, NORDMANN P. Ambler Class A Extended-Spectrum-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. **Antimicrob Agents Chemother**, n. 47, p. 2385–2392, 2003.

WILHELM, C. M. et al. **36^a sem cient do hospital de clínicas de porto alegre**. v. 36, p. 2016, 2015.

WILKE, M. S.; LOVERING, A. L. E STRYNADKA, N. C. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **C. opin in microbiol**, n. 8, p. 525-533, 2005.

XAVIER, D. E. et al. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC microbiol**, v. 10, p. 217, 2010.

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

YAMAZOE, K.; KATO, N.; KATO, H.; TANAKA, K.; KATAGIRI, Y.; WATANABE, K. Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.43, n.11, p.2808-2810, 1999.

YOKOYAMA, K. *et al.* Acquisition of 16S rRNA methylase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1888-93, 2003.

YONEYAMA, H. *et al.* Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. **Biochem and Biophys Research Communicat**, v. 213, n. 1, p. 88-95, 1995.

YONG, D. et al. A novel sub-group metallo-beta-lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. **47th Int Confe in Ant Agents and Chemother** (ICAAC). Chicago, IL, USA, 2007. n. C1-539.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 12, p. 5046-54, 2009.

ZANOL, F. M.; PICOLI, S. U.; MORSCH, F. Detecção fenotípica de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. **J Bras de Patolog e Med Lab**, v. 46, n. 4, p. 309–314, 2010.

ZAVASCKI, A. P. et al. The influence of metallo-Blactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 2, p. 387-92, 2006.

11 APÊNDICES

Apêndice 1

Tabela 5. Resultados de antibiograma das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

Amostr a	Antibiograma						Amostr a	Antibiograma						Amostr a	Antibiograma					
	AT M	CA Z	CI P	GE N	IM P	PP T		AT M	CA Z	CI P	GE N	IM P	PP T		AT M	CA Z	CI P	GE N	IM P	PP T
1	S	S	S	S	S	S	34	S	R	S	R	S	S	67	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	35	S	S	S	R	S	S	68	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	36	S	S	S	R	S	S	69	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	S	S	S	37	S	S	S	S	S	S	70	S	S	S	I	S	S
5	S	S	S	R	S	S	38	S	S	S	R	S	S	71	S	S	S	I	S	S
6	S	S	S	S	S	S	39	S	S	R	R	R	S	72	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	I	S	I	40	S	S	S	R	S	S	73	S	S	S	I	S	S
8	S	S	S	S	S	S	41	S	S	S	R	S	S	74	S	S	S	I	S	S
9	S	S	S	S	S	S	42	S	S	S	R	S	S	75	S	S	S	R	S	S
10	S	S	S	S	S	S	43	R	S	S	R	R	S	76	S	S	S	R	S	S
11	S	S	S	S	S	S	44	S	S	S	R	S	S	77	S	S	S	R	S	S
12	S	S	S	S	S	S	45	S	S	S	R	S	S	78	S	S	S	R	S	S
13	S	S	S	S	S	S	46	S	S	S	R	S	S	79	S	S	S	R	S	S
14	S	S	S	S	S	S	47	S	S	S	R	S	S	80	R	R	S	R	S	S
15	S	S	S	S	S	S	48	S	S	S	R	S	S	81	S	S	S	S	S	S
16	R	R	R	R	R	S	49	S	R	S	R	R	S	82	S	S	S	S	S	S
17	R	S	S	R	S	S	50	S	S	S	S	S	S	83	S	S	S	R	S	S
18	S	S	S	R	S	S	51	S	S	S	R	S	S	84	S	S	S	R	S	S
19	S	S	S	I	S	S	52	S	S	S	R	S	S	85	S	S	S	S	S	S
20	I	R	S	S	S	S	53	S	S	S	I	S	S	86	S	S	S	S	S	S
21	R	I	S	R	S	S	54	I	S	S	R	S	S	87	S	S	S	I	S	S
22	I	S	S	R	S	S	55	S	S	S	S	S	S	88	S	S	S	R	S	S
23	R	S	S	R	S	S	56	R	S	S	S	S	R	89	S	S	S	R	S	S
24	S	S	S	S	S	S	57	S	S	S	S	S	S	90	S	S	S	R	S	S
25	S	S	S	S	S	S	58	R	S	S	R	S	S	91	S	S	S	I	S	S
26	S	S	S	S	S	S	59	S	S	S	R	S	S	92	S	S	S	S	S	S
27	S	R	S	S	S	S	60	S	S	S	S	S	S	93	S	S	S	S	S	S
28	S	S	S	S	S	S	61	S	S	S	S	S	S	94	S	S	S	S	S	S
29	S	S	S	S	S	S	62	S	S	S	R	S	S	95	R	R	R	R	R	R
30	S	S	S	S	S	S	63	S	S	S	S	S	S	96	R	R	R	R	R	R
31	S	S	S	S	S	S	64	S	S	S	R	S	S	97	S	S	S	S	R	S
32	S	S	S	S	S	S	65	S	S	S	R	S	S	98	S	S	S	S	S	S
33	S	S	S	S	S	S	66	S	S	S	R	S	S	99	S	S	R	R	R	S

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Diagnóstico avançado de metalo β -lactamases

Pesquisador: Lilian Carla C

arneiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51790215.3.0000.5083

Instituição Proponente: Universidade Federal de Goiás - UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.411.900

Apresentação do Projeto:

Inúmeras publicações na área epidemiológica e de saúde pública demonstram que a cada dia aumentam os casos clínicos de paciente resistente às carbapenemases.

Espera-se com esse projeto conseguir padronizar o diagnóstico molecular de PCR em tempo real, formato multiplex para bactérias resistentes a metais e outro formato multiplex para bactérias resistentes a lactâmicos, viabilizando uma alternativa de identificação biotecnológica do patógeno estudado.

Objetivo da Pesquisa:**OBJETIVO GERAL**

Padronizar diagnóstico monoplex real time dos genes de resistência às metalo β -lactamases: blaSPM, blaSIM, blaVIM, blaKPC, blaSHV, blaCTX-M, blaCTX, blaGIM, blaOXA, blaIMP, blaNDM, blaSME, blaDHA, blaCMY, blaTEM. Posteriormente, padronizar diagnóstico multiplex real time para esses mesmos genes de resistência.

Objetivos específicos:

Construir oligonucleotídeos para diagnóstico de PCR em tempo real, na identificação das variações de resistência gênica às metalo β -lactamases: blaSPM, blaSIM, blaVIM, blaKPC, blaSHV, blaCTX-M, blaCTX, blaGIM, blaOXA, blaIMP, blaNDM, blaSME, blaDHA, blaCMY, blaTEM.

1. Padronizar a reação de PCR em tempo real, para diagnosticar genes de resistência às metalo lactamases.
2. Padronizar as reações multiplex de PCR em tempo real para diagnosticar genes de resistência às metalo -lactamases.
3. Padronizar as reações multiplex de PCR em tempo real para diagnosticar genes de resistência às metalo -lactamases.
4. Calcular a sensibilidade, especificidade e o desempenho dos ensaios moleculares.
5. Realizar teste estatístico de regressão linear para validação dos resultados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Não há riscos para pacientes, partindo do princípio que as mostras são repositório de laboratório. Não haverá contato com paciente.

BENEFÍCIOS

Este projeto almeja beneficiar a sociedade, gerando um produto, que é a padronização de diagnóstico biotecnológico, favorecendo os pacientes, com diagnósticos precisos e rápidos, diminuindo o tempo de espera para iniciar a antibioticoterapia e auxiliando também na prescrição do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As amostras de carbapenemases, utilizadas no estudo, foram previamente coletadas pelo nosso grupo do Laboratório de Fenotipagem e Biologia Molecular – LAFEBIM – IPTSP- UFG, trabalho aprovado pelo CEPMHA/HC/UFG 006/2010. Essas amostras foram isoladas e armazenadas como material biológico repositório de laboratório, bactérias identificadas como resistentes a antimicrobianos. Esse material repositório foi gentilmente, cedido para este projeto. Serão utilizadas 100 amostras previamente isoladas. O DNA destas amostras clínicas cedidas foi previamente extraído, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) seguindo as especificações do fabricante. Para as reações de PCR em tempo real será seguido o protocolo específico, focando nos genes blaKPC (Acesso no *GenBank*: AF297554.1), blaOXA (Acesso no *GenBank*: FN396876.1), blaIMP Acesso no *GenBank*: NG_035455.1), blaVIM (Acesso no *GenBank*: NG_036099.1), blaNDM (Acesso

no *GenBank*: JN711113), blaCTX (Acesso no *GenBank*: FJ815279.1), blaGIM (Acesso no *GenBank*: JX566711.1), blaSIM (Acesso no *GenBank*: EF125010.1), blaSPM (Acesso no *GenBank*: DQ145284.1), blaSIM (Acesso no *GenBank*: EF125010.1), blaSME (Acesso no *GenBank*: KJ188748.1), blaSHV (Acesso no *GenBank*: NG_039555.1), blaCTX-M (Acesso no *GenBank*: NG_036029.1), (Acesso no *GenBank*: blaTEM KJ923009), blaDHA (Acesso no *GenBank*: NG_041043.1), blaCMY (Acesso no *GenBank*: NG_041279.1).

Serão construídos oligonucleotídeos específicos, para realização do ensaio PCR em tempo real. Inicialmente será realizado um experimento no formato monoplex e posteriormente será padronizada a reação multiplex.

Para o protocolo de PCR em tempo real desenvolvido neste trabalho, serão utilizados iniciadores específicos, a serem construídos com base nas sequências depositadas no gene bank, posteriormente, será aplicada a tecnologia de PCR em tempo real na plataforma ABI7500.

Será utilizado como controle negativo e controle interno da reação o gene da enzima RNase P humana.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados: Folha de rosto. Resposta à carta de recusa de projeto. Carta de compromisso dos pesquisadores. Carta de anuência assinada pelo prof. André Knipis para utilização das amostras armazenadas em biorrepositório. Cronograma adequado. Orçamento apresentado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos postados somos favoráveis à aprovação do presente protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o (a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP/UFMG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de

publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Página 03 de

Situação do Parecer: Aprovado

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576806.pdf	09/12/2015 11:17:08		Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso.pdf	09/12/2015 11:16:13	Lilian Carla carneiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCEP.pdf	09/12/2015 11:13:28	Lilian Carla carneiro	Aceito
Outros	CARTARESPOSTARECUSADEPROJETO.pdf	09/12/2015 11:08:47	Lilian Carla carneiro	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	04/12/2015 12:18:36	Lilian Carla carneiro	Aceito
Outros	Cartadeanuencia.bmp	04/12/2015 12:17:52	Lilian Carla carneiro	Aceito

Necessita Apreciação da CONEP: Não

GOIANIA, 17 de Fevereiro de 2016

**Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)**