

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*IVSON CASSIANO DE OLIVEIRA SANTOS*

**Estudo evolutivo da diversidade genética e resistência aos antimicrobianos em  
*Pseudomonas aeruginosa* ao longo de 21 anos (1995-2015) no Rio de Janeiro**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientadora:** Dra. Ana Paula D’Alincourt Carvalho Assef

**RIO DE JANEIRO**

2016

S237 Santos, Ivson Cassiano de Oliveira

Estudo evolutivo da diversidade genética e resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* ao longo de 21 anos (1995-2015) no Rio de Janeiro / Ivson Cassiano de Oliveira Santos. – Rio de Janeiro, 2016.

xiii, 116 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 83-116

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Resistência. 3. Epidemiologia. 4. Clone SP. I. Título.

CDD 579.332

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Ivson Cassiano de Oliveira Santos*

**Estudo evolutivo da diversidade genética e resistência aos antimicrobianos em  
*Pseudomonas aeruginosa* ao longo de 21 anos (1995-2015) no Rio de Janeiro**

**ORIENTADORA: Dra. Ana Paula D’Alincourt Carvalho Assef**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes – Presidente  
Prof. Dr. Elizabeth de Andrade Marques  
Prof. Dr. Mara Lúcia Queiroz  
Prof. Dr. Robson de Souza Leão  
Prof. Dr. Deyse Christina Vallim da Silva

Rio de Janeiro, 25 de outubro de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades concedidas, por ter me capacitado e dado forças, mesmo nos momentos de desânimo. Se até aqui cheguei foi porque o Senhor me sustentou e grato sou.

Agradeço a minha família, que por mais que não entendam o que eu faço ou busco, é a base que me sustenta e eu sei que se eu cair eles estarão lá. Agradeço a minha tia Nininha por ter me criado, a tia Simone pelo seu amor, a tia Rita pela força, ao tio Fabiano pelo financiamento, a minha vó Neneia pelo maior exemplo que eu poderia ter. A minha mãe Ana, que por toda luta, é a uma das mulheres mais fortes e corajosas que eu já vi, que deu a vida pelos filhos. A minha vó Marlene por sustentar e ser o alicerce da casa, a tia Marcia pelas risadas e momentos felizes. Aos meus amados primos, que nunca faltaram com a sua presença, que sempre me entendem e apoiam, pelas risadas e saídas. Aos meus irmãos que seguiram suas vidas como acharam melhor e independente de qualquer coisa são a minha família e os amo.

Aos meus amigos, de antes deste trabalho, feitos durante e aos que virão também. Sem vocês a vida não teria graça e quanto a isso sou privilegiado, pois tenho os melhores amigos do mundo. Uns loucos, uns quietos, outros tímidos, uns baladeiros, uns se casando, uns da infância, outros da faculdade e tem mais os do trabalho, aos que foram e aos que permanecem, mas todos presentes e fundamentais para me tornar o que eu sou hoje. Não vou citar nomes, porque são muitos e todos vocês foram fundamentais para o que eu sou e onde estou hoje. Obrigado!

A vida é feita de perdas e ganhos e durante essa trajetória ganhei e perdi muita coisa. Pude ir no ápice da felicidade e me encontrar chorando sozinho. Perdi amigos, perdi parentes, família, perdi pessoas que trabalharam comigo, ganhei amores, perdi amores, mas, contudo, sou grato, pois o que é a vida, se não momentos. Sou grato porque estou vivo para vive-los.

Agradeço aos meus orientadores, primeiro a Doutora Marise por me receber de braços abertos em seu laboratório e me dar a oportunidade de crescer em todos os aspectos. E depois, durante o mestrado ter me dado a oportunidade de ser orientado pelo que eu chamaria de melhor orientadora que um estudante pode ter, Doutora Ana Paula. Vi muitos amigos com problemas com seus orientadores, cobranças são normais, porém quando estive com problemas, ela me emprestou os ombros, os ouvidos e uma palavra amiga e doce. Obrigado por tudo!

Agradeço aos membros da banca, pelo aceite, peço desculpas pelo nervosismo, afinal, estou diante de grandes doutores e doutoras ao qual já me vi entusiasmado diante de seus artigos e palestras.

Agradeço a pós-graduação por todo suporte e apoio dado. Às agências de fomento, CAPES,

CNPQ e Faperj. E que o investimento em pesquisa e desenvolvimento venha a ser mais valorizado em nosso país.

Agradeço a todos que tornaram este trabalho possível.

Muito obrigado!

Hoje você está onde os seus pensamentos o levaram,  
amanhã vai estar onde eles o levarem.

(James Allen)

## SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AmpC</b>	Tipo de beta-lactamase cromossomal
<b>AK</b>	Amicacina
<b>ANVISA</b>	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATCC</b>	do inglês <i>American Type and Culture Collection</i>
<b>BGN</b>	Bastonetes Gram-negativos
<b>BHI</b>	do inglês <i>Brain Heart Infusion Agar</i>
<b>BLAST</b>	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CC</b>	Complexo clonal
<b>CCBH</b>	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
<b>CDC</b>	do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CLSI</b>	do inglês <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DIG</b>	Digoxigenina
<b>ECDC</b>	do inglês <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>EMB</b>	do inglês <i>Eosin Methylene- blue Agar</i>
<b>ESBL</b>	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>EUCAST</b>	do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>EDTA</b>	do inglês <i>Ethylene Diamine Tetraacetic acid</i>
<b>FC</b>	Fibrose cística
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FOT</b>	Fosfomicina/trometamol
<b>GN</b>	Gentamicina
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Gás Sulfídrico
<b>IMP</b>	Imipenem
<b>IOC</b>	Instituto Oswaldo Cruz
<b>kb</b>	Quilobases
<b>kDa</b>	Quilodaltons
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
<b>LAPIH</b>	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
<b>MDR</b>	Multirresistente
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>Mb</b>	Megabases
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MLEE</b>	do inglês <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
<b>MLST</b>	do inglês <i>Multilocus sequence typing</i>
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NDM</b>	<i>New Delhi Metallo-beta-lactamase</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OMP</b>	<i>Outer membrane protein</i> - Classe de porinas presente em Procariotos
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>OXA</b>	Oxacilina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBP</b>	do inglês <i>Penicillin-binding proteins</i> - Proteínas ligadoras de penicilina
<b>PCR</b>	do inglês <i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em Cadeia da polimerase
<b>PDR</b>	Pan Resistente
<b>PFGE</b>	do inglês <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
<b>PB</b>	Polimixina B
<b>TZP</b>	Piperacilina/tazobactam
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SPM</b>	São Paulo Metallo-beta-lactamase

<b>ST</b>	do inglês <i>Sequence type</i>
<b>SXT</b>	Sulfametoxazole/trimetroprima
<b>TAE</b>	Tampão Tris-acetado EDTA
<b>TBE</b>	Tampão Tris-borato EDTA
<b>TE</b>	Tampão Tris-EDTA
<b>TEM</b>	Beta-lactamase Temoneira
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UTI</b>	Unidade de terapia intensiva
<b>XDR</b>	Extensivamente resistente

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Estrutura química dos quatro beta-lactâmicos.....	4
<b>Figura 1.2:</b> Contexto genético dos sistemas de efluxo RND em <i>P. aeruginosa</i> . ....	21
<b>Figura 3.1.:</b> Distribuição dos 88 isolados de <i>P. aeruginosa</i> ao longo dos anos. ....	34
<b>Figura 3.2:</b> Fluxograma da metodologia do CARBA NP. ....	38
<b>Figura 3.3:</b> Esquema do desenho dos iniciadores para amplificação e sequenciamento da <i>oprD</i> .....	45
<b>Figura 4.1:</b> Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 88 amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas no Rio de Janeiro no período de 1995-2015 incluídas no estudo.....	48
<b>Figura 4.2:</b> Evolução do perfil de resistência ao longo dos 4 períodos estudados.....	51
<b>Figura 4.3:</b> Evolução da resistência as classes de antimicrobianos testados nas amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas ao longo dos 21 anos no Rio de Janeiro.. ....	52
<b>Figura 4.4:</b> Concentração inibitória mínima de imipenem das 88 amostras de <i>P. aeruginosa</i> incluídas no estudo. ....	53
<b>Figura 4.5:</b> Evolução da Concentração inibitória mínima de imipenem para as 88 amostras de <i>P. aeruginosa</i> ao longo de 21 anos de estudo no Rio de Janeiro.....	54
<b>Figura 4.6:</b> Sequência proteica da <i>oprD</i> obtida para 24 amostras comparadas com a sequência da <i>oprD</i> PAO-1 a partir do resíduo 92 ao 444.....	60
<b>Figura 4.7:</b> Sequência proteica do <i>mexT</i> obtida para 27 amostras amostras comparadas com a sequência da PAO-1. ....	63
<b>Figura 4.8:</b> Distribuição dos 81 clones encontrados ao longo dos períodos estudados.. ....	65
<b>Figura 4.9:</b> Dendograma dos 81 amostras de <i>P. aeruginosa</i> .....	66

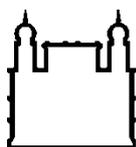
## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Classificação das beta-lactamases segundo Bush, 2011 (57).....	12
<b>Tabela 1.2:</b> Fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos obtidos pelos principais mecanismos de resistência descritos em <i>P. aeruginosa</i> .....	23
<b>Tabela 1.3:</b> Principais mecanismos de resistência em <i>P. aeruginosa</i> . ....	28
<b>Tabela 3.1:</b> Distribuição dos 88 isolados de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com o hospital de origem, sítio de isolamento e período.....	35
<b>Tabela 3.2:</b> Iniciadores específicos utilizados para a detecção de carbapenemases na reação multiplex e condições de reação.....	40
<b>Tabela 3.3:</b> Iniciadores específicos utilizados para a detecção de carbapenemases na reação simplex e condições de reação.. ....	41
<b>Tabela 3.4:</b> Iniciadores específicos utilizados para a detecção dos genes de resistência aos aminoglicosídeos, temperatura de anelamento e referência.....	42
<b>Tabela 3.5:</b> Iniciadores, tamanho do produto e referência para detecção de genes de resistência as fluoroquinolonas pesquisados.. ....	43
<b>Tabela 3.6:</b> Iniciadores, tamanho do produto e condições de reações para o PCR de cada gene.....	44
<b>Tabela 3.7:</b> Iniciadores internos utilizados para o sequenciamento da porina <i>oprD</i> . ....	45
<b>Tabela 4.1:</b> Perfil de resistência das 88 amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas no Rio de Janeiro no período de 1995-2015 incluídas no estudo.. ....	50
<b>Tabela 4.2:</b> Associação entre os fenótipos de resistência e detecção de carbapenemases através do teste de hidrólise e PCR.. ....	56
<b>Tabela 4.3:</b> Total de sequências obtidas para os genes de <i>oprD</i> , <i>mexT</i> e <i>gyrA</i> .....	57
<b>Tabela 4.4:</b> Alterações encontradas no gene de <i>oprD</i> das 24 amostras sequenciadas.. ....	59
<b>Tabela 4.5:</b> Mutações encontradas no <i>mexT</i> nos 27 isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	61
<b>Tabela 4.6:</b> Perfil de mutação e alteração aminoacídica na região QRDR do gene <i>gyrA</i> e o perfil de resistência as fluoroquinolonas testadas.....	64

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Gênero <i>Pseudomonas</i> .....	1
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.3 Tratamento das infecções.....	3
1.3.1 Antimicrobianos beta-lactâmicos.....	4
1.3.2 Antimicrobianos fluoroquinolonas .....	6
1.3.3 Antimicrobianos aminoglicosídeos .....	7
1.3.4 Antimicrobianos polimixinas .....	8
1.4 Resistência aos antimicrobianos .....	9
1.5 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos .....	10
1.5.1 Mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos.....	10
1.5.1.1 Alteração das Proteínas ligadoras de Penicilinas (PBPs) .....	10
1.5.1.2 Beta-lactâmases .....	10
1.5.1.2.1 Carbapenemases de classe A .....	15
1.5.1.2.2 Carbapenemases de classe B .....	17
1.5.1.2.3 Carbapenemases de classe D .....	19
1.5.1.3 Alteração da permeabilidade através de porinas.....	19
1.5.1.4 Hiperexpressão de sistemas de efluxo.....	20
1.5.2 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos.....	23
1.5.2.1 Alteração da permeabilidade de membrana.....	23
1.5.2.2 Mecanismos enzimáticos .....	24
1.5.3 Mecanismo de resistência as fluoroquinolonas .....	25
1.5.3.1 Modificação do sítio alvo.....	26
1.5.3.2 Alterações na permeabilidade de membrana.....	26
1.5.3.3 Resistência mediada por genes plasmideais.....	26
1.5.4 Mecanismos de resistência as polimixinas.....	27
1.6 Métodos de tipagem.....	28
1.7 Epidemiologia de <i>P. aeruginosa</i> .....	29
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral .....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. METODOLOGIA.....	34
3.1 Seleção das amostras .....	34
3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	35
3.2.1 Disco difusão em agar.....	35
3.2.2 Determinação da concentração mínima inibitória para o imipenem.....	36
3.2.3 Análise do perfil de multirresistência.....	36
3.3 Detecção colorimétrica da hidrólise do imipenem – Carba NP.....	37

3.4	Detecção dos determinantes de resistência pela técnica de reação em cadeia da polimerase.....	39
3.4.1	Extração de DNA pelo método de sonicação.....	39
3.4.2	Detecção de genes de carbapenemases por PCR.....	39
3.4.3	Detecção de genes de resistência aos aminoglicosídeos.....	41
3.4.4	Detecção de genes de resistência as fluoroquinolonas .....	42
3.4.5	Corrida eletroforética .....	43
3.5	Identificação da variante alélica da <i>oprD</i> , <i>mexT</i> e <i>gyrA</i> .....	44
3.5.1	Reação de PCR .....	44
3.5.2	Sequenciamento .....	45
3.6	Análise do polimorfismo genético através de PFGE.....	46
4.	RESULTADOS .....	48
4.1	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	48
4.2	Análise do perfil de multirresistência .....	48
4.3	Determinação da concentração inibitória mínima .....	52
4.4	Detecção colorimétrica da hidrólise do imipenem .....	54
4.5	Detecção dos genes codificadores de carbapenemases. ....	55
4.6	Correlação entre os testes fenotípicos e genotípicos para detecção de carbapenemases. ....	55
4.7	Detecção de genes de resistência aos aminoglicosídeos .....	56
4.8	Detecção de genes de resistência as fluoroquinolonas .....	56
4.9	Avaliação da presença de mutações nos genes <i>oprD</i> , <i>mexT</i> e <i>gyrA</i> . ....	57
4.9.1	Análise de mutações no gene <i>oprD</i> .....	57
4.9.2	Análise de mutações no gene <i>mexT</i> .....	61
4.9.3	Análise de mutações no gene <i>gyrA</i> .....	64
4.10	Análise do polimorfismo genético através de PFGE .....	64
5.	DISCUSSÃO.....	68
6.	CONCLUSÕES.....	81
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

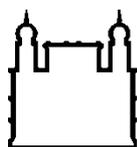
### **Estudo evolutivo da diversidade genética e resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* ao longo de 21 anos (1995-2015) no Rio de Janeiro**

#### **RESUMO – Dissertação de mestrado**

**Ivson Cassiano de Oliveira Santos**

*Pseudomonas aeruginosa* tem mostrado resistência a diferentes agentes antimicrobianos desde 1991, data do primeiro surto no Brasil. Hoje em dia, a principal preocupação é dada pela resistência aos carbapenemas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. O objetivo deste estudo foi identificar marcadores genéticos de resistência e diversidade clonal de amostras de *P. aeruginosa* isoladas no estado do Rio de Janeiro no período de 1995 a 2015. Para tal, foram estudadas 88 amostras pertencentes à Coleção de Cultura de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz. As amostras foram avaliadas quanto ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco difusão e a concentração mínima inibitória determinada para imipenem. Foi realizada a detecção colorimétrica da hidrólise do imipenem (Carba NP), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de genes de carbapenemases (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*), genes de resistência aos aminoglicosídeos (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* e *npmA*) e fluoroquinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrS*) e as mutações nos genes de *oprD*, *mexT* e *gyrA* foram pesquisadas através de PCR e sequenciamento para as amostras resistentes aos carbapenemas, aos carbapenemas e/ou fluoroquinolonas e fluoroquinolonas, respectivamente. A tipagem molecular foi realizada através do PFGE. Todas as amostras foram susceptíveis as polimixinas. O antimicrobiano que apresentou mais taxa de não susceptibilidade foi a ticarcilina + ácido clavulânico (93,2%) e para os demais antimicrobianos foram encontradas taxas variando de 27 a 60%. A não susceptibilidade ao longo dos anos foi crescente para os carbapenemas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Genes de carbapenemases foram encontrados em 8 amostras (*bla<sub>KPC</sub>* – n=5 e *bla<sub>SPM</sub>* – n=3), todas detectadas pelo teste Carba NP. O gene *rmtD* foi detectado em 5 amostras. Nenhum gene plasmidial de resistência as fluoroquinolonas foi detectado neste estudo. Encontramos mutações no gene *oprD* que levavam a alterações na proteína em 14 das 24 amostras analisadas. Em relação ao gene *mexT* observamos a perda de 8 nucleotídeos no início do gene em 26 das 27 amostras analisadas e mutação na região QRDR do gene *gyrA* em 21 das 27 testadas. Através de PFGE observamos uma grande diversidade clonal (34 perfis), sendo os perfis U (n=11) e J (n=11) os mais frequentes. As amostras produtoras de SPM foram agrupadas no perfil J, que correspondeu ao clone SP (ST277). O presente estudo mostra a evolução da resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* ao longo de 21 anos no Rio de Janeiro, embora a resistência seja crescente, nenhum clone prevalente de fenótipo XDR foi encontrado chamando a atenção para o importante papel da pressão seletiva e surgimento da resistência em *P. aeruginosa* por processos mutacionais.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, Resistência, Epidemiologia, clone SP.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Estudo evolutivo da diversidade genética e resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* ao longo de 21 anos no Rio de Janeiro

#### ABSTRACT – Dissertação de mestrado

Ivson Cassiano de Oliveira Santos

*Pseudomonas aeruginosa* has shown resistance to different antimicrobial agents since 1991, date of the first outbreak in Brazil. Nowadays, the resistance to carbapenems, aminoglycosides and fluoroquinolones gives the main concern. The objective of this study was to identify genetic markers of resistance and clonal diversity of samples of *P. aeruginosa* strains isolated in Rio de Janeiro from 1995 to 2015. We studied 88 samples belonging to the Collection of Bacterial Culture of Origin from the Hospital (CCBH) of the Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). The samples were evaluated to the profile of antimicrobial susceptibility by method of disk diffusion and E-test to imipenem. The colorimetric detection was performed by hydrolysis of imipenem (Carba NP), polymerase chain reaction (PCR) for detection of genes of carbapenemases (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*), genes of resistance to aminoglycosides (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* e *npmA*) and fluoroquinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC* and *qnrS*) and the mutation in the genes of *oprD*, *mexT* and *gyrA* were surveyed by PCR and sequencing. Molecular typing was performed using the PFGE. All samples were susceptible polymyxins. The antimicrobial showing more rate resistant was ticarcillin + clavulanic acid (93.2%) for other antimicrobial rates were found from 27 to 60%. The non-susceptibility over the years has been growing for carbapenems, aminoglycosides and fluoroquinolones. Genes of carbapenemases were found in 8 samples (*bla<sub>KPC</sub>* - n=5 and *bla<sub>SPM</sub>* - n=3), all detected by the test of hydrolysis. The *rmtD* gene (resistance to aminoglycosides) was detected in 5 samples. No plasmid fluoroquinolone resistance gene was detected in this study. We found mutations in the gene *oprD* leading to mutation in protein in 14 of 24 samples analyzed. In relation to gene *mexT* observed the loss of 8 nucleotides at the beginning of the gene in 25 out of 26 samples analyzed and mutation in the QRDR of *gyrA* in 21 of the 27 tested. By PFGE we observed a wide diversity clonal hedge (34), and the profiles U (n=11) and J (n=11) the most frequent. The samples of SPM were grouped in the profile J, which corresponded to the clone SP (ST277). The present study shows the trends in antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* over 21 years in Rio de Janeiro, although the resistance is growing no prevalent clone of XDR phenotype was found in all periods of the study draws attention to the important role the selective pressure and emergence of resistance in *P. aeruginosa*.

Nucleotides

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Resistance, Epidemiology, Clone SP.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Gênero *Pseudomonas*

A primeira descrição de *Pseudomonas aeruginosa* foi em 1882, por Carle Gessard, em uma publicação intitulada “*On the Blue and Green Coloration of Bandages*”. Entretanto, somente em 1894 foi proposto o nome de *Pseudomonas* pelo botânico Walter Migula. Essa nomenclatura inicialmente incluía todos os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) que possuíam flagelo polar (1).

Johnson e Palleroni (1989) dividiram o gênero em 5 grupos (I-V) baseado na homologia do rRNA (RNA ribossomal). Diante desta classificação, o gênero *Pseudomonas* (propriamente dito) foi classificado no grupo I e composto, inicialmente, por 8 espécies: *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. syringae* e espécies com coloração incerta, pertencentes a família *Pseudomonadaceae*. Atualmente existem mais 191 espécies descritas (2).

O gênero *Pseudomonas* é ubiqüitário, com preferência por ambientes úmidos, principalmente em ambientes aquáticos e solo. Possui capacidades nutricionais mínimas, o que contribui para sua ampla distribuição no ambiente (3). Dentre as diferentes espécies do gênero, poucas apresentam importância clínica, sendo *Pseudomonas aeruginosa* se destaca pela sua importância como patógeno humano associado a Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAs).

## 1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Apresenta-se como um bastonete Gram-negativo de aproximadamente 0,5 a 1,5 x 1,5 a 5 µm de tamanho. Em geral, possui flagelo polar monotríquio, sendo, portando, móvel. Não é capaz de fermentar a glicose. Utiliza os carboidratos através do metabolismo oxidativo. Entretanto, pode crescer em anaerobiose utilizando nitrato ou arginina como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória (3). Cresce em ampla faixa de temperatura (4°C a 42°C) e é encontrado em habitats aquáticos, podendo sobreviver em superfícies inanimadas, além de colonizar a superfície de hospedeiros humanos e animais. Geralmente produz pigmentos solúveis, tais como: piocianina, que fornece uma cor azulada para as colônias, e pioverdina, conhecido também como pigmento fluorescente. A combinação destes dois pigmentos é responsável pela coloração verde brilhante característica de *P. aeruginosa*. Esta espécie pode produzir também outros pigmentos solúveis como piorrubina ou piomelanina, que fornecem

uma cor vermelha ou marrom, respectivamente. Outra característica é o odor adocicado de uva obtido a partir da produção de 2-aminoacetofenona (4).

Isolados de *P. aeruginosa* podem apresentar diferentes morfologias coloniais em meios de cultura, porém a maioria delas crescem de forma plana e espalhada sobre a superfície do ágar. Isolados de pacientes com fibrose cística tendem a ter colônias mucóides, devida a produção exarcebada de alginato (5).

Devido a capacidade de adaptação da espécie, está tem sido isolada de infecções hospitalares e na comunidade. Infecções na comunidade incluem as de pele e tecidos moles, queratite associada ao uso de lentes de contato e otite externa. No ambiente hospitalar, estas infecções se dão de forma oportunista, em pacientes com estado imunológico debilitado e submetidos a procedimentos invasivos. Estas infecções incluem o trato urinário, corrente sanguínea, sítio cirúrgico, vias respiratórias, entre outros. Pacientes com queimaduras, fibrose cística ou ventilação mecânica estão mais susceptíveis a este tipo de infecção (5).

No ambiente hospitalar os principais reservatórios apontados para *P. aeruginosa* incluem os equipamentos de ventilação mecânica, anti-sépticos, lavatórios, medicamentos e superfícies. Enquanto que na comunidade, esta bactéria pode ser encontrada em piscinas, banheiras, soluções de lentes de contatos, umidificadores, solo e produtos agrícolas. Apesar disto, infecções graves por *P. aeruginosa* são predominantemente de origem hospitalar (6).

Este micro-organismo raramente é encontrado colonizando seres humanos saudáveis, tendo taxa de colonização de 0 a 2% para a pele, 0 a 3,3% da mucosa nasal, 0 a 6,6% para a garganta e 2,6 a 24% para o trato intestinal. Porém, as taxas de colonização em pacientes hospitalizados podem exceder os 50%, tendo os pacientes imunocomprometidos maior risco para colonização (4, 7).

O panorama das infecções hospitalares mostrado pelos programas de vigilância da resistência microbiana, como SENTRY, revelaram *P. aeruginosa* como o BGNF mais frequente em infecção do trato respiratório, tanto nos EUA, quanto na Europa (8). Na América Latina, *P. aeruginosa* tem sido apontada como o segundo micro-organismo mais frequente em pneumonia hospitalar associada a ventilação mecânica (9). Ainda pelo SENTRY, esta foi a principal causa de pneumonia e terceira mais isolada em infecções de pele e tecidos moles no período de 2008 á 2010 na América Latina (10). Dados de 2003 à 2008 no Brasil mostraram este micro-organismo como principal responsável em infecções do trato respiratório, segundo em infecções urinarias e feridas cirúrgicas e o quinto em infecções da corrente sanguínea (11).

A grande problemática de infecções que esta espécie pode causar esta associada aos fatores de virulência, o que eleva a gravidade das infecções. Entre estes fatores podemos citar

o sistema de secreção tipo III, exotocinas, elastase, pioverdina, rhamnolipídios, biofilme e sistemas de comunicação celular *Quorum Sensing* (QS) (5).

A grande problemática destas infecções está na falta de opções para tratamento, o que eleva o risco de morbidade, mortalidade, intervenção cirúrgica, tempo de internação e aumento dos custos.

### **1.3.Tratamento das infecções**

O sucesso do tratamento está diretamente ligado ao uso de um antimicrobiano apropriado e eficaz. *P. aeruginosa* representa, nos dias atuais, um dos principais desafios de tratamento e erradicação nas instituições de saúde, tanto pela sua ampla capacidade de sobrevivência no ambiente hospitalar, quanto pela resistência ao tratamento (12).

Com a falta de investimento e desenvolvimento de agentes antimicrobianos para tratamento de Gram-negativos, as opções terapêuticas para *P. aeruginosa* se limitam a terapia combinada e utilização de antimicrobianos abandonados da prática clínica pela sua alta toxicidade, como as polimixinas. Os agentes antimicrobianos com atividade contra *P. aeruginosa* incluem os beta-lactâmicos (cefalosporinas, aztreonam), carbapenemas (imipenem, meropenem e doripenem) e fluoroquinolonas, principalmente a ciprofloxacina. Os aminoglicosídeos também podem ser usados como opção terapêutica. O tratamento, geralmente, envolve a terapia combinada entre um beta-lactâmico e um aminoglicosídeo ou fluoroquinolona. O surgimento da resistência durante a terapia já foi descrito para estes agentes e reconhecida como uma das causas da falha do tratamento (13, 14).

A terapia combinada é usada para minimizar o desenvolvimento desta resistência e aumentar o sucesso terapêutico pelo sinergismo das duas drogas, uma vez que os mecanismos moleculares da resistência geralmente não se sobrepõem (15). A utilização da terapia empírica para pacientes com infecções semelhantes não tem sido recomendada, além de ocasionar o aumento da resistência com possíveis surtos. Por outro lado, o atraso no tratamento pode gerar graves consequências ao paciente. Para contornar esta situação, os profissionais de saúde devem ficar atentos aos dados nacionais de vigilância da resistência, conhecer o padrão de resistência dos isolados na instituição e os fatores de riscos para tais infecções (16).

Atualmente, os antimicrobianos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação e diferem uns dos outros de acordo com suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas e espectro de ação. Abaixo abordaremos a classificação dos principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de *P. aeruginosa* e seus mecanismos de ação.

### 1.3.1. Antimicrobianos beta-lactâmicos

Os agentes antimicrobianos beta-lactâmicos tem ação bactericida, inibindo enzimas que realizam a síntese da camada de peptidoglicano da parede celular bacteriana. Foram um dos primeiros antimicrobianos descritos e constituem o maior grupo utilizado na prática clínica. A característica comum deste grupo é a presença do anel beta-lactâmico na estrutura química da molécula. Constituintes deste grupo incluem as penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamases (Figura 1.1) (17).

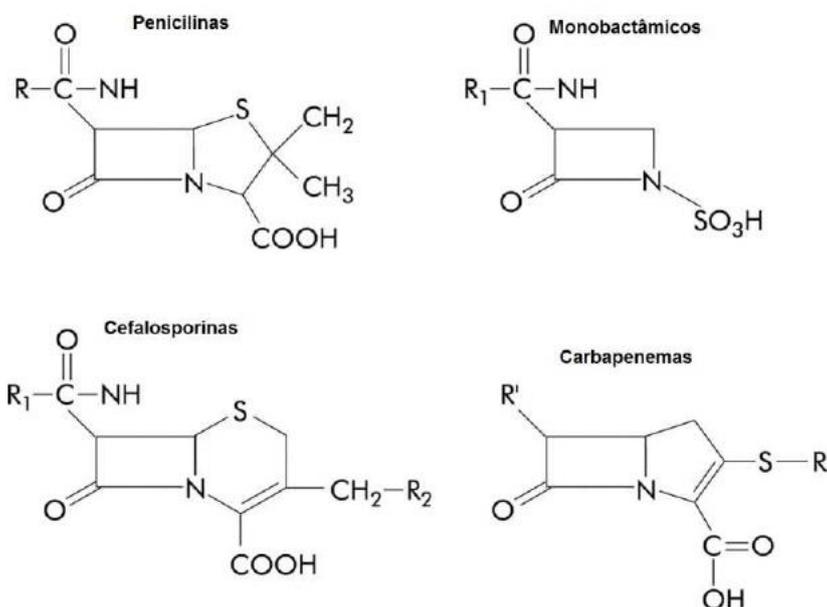


Figura 1.1: Estrutura química dos quatro beta-lactâmicos.

A parede celular das bactérias Gram-negativas é constituída por subunidades de ácido N-acetil murânico e N-Acetilglicosamina que são unidas por cadeias de tetrapeptídeos. A ligação cruzada entre as cadeias de tetrapeptídica é realizada por enzimas do tipo transpeptidases, ocorrendo assim a ligação cruzada de dois aminoácidos D-alanina-D-alanina presente nestas moléculas. As transpeptidases também são conhecidas como Proteínas de Ligação á Penicilina (PBP) e são alvos dos antimicrobianos beta-lactâmicos. O anel beta-lactâmico é quimicamente semelhante à D-alanina-D-alanina, sendo inserido na parede celular pelas PBPs. Quando isto ocorre as PBPs ficam inativadas devido a acilação resultante desta reação, o que leva a um desequilíbrio osmótico e posterior lise celular. A afinidade dos diferentes beta-lactâmicos pelas PBPs difere, porém, a ligação é sempre covalente (17, 18).

As penicilinas foram os primeiros beta-lactâmicos a serem introduzidos na prática clínica, através da penicilina G, no início de 1940. Com o avanço científico e conhecimento sobre a estrutura química da molécula, modificações puderam ser adicionadas alterando seu espectro de ação. As primeiras penicilinas (penicilinas G e V) apresentavam pouca atividade contra bactérias Gram-negativas. Com a adição de um grupo amino a sua estrutura, também chamadas de aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina), estas passaram a apresentar ação contra *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella* e *P. aeruginosa*. Logo após, surgiram as carboxipenicilinas (carboxilina e ticarcilina) e ureído-penicilinas (piperacilina) com maior atividade contra *P. aeruginosa* devido a sua resistência a beta-lactamases do tipo AmpC. No entanto, como é observado, logo após a sua introdução a prática clínica, cepas resistentes puderam ser observadas (19, 20, 21).

As cefalosporinas foram descobertas em 1948 por Guisepe Brotzu em um estudo sobre a descoberta de novos beta-lactâmicos na microbiota de um esgoto. O composto ativo foi isolado do fungo *Cephalosporium*, dando origem as primeiras cefalosporinas. Atualmente estão disponíveis mais de 20 representantes. As cefalosporinas são mais estáveis ao pH e mudanças de temperatura que as penicilinas e começaram, então, a ser utilizadas na prática clínica em 1960 (23).

As cefalosporinas são classificadas, por gerações, que se referem as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. A primeira geração, representada pelas cefalotina, cefazolina e cefalexina, apresentam boa atividade contra Gram-positivos, porém, não para Gram-negativos. As de segunda geração, representadas pelas cefuroxima, cefotetam e cefoxitina, apresentam cobertura moderada para Gram-negativos e tendo maior cobertura contra anaeróbios. As de terceira geração, representadas pelas cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima, apresentam boa atividade contra Gram-positivos e Gram-negativos, especialmente contra Gram-negativos da família Enterobacteriaceae. A ceftazidima é a única cefalosporina de terceira geração com atividade contra *P. aeruginosa*. As de quarta geração são mais estáveis frente a beta-lactamases, sendo representada pela cefepime, ativa contra Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *P. aeruginosa*. Existem ainda as cefalosporinas de quinta geração, sendo a única representante a ceftarolina que é ativa contra Gram-positivos (17).

Os carbapenemas são atualmente uma das principais opções de tratamento para infecções graves e a primeira linha de tratamento para Enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). Apresentam amplo espectro de ação, que incluem Gram-negativos, Gram-positivos e anaeróbios. Estão disponíveis na prática clínica no Brasil quatro tipos: Imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem (22).

O primeiro carbapenema a ser descrito foi isolado do caldo de fermentação do fungo *Streptomyces cattleya*, em 1970, e denominado de *thienamycin*. Logo chamado de imipenem. Apesar de apresentar amplo espectro de ação bacteriana o composto foi susceptível a degradação pela enzima dehidropeptidase-1 (DHP-1), presente nos túbulos renais. Para solucionar tal problema foi adicionado um inibidor de DHP-1, a cilastatina, o que também preveniu sua nefrotoxicidade. Os demais representantes dos carbapenemas são estáveis a ação do DHP-1. Meropenem foi o segundo carbapenema a ser descrito, seguido do ertapenem. Comparado com os demais carbapenemas, o ertapenem é o que possui menor espectro de ação, não sendo ativo contra *Enterococcus*, *P. aeruginosa* e outros não-fermentadores. Doripenem é o carbapenema mais recentemente disponível, apresentando espectro de ação similar ao imipenem e meropenem (22).

Os monobactâmicos foram descritos em 1981, sendo o aztreonam o único representante deste grupo. Além de ser uma opção para pacientes alérgicos as penicilinas é o primeiro entre os beta-lactâmicos com atividade apenas sobre Gram-negativos, podendo ser utilizado em substituição aos aminoglicosídeos devido ao seu espectro de atividade similar, porém com menor potencial de ototoxicidade e nefrotoxicidade. O aztreonam apresenta elevada afinidade pelas PBPs, sendo resistente a hidrólise de beta-lactamases do tipo penicilinas e cefalosporinas (23).

### **1.3.2. Antimicrobianos fluoroquinolonas**

As fluoroquinolonas são uma classe de antimicrobianos de amplo espectro, que compõem uma classe sintética, derivados das quinolonas. A descoberta das quinolonas ocorreu em 1962 por Lesche. A primeira molécula sintetizada utilizada como opção de tratamento foi o ácido nalidíxico, porém com limitada utilização devido a sua baixa difusão pelos tecidos (24, 25).

Outras quinolonas foram desenvolvidas a partir de 1970. Um grande avanço ocorreu com a adição do grupo pipeazínico na posição 7 do ácido nalidíxico, o que levou a outras modificações na estrutura desta molécula. A adição de um átomo de fluor na posição 6 deu início a era das fluoroquinolonas (FQs). Esta adição modificou as propriedades das quinolonas, melhorando sua farmacocinética e farmacodinâmica. O primeiro antimicrobiano sintetizado deste grupo foi a norfloxacin, no final dos anos 80 (26, 27).

As FQs apresentam atividade contra Gram-positivos e Gram-negativos, tendo boa biodisponibilidade por administração oral, toxicidade relativamente baixa e farmacocinética

favorável. Além da sua utilização na medicina humana, esta classe também tem sido bastante utilizada na medicina veterinária (28, 29).

O mecanismo de ação das FQs envolve a inibição da síntese de DNA. Seu principal alvo são as topoisomerasas de DNA, cuja função é realizar quebras transitórias entre as ligações da dupla fita de DNA e seu reparo, modulando assim o super enovelamento do DNA para permitir seu funcionamento adequado e interações com proteínas. Assim, estas enzimas são fundamentais para a replicação do DNA, transcrição, recombinação e remodelação do DNA condensado (25).

Na maior parte das bactérias as topoisomerasas são de dois tipos: a DNA girase e a topoisomerase IV. Ambas estruturalmente semelhantes. A DNA girase é composta por duas subunidades A e duas subunidades B, que são codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, enquanto que a topoisomerase por duas subunidades, codificadas pelos genes *parC* e *parE*. Vale ressaltar que os seres humanos também possuem estas enzimas com significativa semelhança com as de bactérias. Porém, em seres humanos, os genes que codificam as subunidades A e B são fundidos, formando uma única cadeia de polipeptídeo, garantindo assim a discriminação das FQs entre as topoisomerasas humanas e bacterianas (30, 31).

Os principais representantes das FQs são a ciprofloxacina, levofloxacina e a moxifloxacina, sendo a ciprofloxacina a mais utilizada no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*.

### **1.3.3. Antimicrobianos aminoglicosídeos**

O primeiro aminoglicosídeo, descoberto em 1943, foi denominado de estreptomicina. Esta molécula foi isolada de um *Actinomiceto* presente no solo, *Streptomyces griseus*, por Waksman e colaboradores (1979). Após sua descoberta surgiram os aminoglicosídeos semi-sintéticos, como neomicina (1949), canamicina (1957), gentamicina (1963), tobramicina (1968), amicacina (1972), netilmicina (1975) (32).

A estrutura química dos aminoglicosídeos apresenta um ou mais aminoácidos ligado a uma hexose ou aminociclitol por uma ligação glicosídica. São solúveis em água e estáveis em pH 6 a 8, com uma estrutura polar catiônica. Todos os aminoglicosídeos possuem propriedades farmacocinéticas iguais, tendo fraca absorção oral e baixa penetração no espaço intracelular. Em pacientes com função renal normal, possuem meia vida de aproximadamente 2 horas no soro, aumentando conforme a deteriorização da função renal (33, 34).

Os aminoglicosídeos atuam inibindo a síntese proteica pela ligação irreversível a subunidade ribossomal bacteriana 30S. Seu espectro de ação incluem Gram-negativos, Gram-positivos e anaeróbios. Contra enterobactérias e *P. aeruginosa*, gentamicina, tobramicina, netilmicina e ampicilina possuem atividade semelhante, sendo a netilmicina a menos eficaz contra *P. aeruginosa* (34, 35, 36).

Apesar disto, os aminoglicosídeos podem apresentar ototoxicidade, nefrotoxicidade e bloqueio muscular, sendo a nefrotoxicidade o efeito adverso mais comum. Seu uso era restrito ao longo dos anos devido ao surgimento de antimicrobianos de espectro estendido com menor toxicidade. Contudo, nos dias atuais com a falta de opção para o tratamento de Gram-negativos multirresistentes, estes têm sido bastante utilizados. Podem ser utilizados para tratar infecções por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multirresistentes, *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, endocardites por *Enterococcus* (em combinação com vancomicina) e em pacientes com fibrose cística (37, 38).

#### **1.3.4. Antimicrobianos polimixinas**

As polimixinas são polipeptídeos compostos por uma cadeia lateral de ácidos graxos ligados a um anel peptídico policatiônico com dez aminoácidos. Essa propriedade confere a afinidade pelo lipopolissacarídeo (LPS), que possui carga negativa, presente na membrana externa de Gram-negativos, onde as polimixinas atuam desestabilizando o LPS. A ligação ao LPS promove sua absorção e difusão pela parede celular, interrompendo a respiração celular e levando a lise celular (39).

As polimixinas foram descritas em 1947 como produto da bactéria *Paenibacillus polymyxa* encontrada no solo. Na prática clínica existem 2 fórmulas disponíveis, a polimixina B (PB) e a colistina (CT), também chamada de polimixina E. As duas diferem entre si em apenas um aminoácido. Apesar disso, a polimixina B apresenta maior vantagem em relação a colistina, pois a colistina é administrada como droga inativa e sua conversão é lenta (40).

Desde sua descrição, as polimixinas foram usadas para o tratamento de diversas infecções por Gram-negativos, com exceção de gêneros intrinsecamente resistentes a esta classe, como por exemplo, *Proteus*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Morganella* e *Providencia*. Os efeitos colaterais desta classe, mais importantes, incluem a nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Assim, com o surgimento de novos antimicrobianos com amplo espectro e menor toxicidade, o uso das polimixinas diminuiu por volta dos anos de 1970-1980. Porém, com a escassez de novos agentes antimicrobianos e o surgimento da resistência ao tratamento, as polimixinas passaram a ser

utilizadas novamente como último recurso para o tratamento de Gram-negativos. Isso decorre do final dos anos 90, com o aparecimento de Gram-negativos multirresistentes, principalmente devido ao aumento da resistência aos carbapenemas (41).

#### **1.4. Resistência aos antimicrobianos**

A introdução de agentes antimicrobianos abriu novas possibilidades para o tratamento das infecções bacterianas. O surgimento dos antimicrobianos, como as sulfonamidas, e depois a penicilina por Alexander Fleming em 1928 e os antibióticos sintéticos, como as quinolonas foram alguns dos grandes marcos da ciência. No entanto, com o progresso no desenvolvimento destes, têm surgido patógenos resistentes de forma cada vez mais generalizada, o que representa um problema de saúde mundial. A rápida disseminação da resistência tem sido maior do que os avanços no desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas, especialmente para bactérias Gram-negativas (42).

Especialistas chamam a atenção para o futuro destas infecções, onde se estima não haver mais tratamento para infecções bacterianas, tanto no hospital, quanto na comunidade, nas próximas décadas. Como prova desta preocupação, o CDC (*Center for Disease Control and Prevention - EUA*) declarou em 2013 a era pós-antimicrobiana e a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 reconheceu a resistência antimicrobiana como uma ameaça a saúde pública mundial e alertou para a necessidade de esforços para conter sua disseminação e desenvolvimento de novos fármacos (43, 44, 45).

Países em desenvolvimento têm sido apontados com um importante papel no surgimento e disseminação da resistência, o que inclui pacientes susceptíveis a infecções, pela presença de doenças de base e má nutrição, aglomerados populacionais, que favorecem a disseminação de micro-organismos, sistema de saúde falho e uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos. Além de seu uso na agricultura e criação de gado, gerando pressão seletiva para o surgimento de micro-organismos resistentes (43, 46).

Diante destas medidas e necessidade da contenção do surgimento da resistência, o CDC classificou as infecções por bactérias resistentes em “urgente”, “sério” e “potencial ameaça” de acordo com os critérios: impacto clínico, impacto econômico, incidência, transmissibilidade, disponibilidade de antimicrobianos eficazes e barreiras para prevenção. Chamamos atenção para *P. aeruginosa* multirresistente, foco deste estudo que é considerada pelo CDC como causa de infecções sérias (45).

As opções terapêuticas para *P. aeruginosa* são limitadas devido a sua resistência intrínseca, podendo adquirir novos mecanismos durante a infecção. *P. aeruginosa* é

naturalmente resistente a penicilina G, aminopenicilinas, incluindo associações com inibidores de beta-lactamases, a cefalosporinas de primeira e segunda geração, quinolonas, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol (46).

A resistência intrínseca refere-se a resistência comum a todos os isolados e é consequência da seleção genética de mecanismos cromossomais. A resistência adquirida ocorre pela aquisição de mecanismos adicionais ou como consequência de processos mutacionais sob pressão seletiva. Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* incluem: a produção de enzimas, falta de afinidade do sítio alvo do antimicrobiano, baixa permeabilidade da membrana e sistemas de efluxo (43, 44).

## **1.5. Mecanismo de resistência aos antimicrobianos**

### **1.5.1. Mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos**

#### **1.5.1.1. Alteração das Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs)**

Em *P. aeruginosa* são bem conhecidas sete diferentes PBPs: 1a, 1b, 2, 3, 4, 6 e 7, tendo funções essenciais e não essenciais para a célula. Alterações nessas proteínas poderiam levar a resistência aos antimicrobianos, porém este fenômeno é mais comum em bactérias Gram-positivas (43, 47). Apesar disto, sabe-se que alterações na PBP-3 aumenta a resistência aos beta-lactâmicos e alterações na PBP-4 já foram relatadas durante o tratamento com imipenem e piperacilina/tazobactam. Essas alterações podem se dar por mudanças nas PBPs e perda da afinidade ao antimicrobiano ou por uma maior expressão desta, como relatado para PBP-2 e PBP-3 quando tratadas com imipenem (47, 48, 49).

#### **1.5.1.2. Beta-lactamases**

Em bactérias Gram-negativas a produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência a esta classe de antimicrobianos. As beta-lactamases atuam hidrolizando o anel beta-lactâmico. Se concentram no espaço periplasmático e desta forma impedem a ligação do anel beta-lactâmico com as PBPs. Os genes de beta-lactamases podem estar contidos em plasmídeos ou no cromossomo (50).

As beta-lactamases possuem amplo espectro funcional, o que dificulta sua classificação. Atualmente têm sido utilizado duas classificações. Uma proposta por Ambler (1980), baseada na sequência aminoacídica e estrutura química e outra proposta por Bush, Jacoby e Medeiros

(1995), baseada nas características funcionais. A classificação de Bush, Jacoby e Medeiros é a mais aceita e divide as beta-lactamases em quatro grupos funcionais e subgrupos, sendo a última revisão realizada em 2011 (51, 52) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Classificação das beta-lactamases segundo Bush, 2011 (52).

Grupo Funcional Bush-Jacob	Classe Molecular	Exemplos	Características	Inibida por ácido clavulânico ou tazobactam	Inibida por EDTA
1	C	AmpC de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1.	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Confere resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto os carbapenemas.	Não	Não
1e	C	GC1, CMY-37.	Enzimas que promovem a hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.	Não	Não
2a	A	PC1 e outras penicilinases de <i>Staphylococcus</i> sp.	Penicilinases produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. E <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	Sim	Não
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações.	Sim	Não
2be	A	ESBL: CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26,	Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.	Sim	Não
2br	A	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações.	Não	Não
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos.	Não	Não

2c	A	PSE-1, CARB-3	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina.	Sim	Não
2d	D	OXA-1, OXA-10	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina.	Variável	Não
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro.	Variável	Não
2df	D	OXA-23, OXA-48	Hidrolisam carbapenemas e cloxacilina.	Variável	Não
2e	A	CepA	Cefalosporinases	Sim	Não
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo.	Sim	Não
3a	B	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1, SPM-1	Hidrólise de todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos.	Não	Sim
3b	B	CphA, Sfh-1	Hidrólise preferencial de carbapenemas.	Não	Sim

As classes A, C e D possuem uma serina no seu sítio ativo, sendo, portanto, serino-dependentes, enquanto que a classe B, chamada de metalo-beta-lactamase (MBL), utiliza o zinco como co-fator para sua atividade hidrolítica. Em *P. aeruginosa* já foram descritas beta-lactamases de todas estas classes, incluindo beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e com atividades de carbapenemases (53).

As penicilinas da família PSE, CARB (subgrupo 2c) e TEM (subgrupo 2b) são comumente encontradas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* e seu impacto na terapia antimicrobiana é limitado por não apresentar atividade sobre cefalosporinas de espectro ampliado, monobactâmicos e carbapenemas. Sendo a predominante as enzimas pertencentes a família PSE. As enzimas do tipo OXA também têm sido descritas em isolados de *P. aeruginosa*, porém com espectro limitado, o que inclui os subgrupos 2d e 2de (43, 47, 54).

As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* passaram a ser mais limitadas com o surgimento de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). As ESBLs estão incluídas na classe A de Ambler, subgrupo 2be (classificação de Bush, Jacoby e Medeiros), inibidas por inibidores de serino-beta-lactamases (ácido clavulânico e tazobactam), foram descritas inicialmente em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* e logo se disseminaram para outras espécies de enterobactérias e BGN-NF, como *P. aeruginosa*. As ESBLs passaram a ser descritas em *P. aeruginosa* no início da década de 90 e as enzimas do tipo TEM, SHV, PER, VEB, GES, BEL e CTX-M têm sido descritas em diferentes regiões do mundo, incluindo o Brasil (47).

*P. aeruginosa* produz uma beta-lactamase cromossomal de Classe C, subgrupo 1, chamada de AmpC, que também é produzida por algumas espécies da família *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii* e *Morganella morganii*) (52, 55, 56).

AmpC é expressa em níveis basais não apresentando resistência relevante, sendo a *P. aeruginosa* susceptível às ureido-penicilinas, combinações com inibidores, cefalosporinas e carbapenemas. Porém, esta enzima pode ser induzível ou pode ocorrer uma desrepressão do regulador do gene *ampC* levando a altos níveis de AmpC. Quando este fenômeno ocorre, os isolados de *P. aeruginosa* podem desenvolver resistência a todos os beta-lactâmicos com exceção dos carbapenemas. Super expressão de AmpC, normalmente, também está associada a outros mecanismos não enzimáticos, como a perda de porinas ou expressão de bombas de efluxo, o que eleva os níveis de resistência a todos os beta-lactâmicos. Esta enzima pode ser inibida pelo avibactam, um novo inibidor de beta-lactamase de classe A utilizado na prática clínica (55, 57).

Nos últimos anos, concomitante a grande utilização de antimicrobianos de amplo espectro, é possível observar, a emergência de *P. aeruginosa* multirresistentes. Com o surgimento desses isolados cada vez maior, uma das principais opções terapêuticas se tornou os carbapenemas. Porém, como ocorreu para os demais antimicrobianos, com o seu maior uso, índices crescentes de resistência é observado em diferentes regiões do mundo (57).

A resistência aos carbapenemas pode ser mediada por diferentes mecanismos, entretanto a produção de carbapenemases (beta-lactamases com atividade sobre carbapenemas) é apontada como o mecanismo mais importante. As carbapenemases são divididas em três classes, classe A subgrupo 2f, classe B subgrupo 3a e classe D subgrupo 2df. Dentre essas, as de maior importância e mais disseminadas em isolados de *P. aeruginosa* são as de classe B também chamadas de metalo-beta-lactamases (MBL) (58).

#### **1.5.1.2.1. Carbapenemases de classe A**

As carbapenemases de classe A são classificadas dentro do subgrupo 2f e incluem as enzimas das famílias NMC, IMI, SME, KPC e GES. Foram descritas inicialmente em isolados da família *Enterobacteriaceae* e são inibidas por tazobactam, ácido borônico e, avibactam. Recentemente, uma nova enzima desta classe foi descrita em nosso país, em três isolados de *K. pneumoniae* em São Paulo e denominada de BKC-1. Estas enzimas tem a capacidade de hidrolizar uma grande variedade de beta-lactâmicos, incluindo as penicilinas, aztreonam, cefalosporinas e carbapenemas (59, 60).

A família SME-1 tem sido associada a isolados de *S. marcescens* e teve sua primeira detecção na Inglaterra em 1982 (61). As famílias IMI e NMC possuem 97% de identidade entre a sequência de aminoácidos entre si e 70% de similaridade com a SME-1 e são descritas em *Enterobacter* spp.. Estas enzimas têm sido descritas nos Estados Unidos, França e Argentina. Os genes destas três famílias de carbapenemases de classe A têm sido descritos como parte do cromossomo bacteriano o que pode explicar a baixa disseminação destas enzimas. Até o momento, não há relatos destas enzimas em *P. aeruginosa* (61, 62, 63, 64, 65).

A família GES foi inicialmente classificada como ESBL, porém variantes com atividade sobre os carbapenemas têm sido descritas, entre elas a GES-2 na África do Sul, GES-5 no Brasil, GES-13 na Grécia, GES-18 na Alemanha e GES-9 na França. Seu espectro de ação é amplo e diversificado, podendo apresentar baixos níveis de hidrólise sobre os carbapenemas. Os genes *bla<sub>GES</sub>* têm sido relatados em integrons inseridos em plasmídeos (66, 67, 68, 69).

Dentre as carbapenemases de classe A, a mais disseminada mundialmente e de grande importância epidemiológica é a do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase). KPC

foi descoberta através de um projeto de vigilância na Carolina do Norte em 1996 em um isolado de *K. pneumoniae*. Este isolado apresentou resistência a todos os beta-lactâmicos testados, com MICs diminuídas na presença de ácido clavulânico (70).

Logo foi descrita uma segunda variante, com mudança de um único aminoácido, denominada KPC-2 com maiores relatos nos Estados Unidos. Estudos posteriores demonstraram que a KPC-1 e a KPC-2 se tratavam da mesma enzima e passou a ser designada como KPC-2. Com o aumento dos relatos de KPC-2, surgiu a KPC-3 entre os anos de 2000-2001 em isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. em Nova York. KPC-3 apresenta cinética de hidrólise similar às demais KPC, com um ligeiro aumento para hidrólise para ceftazidima (71, 72, 73).

O surgimento da KPC veio acompanhado de sua rápida disseminação entre diferentes países e espécies bacterianas, mostrando a capacidade de disseminação deste gene. Até o momento foram descritas vinte e quatro variantes alélicas de KPC (segundo o site <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>, acesso em 09 de junho de 2016), sendo a prevalente no mundo a KPC-2 (73). Em *P. aeruginosa* já foram descritas 2 variantes, a KPC-2 e a KPC-5 (74, 75).

O gene de KPC tem sido encontrado em plasmídeos associado a sequências de inserção e/ou transposons, o que pode justificar a sua rápida disseminação mundial. Além disso, esse gene tem sido mais relatado na espécie *K. pneumoniae* que é bem conhecido por acumular e disseminar determinantes de resistência (61, 76).

O principal responsável pela disseminação de KPC tem sido o transposon Tn4401, pertencente a família dos transposons tn3. Este transposon é composto por uma transposase (tnpA), resolvase (tnpR), *bla*<sub>KPC</sub>, duas sequências de inserção, IS*Kpn7* e IS*Kpn6* e das sequências invertidas de 39 pb que flanqueiam o transposon. Apesar disto, *bla*<sub>KPC</sub> pode ser encontrado em outras plataformas genéticas menos comum, o transposon Tn5563 tem sido identificado em isolados de *P. aeruginosa* produtoras de KPC-5 em Porto Rico (75, 77).

Esta carbapenemase tem sido descrita em diversas regiões do mundo, entre elas nas Américas (Estados Unidos, Canadá Colômbia, Argentina, Brasil), Europa (Espanha, Portugal, Reino Unido, Irlanda, França, Polônia, Grécia, Itália e Israel), Ásia (Índia e China) e Oceania (Austrália e Nova Zelândia). No Brasil, esta carbapenemase foi identificada em um isolado de *K. pneumoniae* isolada em 2006 de um paciente de UTI em um hospital em Recife, seguida de sua disseminação no território brasileiro. (78, 79).

Em *P. aeruginosa* a primeira detecção de KPC no Brasil ocorreu em Recife, a partir de isolados de secreção traqueal de dois pacientes na UTI em 2010, sendo susceptível apenas a gentamicina e polimixina B (80). Antes deste relato, foi identificado em Recife um isolado de

*P. putida* produtora de KPC-2 proveniente em um paciente de 8 anos internado na Oncologia Pedrátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz em 2008, susceptível apenas a polimixina B (80, 81).

#### 1.5.1.2.2. Carbapenemases de classe B

As carbapenemases de classe B, também chamadas de Metallo-beta-lactamases (MBL), pertencem ao grupo 3a subclasse B, hidrolisam todos os beta-lactâmicos com exceção do aztreonam (monobactâmico), necessitam de íons de  $Zn^{+2}$  ou outros cátions divalentes como cofator enzimático e por isso são inibidas por agentes quelantes, como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), derivados do tiol e ácido dipicolínico. Estas enzimas podem ser divididas em MBLs intrínsecas e adquiridas. As primeiras MBLs foram detectadas na década de 60 porém somente na década de 90 ganharam a definida importância devido a sua disseminação entre os bacilos Gram-negativos associados a infecções hospitalares (73, 82).

Os genes de MBLs podem ser divididos ainda em 3 grupos (B1-B3) de acordo com a homologia das sequências, as MBLs clinicamente importantes são agrupadas no grupo B1 e incluem VIM, IMP, NDM, SPM, GIM, SIM, KHM, AIM, DIM, SMB, TMB e FIM. A maioria das MBLs são associadas a integrons, presentes em plasmídeos, o que pode facilitar sua aquisição e disseminação. Dentre estas, as mais importantes mundialmente são a IMP, VIM e NDM, e particularmente no Brasil, a SPM (73, 83).

As enzimas do tipo IMP (*Imipenemase*) tiveram sua descrição em um isolado de *Serratia marcescens* no Japão em 1991. O gene estava presente em um integron de classe 1 localizado em plasmídeo de fácil conjugação, onde logo após seu relato este gene se disseminou para outras espécies de bactéria Gram-negativas. Em *P. aeruginosa* este gene teve sua primeira descrição no Japão em 1999 (65, 84, 85). Até o momento existem 53 variantes alelicas descritas (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> acesso dia 18 de julho de 2016). Estes genes têm sido descritos em diferentes países como Brasil, Portugal, Japão, China, Índia, Reino Unido, Austrália, Turquia, entre outros países (86, 87, 88).

As enzimas do tipo VIM (*Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase*) possui atividade hidrolítica similar as carbapenemases do tipo IMP, com similaridade de aminoácidos inferior a 40%. VIM-1 foi descrita em *P. aeruginosa* em 1999 na Itália e logo se disseminou para outras espécies. O gene *blavim* também tem sido descrito em integrons de classe 1 associados a plasmídeos de fácil conjugação. Até o momento, já foram descritas 46 variantes alelicas (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> acesso dia 18 de julho de 2016). VIM tem sido descrita em diferentes países, como Turquia, França, Itália, Hungria, Portugal, entre

outros. Nas Américas é responsável por surtos esporádicos nos Estados Unidos, México, Venezuela, Colômbia, Argentina e Brasil, com prevalência de VIM-2 e VIM-16 em *P. aeruginosa* (89, 90).

Enzimas do tipo NDM (*New Delhi Metallo-beta-lactamase*) foram descritas em 2008, em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* na Suécia, em um paciente internado anteriormente em um hospital em Nova Deli, na Índia. A NDM possui similaridade de 32% com a VIM e está presente em plasmídeos associada a sequências de inserção do tipo IS*Aba125*. Foram descritas 16 variantes alélicas da NDM (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> acesso dia 18 de julho de 2016), sendo as variantes alélicas -4, -5 e -7 com maior atividade sobre os carbapenemas. Existem relatos de surtos em hospitais de todo o mundo, incluindo Itália, Reino Unido, Turquia, China, Colômbia, Guatemala, Canadá, Estados Unidos e Brasil. Apesar de prevalente em *Enterobacteriaceae*, bactérias Gram-negativas como *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. podem vir a adquirir este mecanismo de resistência. Na França, em 2012, o gene *bla*<sub>NDM</sub> foi identificado em *P. aeruginosa* em um paciente com histórico de internação na Sérvia, desde então este gene tem sido descrito em *P. aeruginosa* na Índia, Itália, Egito, Eslováquia (86, 89, 90, 91, 92, 93).

A carbapenemase do tipo SPM (São Paulo Metallo-beta-lactamase) é particularmente disseminada e problemática no Brasil. Em 1997 foi descrita em *P. aeruginosa* sensível somente as polimixinas, recuperada de um paciente internado no Instituto de Oncologia Pediátrica de São Paulo. Este gene apresenta 35,5% de similaridade com a IMP-1 e não é carregado por integron de classe 1, como descrito para as demais MBLs. Em vez disso, a SPM-1 foi descrita em um elemento integrativo e conjugativo denominado ICE<sub>Tn4371</sub>6061 presente em uma ilha genômica chamada ICE*Pae*SP. Fora do Brasil, esse gene foi identificado em um isolado de *P. aeruginosa* na Suíça, em 2010, porém, o paciente infectado tinha sido transferido do Brasil. Mais recentemente, SPM foi descrita em um isolado no Reino Unido e apontado como consequência do turismo dado pelos eventos sediados no Brasil (93, 94, 95, 96, 97).

### 1.5.1.2.3. Carbapenemases de classe D

As carbapenemases de classe D, também conhecidas como oxacilinasas (OXA), possuem amplo espectro de atividade. Já foram descritos 498 alelos desta classe e as que possuem atividade sobre os carbapenemas se enquadram no subgrupo 2df (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> acesso dia 18 de julho de 2016). As OXAs são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e fortemente inibida por cloreto de sódio. Estes genes também podem ser encontrados em elementos genéticos móveis que facilitam a sua disseminação, como integrons, sequências de inserção e transposons (98).

*P. aeruginosa* possui a OXA-50 de forma cromossômica e intrínseca, com espectro restrito, contribuindo para diminuição da susceptibilidade a ampicilina e ticarcilina, e em alguns casos, ao imipenem (99). Outras OXAs com atividades restritas têm sido descritas em isolados de *P. aeruginosa*, porém com impacto clínico limitado. Entre as OXAs com atividades sobre os carbapenemas destacam-se as famílias da OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 prevalentes em *Acinetobacter* spp. e a família da OXA-48 prevalente em enterobactérias (100, 101).

A OXA-48 teve sua primeira descrição em um isolado de *K. pneumoniae* na Turquia em 2001 em *P. aeruginosa*, sendo este gene já foi detectado na Índia. No Brasil, estudos demonstram haver a predominância da OXA-370, uma variante alélica da OXA-48, que tem sido descrito em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae* (102, 103).

### 1.5.1.3. Alteração da permeabilidade através de porinas

A membrana de bactérias Gram-negativas é composta por fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e proteínas de membrana externa, as OMPs (*outer membrane protein*). As OMPs, também denominadas de porinas, são proteínas em forma de barril que atravessam a membrana agindo como canal para entrada de moléculas e nutrientes, podendo permitir a entrada de toxinas e antimicrobianos. Alterações, modificações e redução de determinadas porinas podem contribuir para a resistência aos antimicrobianos (104).

As porinas permitem a difusão, principalmente, de substratos hidrofílicos, como os beta-lactâmicos. Alterações nestas proteínas poderiam alterar a entrada dos beta-lactâmicos na célula bacteriana (105).

As porinas podem ser classificadas de acordo com a sua atividade, estrutura e regulação. Em *P. aeruginosa* são bem conhecidas as porinas OprC, OprD, OprE e OprF (105, 106, 107, 108). As porinas OprC e OprE são inespecíficas, enquanto a OprF permite a passagem da

maioria dos beta-lactâmicos e é a mais abundante da membrana externa de *P. aeruginosa*, apesar disto, os carbapenemas, principalmente o imipenem, utilizam a OprD como via de entrada na célula bacteriana (104).

A OprD é uma porina substrato-específico que permite a difusão de aminoácidos básicos para a célula. Também é capaz de permitir a entrada dos carbapenemas, devido ao sítio de ligação nas alças 2 e 3, com maior afinidade para o imipenem. Alterações nesta porina mostram significativa perda da susceptibilidade ao imipenem e quando associada a outros mecanismos, como a superexpressão de sistemas efluxo, causa diminuição da susceptibilidade aos demais carbapenemas (109, 110).

Estudos vem demonstrando a perda de uma proteína de membrana externa de 45~49 kDa em isolados resistentes ao imipenem, correspondente a OprD. Grande parte dos isolados, resistentes aos carbapenemas apresentam algum defeito na sua expressão (111).

Esta resistência mediada pela OprD pode ocorrer por diversos fatores em níveis transcricional da proteína e/ou mutações no seu gene. Os processos mutacionais incluem mutações, deleções e/ou inserções criando alterações no quadro de leitura da proteína e/ou códons de parada. Alguns pesquisadores sugerem que a perda de OprD pode ser o primeiro mecanismo de resistência aos carbapenemas induzido pela pressão seletiva. O surgimento de isolados clínicos de *P. aeruginosa* defeituosos para OprD podem reduzir a eficácia dos carbapenemas (112, 113).

#### **1.5.1.4. Hiperexpressão de Sistemas de Efluxo**

Sistemas de efluxo são amplamente distribuídos em bactérias e constituem um mecanismo de extrusão de moléculas tóxicas da célula para o fora. Esses sistemas muitas vezes são hiperexpressos e apresentam resistência cruzada a diferentes classes de antimicrobianos, além de associado a baixa permeabilidade da membrana pela OprD e produção de beta-lactamases (114).

Existem cinco famílias de sistemas de efluxo classificadas de acordo com a fonte de energia utilizada, relação filogenética e especificidade de substratos. Entre elas a família ABC ("ATP binding cassette"), MFS ("major facilitator superfamily"), SMR ("small multidrug resistance"), MATE ("multidrug and toxic compound extrusion") e RND ("resistance-nodulation division") (113, 115).

Dentre as cinco famílias, a que mais se destaca causando resistência aos antimicrobianos são as da família RND. Com a análise do sequenciamento do genoma da *P. aeruginosa*, PAO1 (Genebank NC\_002516.2) foi possível identificar doze sistemas de efluxo da família RND.

Esses genes são organizados em forma de operons, tendo um gene regulador, em alguns, um gene repressor e o sistema de três componentes, composto por: um gene que codifica uma proteína citoplasmática, dependente de energia (Mex); um gene que codifica uma proteína de membrana externa, também conhecida como porina (OprN, OprM, OprJ, OmpG, OmpB, OmpI); e um gene que codifica uma proteína que liga estes dois componentes, atravessando o espaço periplasmático (também chamada de Mex) (116) (Figura 1.2).



Figura 1.2.: Contexto genético dos sistemas de efluxo RND em *P. aeruginosa*.

Destes, pelo menos dez, são caracterizados: MexAB-OprM (ABM), MexCD-OprJ (CDJ), MexEF-OprN (EFN), MexXY-OprM (XY), MexJK-OprM, MexGHI-OpmD, MexVW-OprM, MexPQ-OpmE, MexMN-OprM e TriABC-OpmH. Alguns destes são expressos em níveis basais (MexAB-OprM) e tem papel na resistência intrínseca de *P. aeruginosa*, outras são induzidos em resposta ao antimicrobiano (MexXY-OprM) ou sem expressão na ausência do antimicrobiano (MexCD-OprJ e MexEF-OprN) (114, 117).

Sabe-se que a pressão seletiva, pelo uso de um antimicrobiano, pode levar e selecionar mutações nos diferentes sistemas de efluxo e assim levar a resistência cruzada a todos os antimicrobianos que são substratos de tal sistema de efluxo. Os sistemas de maior destaque no ambiente hospitalar incluem o ABM, CDJ, EFN e o XY (118).

O sistema ABM tem um importante papel na resistência intrínseca e adquirida a diversas classes de antimicrobianos e seus substratos incluem os beta-láctamicos, exceção do imipenem, fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, entre outros. Esse sistema é expresso constitutivamente, porém mutações nos seus genes reguladores levam a sua hiperexpressão. Quando essas mutações ocorrem no seu gene repressor, *mexR*, os mutantes são chamados *nalB* e quando o *mexR* está intacto e ocorrem mutações no gene PA3721, são chamados de *nalC*. O gene PA3721 atua como repressor do *mexR* (119).

O sistema CDJ exporta quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, entre outros, não é expresso constitutivamente, porém mutações no gene repressor levam a sua expressão (120).

O sistema XY leva a diminuição da susceptibilidade aos aminoglicosídeos, tetraciclina, eritromicina, fluoroquinolonas, entre outros. Este sistema é responsável pela resistência intrínseca e a ausência de atividade do seu repressor, por mutações, leva a sua hiperexpressão (121, 122).

A expressão do sistema EFN é dependente de uma proteína ativadora da transcrição, MexT, inativa em isolados selvagens. Mutações no gene regulador pode gerar um mutante chamado *nfxC* que apresenta expressão deste sistema, uma vez que o *mexT* é suficiente para ativar a expressão deste sistema, conferindo assim, resistência às fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim e de forma indireta ao imipenem pela regulação pós-transcricional da OprD. Esse sistema ainda é capaz de regular negativamente a expressão dos sistemas ABM e XY, além de estar envolvido no efluxo de moléculas do sistema de *Quorum Sensing* (QS) e assim, contribuindo para virulência nestes isolados (123).

O sistema EFN possui também um regulador negativo, *mexS*, que regula o regulador positivo, *mexT*, onde Sobel e colaboradores identificaram que a hiperexpressão deste sistema também pode se dar pela desregulação do *mexS*, levando a diminuição da expressão de *oprD* de forma indireta (124).

A tabela 1.2. exemplifica alguns dos fenótipos obtidos pelos diferentes mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos aqui abordados.

Tabela 1.2.: Fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos obtidos pelos principais mecanismos de resistência descritos em *P. aeruginosa*.

Antimicrobiano	Fenótipo selvagem	AmpC	ESBL	Carbapene mase				Sistema de efluxo			Mutações na oprD
				CTX-M	PER	A	B	D	ABM	CDJ	
Ticarcilina	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
Piperacilina	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S
Piperacilina + tazobactam	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
Ceftazidima	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S
Cefepime	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
Aztreonam	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	R	R	R/S	S	S	R	R

Legenda: S, sensível; R, resistente; R/S, pode ser sensível ou resistentes. Adaptado de BĂLĂȘOIU e colaboradores (2014) (125).

## 1.5.2. Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos

A resistência aos aminoglicosídeos pode se dar por diferentes mecanismos, entre eles a alteração da permeabilidade de membrana, sistemas de efluxo, produção de enzimas e menos frequentemente a alteração do sítio alvo. São bem conhecidos e discutidos a produção de enzimas e os sistemas de efluxo.

### 1.5.2.1. Alteração da permeabilidade de membrana

A diminuição da concentração de todos os aminoglicosídeos no interior da célula bacteriana pode se dar pela redução da sua acumulação na célula, dada pela diminuição da permeabilidade ou extrusão da droga. Logo, a resistência aos aminoglicosídeos pela diminuição da permeabilidade da membrana se dá principalmente por sistemas de efluxo e, em poucos casos, pela perda de porina. Em pacientes com FC, isolados de *P. aeruginosa* resistentes a

amicacina, gentamicina e tobramicina, tem sido observado alterações na membrana externa que levam a diminuição da captação do antimicrobiano. Apesar disso, estudos mostram a hiperexpressão de bombas de efluxo como principal mecanismo associado (126, 127, 128).

Estudos *in vitro* demonstraram o que parece acontecer *in vivo*, onde *P. aeruginosa* pode se adaptar e crescer na presença de um aminoglicosídeo e perder essa resistência na ausência do antimicrobiano, mostrando a capacidade de adaptação destes isolados. Isso ocorre principalmente pela expressão da bomba de efluxo (122).

Como visto anteriormente, os sistemas de efluxo da família RND são os mais associados a resistência e muitas vezes esses sistemas são capazes de atuar em mais de uma classe de antimicrobianos. Em isolados clínicos resistentes tem sido observado um aumento na expressão do sistema MexXY-OprM e em menor proporção o sistema MexAB-OprM. Estudos também demonstraram que mutações no regulador positivo, *mexZ*, do sistema de efluxo MexXY-OprM, levam a sua hiperexpressão, porém em isolados clínicos de *P. aeruginosa* nem sempre esse fenômeno é observado, sugerindo outros mecanismos de regulação deste sistema de efluxo (129).

Outros mecanismos associados a resistência aos aminoglicosídeos por alteração da permeabilidade envolvem mutações no sistema *phoQ-phoP*, que também gera resistência as polimixinas, e alterações no transporte de elétrons que também alteraria a absorção das moléculas de aminoglicosídeos (130).

### 1.5.2.2. Mecanismos enzimáticos

As Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMA) são determinantes de resistência comuns em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Muitos isolados carregam mais de uma destas enzimas, levando a um fenótipo de resistência aos diferentes tipos de aminoglicosídeos disponíveis na prática clínica. Estas enzimas, relatadas desde 1960, atuam adicionando radicais químicos as moléculas dos aminoglicosídeos e, por isso, são classificadas em fosfotransferases (APH) que fosforilam a molécula, acetiltransferase (AAC) que acetilam a molécula e as adeniltransferases (ANT) que fazem adenilação da molécula. Essas alterações na estrutura química da molécula levam a perda de afinidade pelos ribossomos (131).

As AAC são as mais comuns em isolados de *P. aeruginosa* e realizam a acetilação de uma das posições 1, 3, 6' e 2' na molécula de aminoglicosídeo. As enzimas que acetilam na posição 3, AAC (3), e posição 6', AAC (6'), foram as primeiras a serem descritas e são as mais comuns. AAC (6') subfamília I, confere resistência a tobramicina, netilmicina, canamicina e amicacina, enquanto a AAC (6')-II confere resistência a tobramicina, netilmicina, canamicina

e gentamicina. As que acetilam na posição 3, AAC (3)-I, compõem uma família com três variantes, A, B e C, sendo um determinante de resistência a gentamicina, enquanto a ACC (3)-II e ACC (3)-III levam resistência a tobramicina, gentamicina, netilmicina e canamicina, sendo menos comuns em *P. aeruginosa*. As AACs podem estar associadas a elementos genéticos móveis, como integrons, transposons, plasmídeos e sequências de inserção, o que garantem sua disseminação entre diferentes espécies bacterianas, incluindo Gram-positivos e Gram-negativos (132, 133).

As fosfotransferases são descritas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* a mais de 30 anos, atuam adicionando um radical fosfato na posição 3'-OH da molécula de aminoglicosídeo. A APH (3')-I e II são as predominantes, enquanto que a APH (3')-IIb é codificada cromossomicamente e responsável pela falta de sensibilidade a canamicina em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (134, 135).

As EMAs do tipo ANT adicionam um AMP (adenosina 3',5'-monofosfato), vindo de um ATP, para a molécula do aminoglicosídeo nas posições 4' e 2''. O ANT (2)-I é o principal responsável pela resistência a gentamicina e tobramicina nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* (136).

A metilação do 16S rRNA, através das enzimas 16s RNA metilases surgiu como um novo mecanismo de resistência. Estas enzimas atuam metilando o RNA alvo das moléculas dos aminoglicosídeos fazendo com que estes percam a sua afinidade. Este tipo de mecanismo confere altos níveis de resistência a todos os aminoglicosídeos, uma vez que atuam no alvo dos aminoglicosídeos. Estas enzimas foram descritas em 2003, em isolados de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, porém já eram descritos em *Actinomicetos*, conferindo uma resistência intrínseca a este gênero (137, 138).

Já foram descritos 10 tipos de 16S rRNA metilase: ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH e NpmA. Em *P. aeruginosa* foram relatadas RmtA, RmtD e ArmA, sendo a RmtD a mais frequente no Brasil (139, 140, 141).

### **1.5.3. Mecanismos de resistência as fluoroquinolonas**

A resistência às FQs é cada vez mais comum e pode ocorrer por diferentes mecanismos, entre eles: mutações no sítio alvo das FQs, resistência mediada por genes plasmidiais (PMQR) e alterações na permeabilidade de membrana que envolvem a perda de porinas e superexpressão de bombas de efluxo.

### 1.5.3.1. Modificações do sítio alvo

O mecanismo mais comum de resistência a esta classe inclui mutações nos genes das enzimas alvo das FQs, o que incluem as DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e topoisomerases do tipo IV (*parC* e *parE*). Estas mutações ocorrem em regiões específicas da sequência gênica destas enzimas, chamadas de Região Determinante de Resistência as Quinolonas (QRDRs). Mutações nestas regiões levam a alterações de aminoácidos na estrutura da proteína e subsequente falta de afinidade pela droga, levando a sua resistência (142).

O principal alvo das FQs são as subunidades A da DNA girase (gene *gyrA*), logo, mutações que levam a resistência são observadas principalmente neste gene. Apesar disto, mutações no gene *parC* estão associadas a altos níveis de resistência, mas ocorrem de forma secundária. Essas mutações pontuais no gene *gyrA* ocorrem nas posições 83 e 87 da sequência aminoacídica, levando a alteração de uma serina e asparagina no resíduo 83, respectivamente. A alteração na posição 87 leva a substituição de treonina (T) para uma isoleucina (143).

### 1.5.3.2. Alterações na permeabilidade de membrana

Assim como para outros antimicrobianos, a dupla membrana das bactérias Gram-negativas representa uma barreira seletiva, impedindo a entrada de moléculas hidrofílicas. Assim, para que estas moléculas entrem na célula bacteriana necessitam de proteínas de membrana externa. Alterações nestas proteínas também podem afetar a entrada das FQs, assim, quando associado a sistemas de efluxo podem gerar um fenótipo de não susceptibilidade. Geralmente esses mecanismos são associados a outros, como mutações nos genes alvos (144).

Em *P. aeruginosa*, os quatro principais sistemas de efluxo (ABM, CDJ, EFN e XY) apresentam afinidade para as FQs. O mecanismo de superexpressão é o mesmo já descrito para os demais antimicrobianos (117).

### 1.5.3.3. Resistência mediada por genes plasmidiais

Este mecanismo de resistência foi descrito em 1990 e reportado em espécies da família *Enterobacteriaceae*. Estes genes, chamado de *qnr* (*quinolone resistance*), têm a função de se ligar a DNA girase e a topoisomerase IV e impedir a ligação da FQs com seu alvo, levando a diminuição da sua susceptibilidade. São descritas seis famílias de genes *qnr*: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, e *qnrVC*, presentes nas famílias de *Enterobacteriaceae* e *A. baumannii*, porém em *P. aeruginosa* ainda não existem relatos (145, 146).

Além desses genes, também sido descrito que a EMA AAC(6<sup>+</sup>)-Ib-cr é capaz de realizar a acetilação das FQs, assim como ocorre para os aminoglicosídeos. Sistemas de efluxo

plasmidiais também já foram descritos, como QepA e OqxAB (família MSF), que atuam como os demais sistemas, porém nenhum destes mecanismos foram descritos, até o momento, em *P. aeruginosa* (147, 148, 149, 150).

#### 1.5.4. Mecanismos de resistência as polimixinas

A resistência as polimixinas em bactérias Gram-negativas previamente susceptíveis é algo relativamente novo e complexo de ser estudado. A resistência pode ocorrer pela modificação covalente do LPS, em sua maioria pela adição de 4-amino-4-deiocil-arabinose (L-Ara4N), que leva diminuição da carga negativa da membrana externa e consequente falta de afinidade das polimixinas pelo LPS (151).

Os genes que codificam L-Ara4N estão contidos em um operon chamado *arnBCADTEFpmrE*. Em *P. aeruginosa* vários sistemas de dois componentes controlam esse operon, incluindo os sistemas PhoPQ, PmrAB, ParRS, CprRS e ColRS. Esses sistemas podem ser expressos em resposta ao antimicrobiano ou como resultado de mutações que desregulam este sistema (152).

Em 2015, um novo mecanismo de resistência a colistina foi descrito em isolados de origem animal, na China e estava presente em um plasmídio. O gene, chamado de *mcr-1*, transfere um radical fosfoetanolamina para o lípidio A presente no LPS, levando a uma alteração da carga negativa e consequente falta de afinidade da colistina (153).

Este gene tem sido isolado em *E. coli* de origem animal e associada a sequência de inserção IS*AplI* encontrada em *Pasteurella multocida*, patógeno comum em animais. Ao que tudo indica a pressão seletiva exercida pelo uso das polimixinas como promotor de crescimento em animais levou ao surgimento deste gene. O mais preocupante é o fato deste gene já ter sido identificado em Gram-negativos de origem hospitalar na Suíça e recentemente no Brasil (154, 155, 156).

Apesar de se conhecer espécies intrinsicamente resistentes as polimixinas e que a resistência adquirida muitas vezes ocorre por processos mutacionais em genes cromossomais, a descoberta de um plasmídio facilmente transferível põe em alerta toda comunidade científica (157).

A tabela 1.3 resume os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa*.

Tabela 1.3.: Principais mecanismos de resistência em *P. aeruginosa*.

Classe de antimicrobiano	Mecanismo de resistência
Beta-lactâmicos	Beta-lactâmases intrínsecas
	Beta-lactâmases adquiridas
	Sistemas de efluxo
	Perda de porinas
Fluoroquinolonas	Mudança do sítio alvo
	Sistemas de efluxo
Aminoglicosídeos	EMAs
	Sistema de efluxo
	RNA metilase 16S
Polimixinas	Modificação do LPS

Adaptado de Meletis e Bagkeri (2013) (158).

## 1.6. Métodos de tipagem

Visando o monitoramento de bactérias com fenótipo de extrema resistência (XDR), multirresistência (MDR) e resistência (R), técnicas que determinam o grau de similaridade e grupos clonais intra e inter hospitalares se tornam fundamentais para determinação e avaliação de surtos, fontes de transmissão e prevalência nos sistemas de saúde.

Atualmente, existem diferentes metodologias para tipagem destes isolados e podem ser divididas em metodologias moleculares e não moleculares. Antes da manipulação do DNA, técnicas como sorotipagem, tipagem por bacteriófagos, tipagem de bacteriocinas e MLEE (*Multilocus enzyme electrophoresis*) eram utilizadas. Estas metodologias, também chamadas de métodos fenotípicos, dividem os isolados em grandes grupos com pouca reprodutibilidade, apresentando, assim, baixo poder discriminatório se comparados às metodologias genotípicas disponíveis atualmente como PCR randômicos, ribotipagem, AFLP, PFGE e MLST (159).

Métodos baseados em amplificação de fragmentos randômicos de DNA podem ser divididos em: rep-PCR (*repeat-based PCR*), RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), ou ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR*).

O rep-PCR se baseia na realização de um PCR com iniciadores para regiões palindrômicas repetidas no genoma bacteriano, gerando assim um padrão de bandas a ser

comparado. O RAPD utiliza um único iniciador arbitrário que amplifica regiões ao acaso, enquanto o ERIC-PCR se baseia na amplificação de regiões repetidas seguido de hibridização e posterior comparação. São técnicas úteis para determinação da epidemiologia, porém apresentam baixa reprodutibilidade (160, 161, 162).

A ribotipagem consegue diferenciar as cepas pela amplificação da região espaçadora intergenica 16S-23S do RNA ribossomal. O AFLP se baseia na amplificação por PCR de fragmentos de restrição por enzimas de restrição, basicamente a técnica envolve a restrição do DNA genômico, seguido da ligação de adaptadores e PCR, com análise após a eletroforese (163).

O método de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é uma das técnicas mais utilizadas para esta finalidade nos dias atuais. O PFGE, basicamente, envolve o aprisionamento do DNA em blocos de agarose, restrição do DNA com enzimas de restrição e posterior corrida em eletroforese de campo pulsado. Esta metodologia permite a separação de grandes fragmentos de DNA. Apesar de apresentar alta discriminação e alta reprodutibilidade, quando se tenta realizar esta metodologia em diferentes laboratórios esta perde em discriminação e reprodutibilidade devido aos diferentes protocolos disponíveis para sua execução (164, 165).

Mais recentemente temos disponível o *Multilocus sequencing typing* (MLST), que se baseia na amplificação por PCR e sequenciamento de regiões de genes constitutivos para a determinação do alelo. O MLST para *P. aeruginosa* baseia-se na análise de sete genes: *acsA* (*Acetyl coenzyme A synthetase*), *aroE* (*Shikimate dehydrogenase*), *guaA* (*GMP synthase*), *mutL* (*DNA mismatch repair protein*), *nuoD* (*NADH dehydrogenase I chain C, D*), *ppsA* (*Phosphoenolpyruvate synthase*), *trpE* (*Anthralite synthetase component I*). A sequência de cada um dos sete alelos de cada isolado é submetida a um banco de dados e recebe uma numeração. O conjunto dos sete alelos formam uma sequência tipo (ST) daquela cepa. Diferente das outras metodologias, o MLST leva em consideração determinadas regiões do genoma, enquanto as demais exploram a diferenças entre estas regiões. Outra vantagem se dá na reprodutibilidade em diferentes laboratórios, permitindo uma melhor compreensão da epidemiologia global (166).

## **1.7. Epidemiologia de *P. aeruginosa***

Diante das metodologias disponíveis e citadas acima, a epidemiologia das infecções por *P. aeruginosa* se mostram multiclonal e muitas vezes indistinguíveis de isolados ambientais, como mostrado por diferentes grupos de pesquisa. Römling e colaboradores (1994) identificaram que clones prevalentes em pacientes com FC também eram comuns em ambientes

aquáticos, enquanto Rahame e colaboradores (1995) demonstraram que uma cepa de *P. aeruginosa* era capaz de causar infecções em modelos de animais e vegetais, ao mesmo tempo. Foght e seu grupo (1996) observaram que isolados de um aquífero contaminado com gasolina eram indistinguíveis de isolados clínicos (167, 168, 169).

Com o advento do sequenciamento genômico, este se mostrou mais uma ferramenta para análise epidemiológica. Em 2000, o sequenciamento do genoma total de 19 amostras provenientes da água e solo e do ambiente hospitalar revelou uma população não ligada epidemiologicamente e com uma alta frequência de recombinação entre os isolados (170).

Utilizando RADP, Ruimy (2001) demonstrou que isolados de infecções sanguíneas e pneumonia em diferentes hospitais na França apresentavam alto grau de recombinação genética não tendo um clone prevalente nessas infecções (171). Pirnay e colaboradores em 2002 utilizaram 4 técnicas epidemiológicas para determinar a estrutura clonal de *P. aeruginosa* em isolados clínicos e ambientais. O autor concluiu haver discordância entre as metodologias, alto grau de polimorfismo e apesar disto, o grupo conseguiu determinar alguns complexos clonais sugerindo uma estrutura clonal epidêmica para *P. aeruginosa* (172).

Muitos estudos apontam sua diversidade clonal como consequência da aquisição, perda e reorganização das ilhas genômicas ao longo dos anos, além dos processos mutacionais (173).

Em 2002 o genoma da cepa *P. aeruginosa* PAO1 foi desvendado e publicado na Nature e estes resultados forneceram dados para o tamanho do genoma, complexidade genética e versatilidade ecológica. Com um genoma de 6.3 Mbp, *P. aeruginosa* PAO1 levou novos rumos para diversas áreas e compreensão de sua grande diversidade. Em partes, esta espécie tem maiores porcentagens de genes dedicados aos controles de sistemas de adaptação. Esta cepa é sensível aos antimicrobianos utilizados para tratamento das infecções, o que a torna um modelo de comparação em diversos estudos (174).

Com essa descoberta foi possível concluir que *P. aeruginosa* possui uma grande versatilidade genética e adaptação, também apresenta um repertório de virulência e resistência aos antimicrobianos formidável, o que a torna um patógeno bacteriano preocupante nas IRAs (174).

O aumento da resistência vem associado com a prevalência das infecções crônicas e nosocomiais, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade (170, 171). *P. aeruginosa* tem se tornado resistente a todas as opções terapêuticas pelo acúmulo de resistência a todas as classes de antimicrobianos disponíveis, seja por mutações cromossômicas ou pela aquisição de elementos genéticos móveis, principalmente para carbapenemases de classe B e EMAs (175).

O sucesso destas infecções está ligado a uma interação complexa entre patogenicidade, epidemicidade e resistência aos antimicrobianos, essa equação se torna ainda mais complexa

quando, mais recentemente, se descobriu uma regulação e associação entre os mecanismos de resistência e virulência (176, 177).

Os isolados de origem hospitalar muitas vezes apresentam mutações nos reguladores da beta-lactamase AmpC, superexpressão de sistemas de efluxo, perda ou diminuição de porinas, mutações nas DNA girase e topoisomerasas, além de genes adquiridos tornando estes isolados multirresistentes (MDR) (Resistente a mais de três classes de antimicrobianos), extremamente resistentes (XDR) (sensível a apenas 2 classes de antimicrobianos) ou pan droga resistentes (PDR) (resistente a todas as classes de antimicrobianos) (178, 179).

Com o surgimento de isolados MDR, XDR e PDR foi possível distinguir alguns grupos clonais prevalentes na população clonal, tida como heterogenia de *P. aeruginosa*, então chamados de clones de alto risco (180). Como mostrado em um estudo na Espanha, os isolados sensíveis aos antimicrobianos apresentam genótipos únicos, enquanto isolados MDR ou XDR apresentam menor diversidade clonal (181, 182).

Com esses dados é possível identificar algumas linhagens epidêmicas de maior sucesso no mundo, como o clone C e PA14 de pacientes com FC na Alemanha (189) e a cepa Epidêmica de Liverpool (LES) disseminada na Europa e no Canadá (183, 184).

Através do MLST foi possível observar 2336 STs diferentes em todo o mundo (acessado em [http://pubmlst.org/perl/bigdb/bigdb.pl?db=pubmlst\\_paeruginosa\\_seqdef](http://pubmlst.org/perl/bigdb/bigdb.pl?db=pubmlst_paeruginosa_seqdef), dia 11/08/2015). STs disseminados em mais de três países com uma alta prevalência são considerados bem sucedidos, sob o ponto de vista epidemiológico. Os clones C e PA14 correspondem ao ST17 e ST253, respectivamente, o clone LES corresponde ao ST146. Outros STs importantes no mundo incluem ST111, ST175 e ST235 (185).

Por exemplo, o ST175 encontrado na Espanha, França, Hungria e República Checa tem sido associado a produção da carbapenemase do tipo VIM, superexpressão de AmpC, perda da OprD, superexpressão do sistema de efluxo XY e mutações nas regiões QRDRs (*gyrA* e *parC*). Este clone muitas vezes se apresenta com perfil de resistência XDR devido a associação destes mecanismos. O mesmo tem sido associado aos demais clones de *P. aeruginosa* chamados de clones de alto risco (186).

No ST 235 a carbapenemase adquirida mais prevalente é a VIM, associada a surtos na Alemanha e na Espanha, e a IMP no Japão, com relatos esporádicos de KPC (classe A). O ST111 tem sido associado a disseminação da VIM em diferentes países, com relato de KPC-2 na Colômbia (187, 188).

O clone LES, ou ST146, descrito desde 1990 na Inglaterra e Escócia, foi mais recentemente relatado no Canadá e na Espanha, em pacientes com FC (189, 190). Além disso, a transmissão deste clone entre paciente com FC e pacientes em UTI também tem sido relatada.

Isolados obtidos de pacientes com FC geralmente apresentam fenótipo diferente e são mais propensos a processos mutacionais e recombinação genética (191).

No Brasil, o clone SP pertencente ao ST277 é particularmente problemático. Após a sua descrição como o clone carreador da carbapenemase SPM-1 em São Paulo, este mesmo clone foi detectado em diferentes regiões brasileiras. Isolados do ST277 produtores de SPM apresentam fenótipo de MDR ou XDR e são ocasionalmente detectados em outros países. Até o momento, além do Brasil este clone produtor de SPM foi detectado na Suíça em 2010 e no Reino Unido em 2016. O ST277 já foi relatado em outros países sem carbapenemases adquirida, porém no Japão e na China carreando a MBL do tipo IMP. Apesar disto, a MBL do tipo SPM é relatada prioritariamente neste clone (106, 192, 193).

Desta forma, o isolado epidêmico no Brasil produtor de uma carbapenemase associada somente a este clone e de origem brasileira intrigou diversos grupos de pesquisas nacionais. Diante disto, nosso grupo vem desenvolvendo trabalhos a cerca deste clone, onde foi possível relatar a presença de algumas mutações e determinantes de resistência, o que inclui: presença da RNA metilase 16S do tipo rmtD em vários isolados deste clone; a presença de um integron de classe 1 chamado *In163*, carreando os genes *aacA4*, *bla<sub>OXA-56</sub>* e *aadA7*; mutações e deleções no gene de *oprD*, levando a alteração do quadro de leitura da sequência de aminoácidos, mutações no gene, *ampD*, regulador de *ampC*, mutações nos sistemas de efluxo para MexAB-oprM, deleção de 8 nucleotídeos no *mexT*, regulador do sistema MexEF-oprN, mutação no *gyrA*, todas comuns a 6 isolados pertencentes a este clone diferentes regiões brasileiras e anos.

A crescente importância da espécie *P. aeruginosa* nas IRAS levou a necessidade da determinação dos seus padrões de resistência e epidemiologia. Sabe-se que no Brasil o clone de alto risco carreador da carbapenemase do tipo SPM ganhou grande destaque após sua descrição, porém outros clones de destaque podem contribuir para causar IRAS. Com isso, determinar o perfil e os mecanismos de resistência aos principais antimicrobianos ao longo dos anos e determinar sua epidemiologia pode contribuir para o entendimento do seu papel, sua transmissão e comportamento ao longo dos anos. Assim, o presente estudo visa determinar estes padrões ao longo de 21 anos no Rio de Janeiro.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a evolução clonal e a resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* isoladas no estado do Rio de Janeiro ao longo de 21 anos (1995 – 2015).

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em amostras de *P. aeruginosa* isoladas no Rio de Janeiro ao longo dos anos através da técnica de Disco Difusão em Agar.
- Detectar fenotipicamente a presença de carbapenemases através do teste de hidrólise - Carba NP.
- Determinar a concentração mínima inibitória das amostras frente ao Imipenem.
- Pesquisar através da técnica de PCR a presença dos genes de carbapenemases de classe A (KPC e GES), classe B (IMP, VIM, NDM e SPM) e classe D (OXA-48).
- Pesquisar a presença de genes codificadores de RNA metilase, associados a resistência a aminoglicosídeos, através de PCR.
- Pesquisar a presença de genes *qnr*, associados a resistência a fluoroquinolonas, através de PCR.
- Investigar a presença de mutações nos genes *oprD*, *mexT* e *gyrA* através do sequenciamento.
- Determinar o polimorfismo genético através de PFGE das amostras de *P. aeruginosa* no período de 1995 a 2015.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Seleção das amostras

Durante o período de 1995 á 2015 o Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar recebeu um total de 615 amostras de *P. aeruginosa* proveniente de 10 Hospitais do Rio de Janeiro. Estas amostras fazem parte da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar – CCBH, do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz, e, para uma melhor análise, estas amostras foram divididas em quatro períodos: 1º período (amostras isoladas entre 1995 e 1999), 2º período (de 2000 a 2005), 3º período (de 2006 a 2010) e 4º período (de 2011 a 2015). O período de maior recebimento de amostras foi o 3º período, afim de equilibrar o numero de amostras, tentamos equilibrar esta distribuição durante os períodos, desta forma, realizamos uma distribuição equivalente entre os períodos de forma probabilística e aleatória. Com isto, conseguimos recuperar no primeiro período 22 amostras (24,70%), o segundo período 11 amostras (12,3%), o terceiro período 39 amostras (43,8%) e o quarto período um total de 16 amostras (19%). Totalizando 88 amostras de *P. aeruginosa* (Gráfico 3.1).

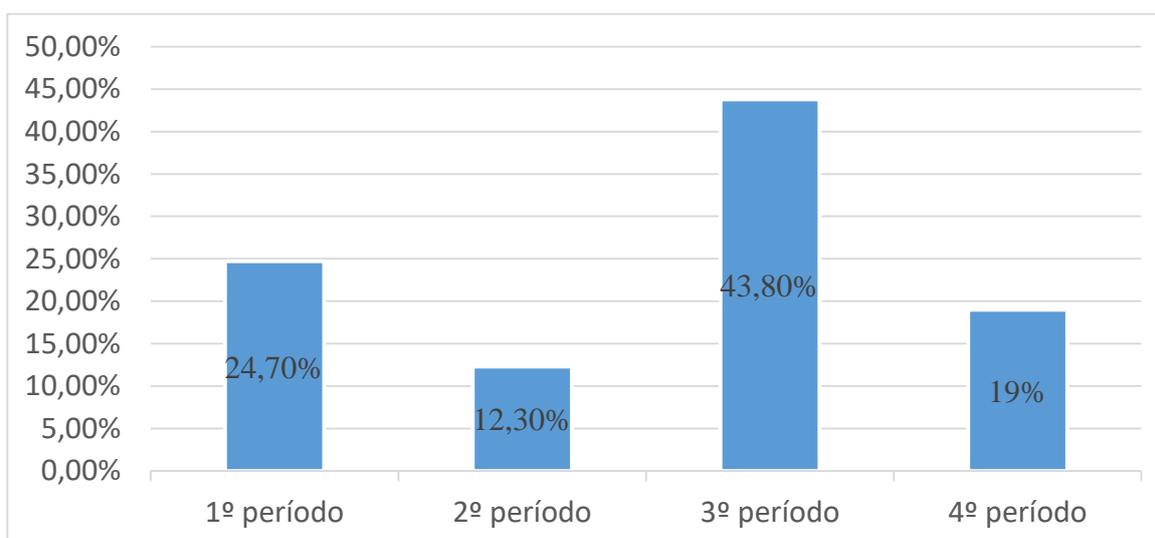


Figura 3.1: Distribuição dos 88 isolados de *P. aeruginosa* ao longo dos anos.

As 88 amostras selecionadas (única amostra por paciente) eram provenientes de diferentes sítios biológicos de pacientes atendidos em 10 hospitais do Rio de Janeiro (H1-H10). Os isolados foram provenientes da corrente sanguínea (31,8%, n=28), sistema respiratório inferior (18,2%, n=16), secreções diversas (12,5%, n=11), urina (7,9%, n=7), ponta de cateter (6,8%, n=6), swabs de vigilância (5,7%, n=5), líquido (2,3%, n=2) e fezes (1,1%, n=1). O sítio biológico de 13,6% (n=12) dos isolados não foi informado (tabela 3.1).

Tabela 3.1: Distribuição dos 88 isolados de *P. aeruginosa* de acordo com o hospital de origem, sítio de isolamento e período.

Período	Hospital	Número de amostras (%)	Amostra biológica (n)
1° (1995-1999)	H4	11 (12,5%)	Secreções diversas (5); fezes (1); Sangue (1), Sistema respiratório inferior (1); swab de vigilância (1); ND (2).
	H6	11 (12,5%)	Sangue e ponta de cateter (4); ND (7).
2° (2000-2005)	H5	7 (7,9%)	Sistema respiratório inferior (2); Urina (2); Secreções diversas (1); Sangue e cateter (1); Swab de vigilância (1).
	H6	3 (3,4%)	Sangue e cateter (1); ND (2).
	H9	1 (1,1%)	Sistema respiratório inferior (1).
3° (2006-2010)	H10	16 (18,18%)	Secreções diversas (3); Sangue e cateter (8); Sistema respiratório inferior (4); Urina (1).
	H2	3 (3,4%)	Sangue e cateter (1); Sistema respiratório inferior (1); ND (1).
	H5	9 (10,2%)	Sangue e cateter (4); Sistema respiratório inferior (3); Swab de vigilância (1); Urina (1).
	H7	1 (1,1%)	Sangue (1).
	H9	10 (11,4%)	Líquor (2); Sangue e cateter (6); Sistema respiratório inferior (1); Urina (1).
4° (2011-2015)	H1	1 (1,1%)	Sistema respiratório inferior (1).
	H2	2 (2,2%)	Sistema respiratório inferior (1); Urina (1).
	H3	1 (1,1%)	Sangue (1).
	H5	11 (12,5%)	Secreções diversas (2); Sangue e ponta de cateter (6); Sistema respiratório inferior (1); Swab de vigilância (2).
	H8	1 (1,1%)	Urina (1).

### 3.2. Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

#### 3.2.1. Disco difusão em ágar

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado para todas as 88 amostras de *P. aeruginosa* pelo método de disco difusão em ágar seguindo os critérios do CLSI 2015.

A partir de cultura recente (18-24 horas) em ágar nutriente (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) foram selecionadas 1 a 2 colônias para turvação em solução de salina fisiológica a 0,5 na escala de MacFarland. Esta suspensão foi semeada em toda a superfície do meio Mueller Hinton Agar (MHA; Oxoid), com auxílio de swab estéril, para obtenção de crescimento semi-confluyente. Com no máximo 15 minutos, foram aplicados os discos de antimicrobianos (Oxoid), mantendo-se um espaço de, no mínimo, 2,5 cm entre eles. Foram utilizados os discos de amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), doripenem (10 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30 µg), ticarcilina + ácido clavulânico (75/10 µg), piperacilina + tazobactam (100/10 µg), aztreonam (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), colistina (10 µg) e polimixina B (300 units).

Após aplicação dos discos, as placas foram incubadas em estufa a 35°C +- 2°C, em aerobiose por 16-18h e após esse período, foram avaliados os diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano e o perfil de susceptibilidade determinado de acordo com o CLSI 2015. Como controles do teste foram utilizadas as amostras *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 35218.

### **3.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima para o imipenem**

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada através de Etest® (Biomérieux, Marcy-l'Etoile - França), para o imipenem, de acordo com os critérios interpretativos estabelecidos pelo CLSI 2015. Todas as 88 amostras foram submetidas a esta metodologia.

A metodologia executada é similar a do disco difusão em ágar Mueller Hinton, contudo, aqui se usa tiras impregnadas contendo um gradiente de concentração de cada antimicrobiano, permitindo assim obter a concentração inibitória mínima para cada droga dentro das concentrações obtidas. Para o imipenem a fita contém um gradiente de concentração que vai de 0,02 a 32 ug/mL. Como controle do teste foi utilizada a amostra *P. aeruginosa* ATCC 27853.

### **3.2.3. Análise do perfil de multirresistência**

Com base nos resultados obtidos no teste de disco difusão, o perfil de multirresistência foi definido de acordo com os critérios de Magiorakos e colaboradores (2011) (179). Para isso os agentes antimicrobianos foram classificados em 7 categorias: carbapenemas (imipenem, meropenem e doripenem), cefalosporinas (ceftazidima e cefepime), penicilinas + inibidores de beta-lactamases (ticarcilina + ácido clavulânico e Piperacilina+Tazobactam), monobactâmicos (aztreonam), aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e polimixinas (polimixina B e colistina).

Para a determinação do perfil de multirresistência, os isolados que apresentaram resistência plena ou intermediária foram agrupados como não susceptíveis. Os termos Resistente (R) foram utilizados para os isolados que apresentaram não susceptibilidade a pelo menos um antimicrobiano de 1 ou 2 categorias; Multirresistente (MDR) para aqueles que apresentaram não susceptibilidade a pelo menos um antimicrobiano de 3 ou 4 categorias; Extensivamente resistente (XDR) para os isolados sensíveis a apenas 1 ou 2 categorias testadas e; Pan Resistente (PDR) para isolados não susceptíveis a antimicrobianos representantes de todas as categorias testadas.

### 3.3. Detecção colorimétrica da hidrólise do imipenem- Carba NP

Todos os isolados que apresentaram resistência ao imipenem foram submetidos a esta metodologia (194). O teste foi realizado de acordo com CLSI 2015 com algumas modificações. Foi adicionado o inibidor EDTA conforme descrito por Dortet e colaboradores (2012) modificado a extração das proteínas. Ao invés de usarmos o tampão comercial de extração de proteínas bacterianas, a extração foi realizada por sonicação utilizando Tris HCl (pH 7,4) preparado em nosso laboratório.

O teste é utilizado para detecção da produção de carbapenemases pela hidrólise do anel beta-lactâmico do imipenem. Para tal, foi preparado um estoque da solução mãe contendo 2 ml de vermelho de fenol à 0,5% em 16,6ml de água ultrapurificada, adicionado 180 µl de sulfato de zinco a 10 mM e o pH ajustado para 7,8 usando solução de 0,1 N NaOH ou HCl 10%.

A solução mãe foi utilizada para preparar as três condições do teste, chamados de A, B e C. A condição A contendo 3 ml da solução mãe, condição B contendo 3 ml da solução mãe mais 0,018 g de sal de imipenem com cilastatina (Tienam ® Merck, Elkto, EUA) e solução B contendo 2820 µl da solução mãe e 180 µl de EDTA (100 mM) mais 0,018 g de sal de imipenem com cilastatina. As soluções foram distribuídas em placa de poliestireno de 96 poços. Cada amostra foi testada sobre as 3 soluções (A, B e C). Para tal, foram distribuídos 100 µl de cada solução em uma coluna da microplaca.

A extração bacteriana também sofreu alterações, onde, em crescimento recente em ágar Nutriente (Oxoid). Aproximadamente três alçadas de cada amostra foram suspensas em 500 µl de Tris HCl (20 Mm) em microtubos de 1,5 mL, homogeneizados em vortex e submetidos a sonicação por 30 minutos seguidos. Após o tempo, caso necessário, os isolados foram armazenados em gelo. Após a extração, 30 µl de cada isolado foi adicionada em um poço de cada solução (A, B e C). A microplaca foi incubada a 35°C +- 2°C por 2 horas.

A interpretação seguiu da seguinte forma: Para solução A: Todos os tubos deviam estar vermelhos. Caso estivessem de outra cor o teste era invalidado; para solução B e C: Se vermelho em ambas, a amostra foi considerada não produtora de carbapenemase. Se laranja claro, amarelo ou amarelo escuro somente na solução B, a amostra foi considerada produtora de carbapenemase do tipo metalo-beta-lactamase. Se laranja claro, amarelo ou amarelo escuro na solução B e C, a amostra foi considerada produtora de serino-carbapenemase (Figura 3.2). Como controle do teste foram utilizadas a amostra CCBH 4640 (*K. pneumoniae* produtora de KPC-2), CCBH 20303 (*K. pneumoniae* produtora de NDM-1), CCBH 14822 (*K. pneumoniae* produtora de OXA-370) e a *E. coli* ATCC 25922 como controle negativo.

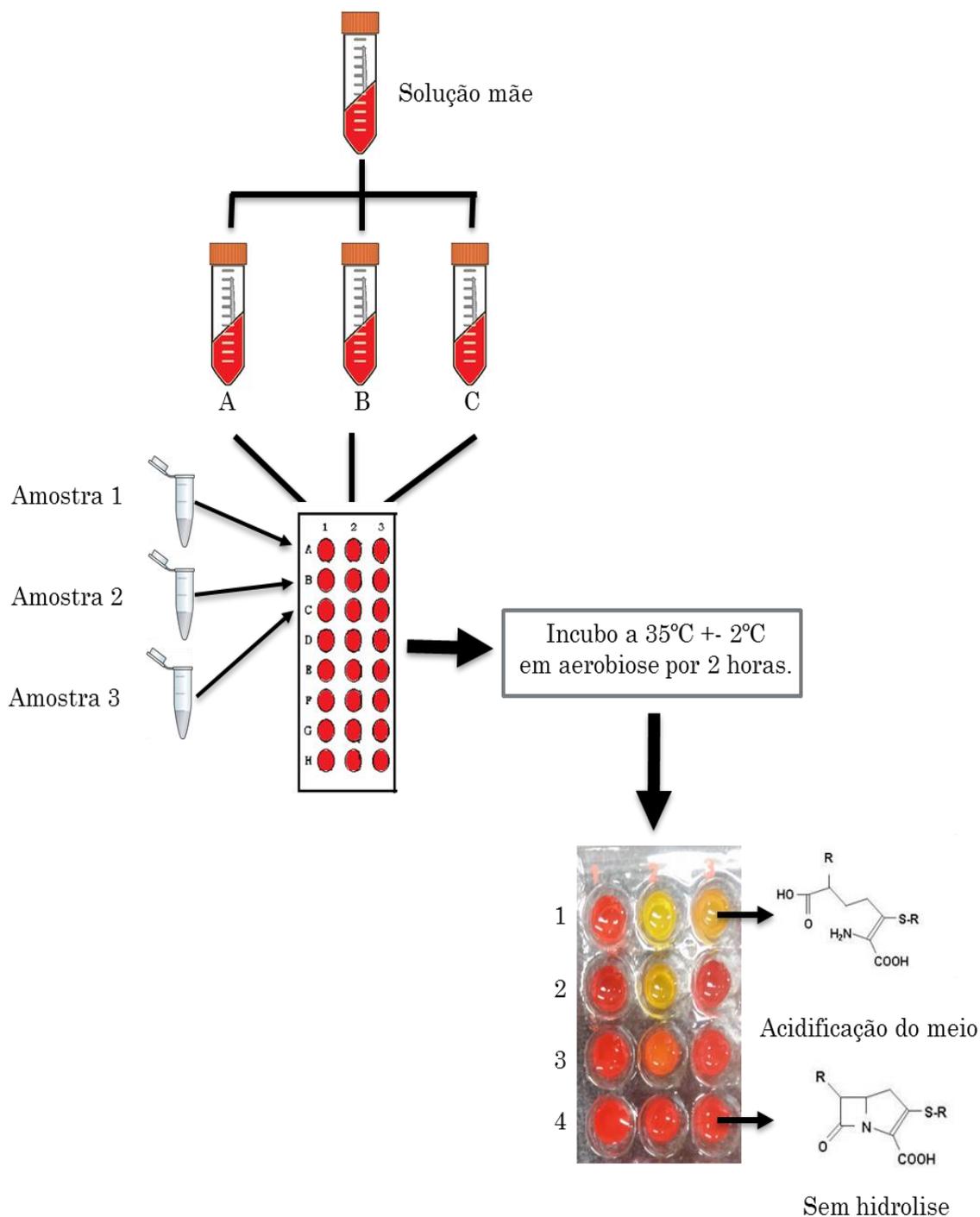


Figura 3.2: Fluxograma da metodologia do CARBA NP.

Legenda: 1 – Amostra positiva para KPC; 2 – Amostra positiva para NDM; 3- amostra positiva para OXA-48; 4 – Amostra negativa para carbapenemases.

### **3.4. Detecção dos determinantes de resistência pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

#### **3.4.1. Extração de DNA pelo método de sonicação**

O DNA das 88 amostras de *P. aeruginosa* foram extraídos por sonicação, método mecânico. Em crescimento recente em ágar MH (MHA; Oxoid) foi retirada uma alça bacteriológica e transferida para tubos tipo eppendorf contendo 500 µl de água ultrapurificada, homogeneizados e submetidos a sonicação em cuba de ultra-som (Critófoli, Paraná, Brasil) duas vezes por 30 segundos com intervalo de 10 segundos. O material lisado foi submetido a centrifugação (16000 x g por 10 minutos) e armazenado em gelo até sua utilização.

#### **3.4.2. Detecção de carbapenemases por PCR**

Os genes codificadores de carbapenemases foram detectados por PCR através de uma reação multiplex para quatro genes e três reações simples para todas as amostras (n=88).

O PCR multiplex foi realizado para a detecção dos genes codificadores das carbapenemases de classe A (*bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>GES</sub>*), classe B (*bla<sub>NDM</sub>*) e classe D (*bla<sub>OXA-48</sub>*) de acordo com Monteiro e colaboradores (2012) (195). Enquanto que as reações simples foram realizadas para detecção dos genes de classe B, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>SPM</sub>* (196, 197, 198).

A reação do tipo multiplex foi preparada contendo 2 µl de DNA cromossômico, 8,5 µl de água Milli-Q, 0,25 µl (20 pmoles) de cada primer e 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma), totalizando um volume final de 25 µl. Os iniciadores para os genes utilizados nesta reação e as condições da reação se encontram na tabela 3.2.

Tabela 3.2.: Iniciadores específicos utilizados para a detecção de carbapenemases na reação multiplex e condições de reação.

Gene	Iniciadores	Produto (pb)	Condições da reação
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	F- CGGTTACGGCCAGTGGGAATA R-GACGCAGACCGAATCGAACT	1011	Desnaturação inicial: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos: desnaturação (94°C por 1 minuto, anelamento (50°C/ 1 minuto), extensão (72°C por 1 minuto), extensão final (72°C por 5 minutos)
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	F- GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R- CGGAATGGCTCATCACGATC	755	
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	F- GCTTGATCGCCCTCGATT R-GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	608	
<i>bla<sub>GES</sub></i>	F- ATGCGCTTCATTCACGCAC R- TCCGTGCTCAGGATGAGTTG	856	

Para as reações únicas, a mistura da PCR foi preparada em um volume final de 25 µl, contendo 2 µl de DNA cromossômico, 9 µl de água Milli-Q, 0,75 µl (20 pmoles) de cada primer e 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma). As condições e iniciadores se encontram na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Iniciadores específicos utilizados para a detecção de carbapenemases na reação simplex e condições de reação.

Gene	Iniciadores	Produto (pb)	Condições da reação
<i>bla<sub>SPM-1</sub></i>	F- CCTACAATCTAACGGCGACC R- TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	649	Desnaturação inicial: 95°C / 5 min 29 ciclos: desnaturação (95°C / 1 min), anelamento (56°C / 1 min) e extensão (72°C / 1 min) extensão final (72°C / 1 min)
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	F- CTACCGCAGCAGAGTCTTTG R- AACCAGTTTTGCCTTACCAT	586	Desnaturação inicial: 94°C / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (50°C / 1 min) e extensão (72°C / 15 seg) extensão final (72°C / 5 min)
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	F- AGTGGTGAGTATCCGACAG R-ATGAAAGTGCGTGGAGAC	260	Desnaturação inicial: 94°C / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (50°C / 1 min) e extensão (72°C / 15 seg) extensão final (72°C / 5 min)

### 3.4.3. Detecção de genes de resistência aos aminoglicosídeos

A detecção dos genes codificadores das enzimas RNA metilases (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* e *npmA*) nas amostras de *P. aeruginosa* foram realizadas via PCR em reações simplex para cada gene para todas as amostras resistentes a pelo menos um dos aminoglicosídeos testados.

A mistura da PCR foi composta por 2 µl de DNA cromossômico, 9 µl de água Milli-Q, 0,75 µl (20 pmoles) de cada primer e 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma), em um volume total de 25 µl. As condições de reação 94°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto para temperatura de anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os iniciadores forma previamente descrito (tabela 3.4).

Tabela 3.4: Iniciadores específicos utilizados para a detecção dos genes de resistência aos aminoglicosídeos, temperatura de anelamento e referência.

Gene	Iniciadores	Produto (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
<i>armA</i>	F- TATGGGGGTCTTACTATTCTGCCTAT	513 pb	45°C	199
	R- TCTTCCATTCCCTTCTCCTTT			
<i>rmtA</i>	F- CTAGCGTCCATCCTTTTCCTC	634 pb		
	R- TTTGCTTCCATGCCCTTGCC			
<i>rmtB</i>	F-TCAACGATGCCCTCACCTC	439 pb		
	R- GCAGGGCAAAGGTAAAATCC			
<i>rmtC</i>	F- GCCAAAGTACTCACAAGTGG	751 pb		
	R- CTCAGATCTGACCCAACAAG			
<i>npmA</i>	F- CAGCGAACTGAAGGAAAAAC	640 pb		
	R- GAAACATGGCCAGAAACTC			
<i>rmtD</i>	F- CAGCGAACTGAAGGAAAAAC	729 pb	200	
	R- CAGCACGTAAAACAGCTC			

Como controle do teste foram utilizadas as amostras CCBH 14393 (*K. pneumoniae* produtora de *rmtB*), CCBH 4851 (*P. aeruginosa* produtora de *rmtD*), CCBH 8543 (*K. pneumoniae* produtora de *armA*), CCBH 6626 (*K. pneumoniae* produtora de *rmtA*), CCBH 6941 (*K. pneumoniae* produtora de *rmtC*), CCBH 8494 (*K. pneumoniae* produtora de *npmA*) e ATCC 25922 (*E. coli* como controle negativo).

#### 3.4.4. Detecção de genes de resistência as fluoroquinolonas

Os genes adquiridos que codificam resistência as fluoroquinolonas foram detectados pela PCR nas amostras que apresentaram resistência a pelo menos uma das fluoroquinolonas testadas. Os seguintes genes foram pesquisados: *qnrA* (201), *qnrB* (201), *qnrC* (202) e *qnrS* (201), utilizando a reação contendo 2 µl de DNA cromossômico, 9 µl de água Milli-Q, 0,75 µl (20 pmoles) de cada primer e 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix

(Sigma), totalizando 25 µl na reação final, em reações simplex para cada gene pesquisado. Condições e iniciadores utilizados se encontram na tabela 3.5.

Tabela 3.5: Iniciadores, tamanho do produto e referência para detecção de genes de resistência as fluoroquinolonas pesquisadas.

Gene alvo	Sequencia do iniciador (5' → 3')	Produto (pb)	Referências
<i>qnrA</i>	F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580 pb	Desnaturação inicial: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos: desnaturação (94°C por 1 minuto, anelamento (54°C/ 1 minuto), extensão (72°C por 1 minuto), extensão final (72°C por 5 minutos).
	R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>qnrB</i>	F: GGMATHGAAATTTCGCCACTGC	264 pb	
	R: TTTGCYGYCCGCCAGTCGAAC		
<i>qnrS</i>	F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428 pb	
	R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
<i>qnrC</i>	F: GGGTTGTACATTTATTGAATC	447 pb	
	R: TCCACTTTACGAGGTTCT		

Como controle do teste foram utilizadas as amostras CCBH 8340 (*K. pneumoniae* produtora de *qnrB*), CCBH 16302 (*K. pneumoniae* produtora de *qnrS*), CCBH 8012 (*K. pneumoniae* produtora de *qnrA*) e ATCC 25922 (*E. coli* como controle negativo).

### 3.4.5. Corrida eletroforética

Após as reações de PCR, a visualização dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035 M). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), observados e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento LPixEX-Loccus biotecnologia.

### 3.5. Identificação da variante alélica da *oprD*, *mexT* e *gyrA*

Para a avaliação de mutações nos genes cromossomais associados a resistência aos carbapenemas e fluoroquinolonas foram realizadas PCR para o gene *oprD*, codificador da porina OprD, o gene *mexT*, regulador positivo da bomba de efluxo MexEF-OprN e o gene *gyrA* codificador da subunidade A da enzima DNA girase. Os iniciadores para *oprD* e *mexT* foram desenhados neste estudo, enquanto o *gyrA* segundo Bej e colaboradores (1991) (203).

#### 3.5.1. Reação de PCR

A mistura da PCR para cada um dos 3 genes foi preparada em um volume final de 25 µl, contendo 2 µl de DNA cromossômico (extraído conforme tópico 3.4.1.), 9 µl de água Milli-Q, 0,75 µl (20 pmoles) de cada iniciador e 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma). Os iniciadores e condições encontram-se na tabela abaixo. A reação foi submetida a eletroforese para visualização dos fragmentos amplificados.

Tabela 3.6: Iniciadores, tamanho do produto e condições de reações para o PCR de cada gene.

Gene	Sequencia do iniciador (5' → 3')	Produto (pb)	Condições da reação
<i>oprD</i>	603 - GGGGTTTCATCGAAGACAGCA <hr/> 2321- GAGGAGTCAGCAGGCAATG	1718 pb	Desnaturação inicial: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos: desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (61°C/ 1 minuto), extensão (72°C por 1 minuto), extensão final (72°C por 5 minutos).
<i>mexT</i>	F - CGATCGCCTGGACACGCACC <hr/> R - GCGCGCGATCGATTTTCCCG	1311 pb	Desnaturação inicial: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos: desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (62°C/ 1 minuto), extensão (72°C por 1 minuto), extensão final (72°C por 5 minutos).
<i>gyrA</i>	1 - TGTCCGAGATGGCCTGAAGC <hr/> 2 - TGCCGTCATAGTTATCAAGA	470 pb	Desnaturação inicial: 95°C por 5 minutos; 95°C por 1 minuto; 55°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; 72° por 5 minutos

### 3.5.2. Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados através do kit GE Healthcare illustra. GFX PCR DNA and Gel“GfX PCR DNA Purification Kit” (GE Healthcare). Para o sequenciamento, os iniciadores utilizados foram os mesmos usados para a reação de amplificação, exceto para o gene *oprD*, onde foram utilizados iniciadores internos a fim de se aumentar a eficácia do sequenciamento (Tabela 3.7; Figura 3.3).

Tabela 3.7: Iniciadores internos utilizados para o sequenciamento da porina *oprD*.

Gene	Iniciadores internos para sequenciamento
<i>oprD</i>	1891 - CGTTGCCCGCCAAGAAGAAAA
	1054 - GCCGACCACCGTCAAATCG

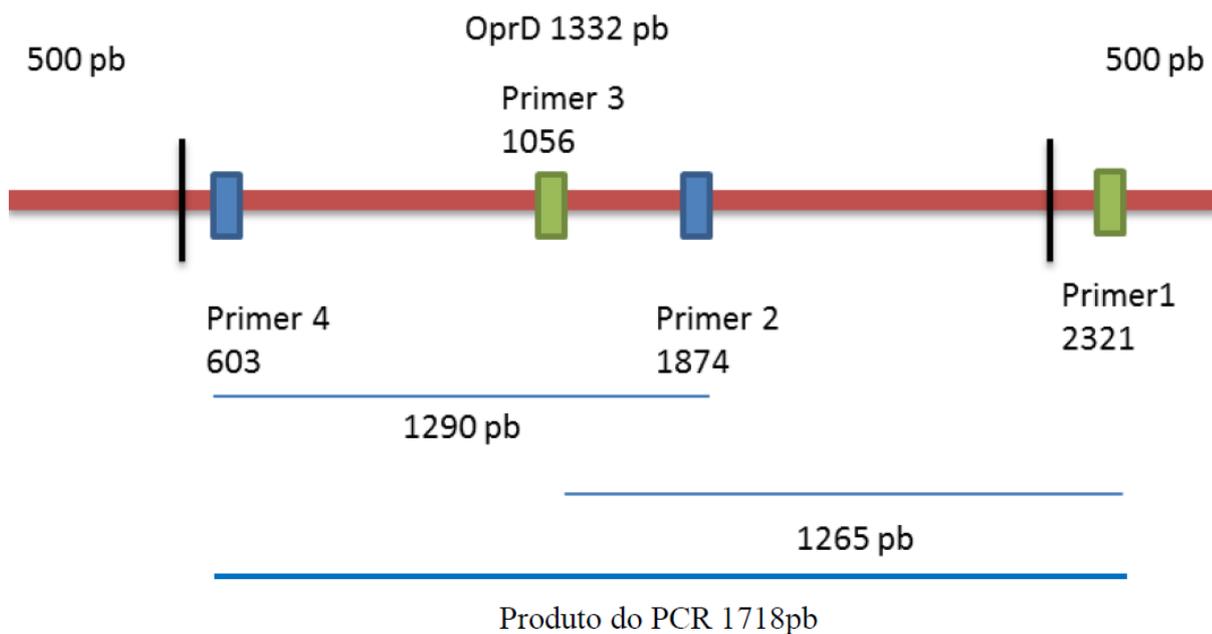


Figura 3.3: Esquema do desenho dos iniciadores para amplificação e sequenciamento da *oprD*. Linhas pretas simbolizam o início e o final do gene de *oprD* (1332 pb); iniciador (*primer 4*) 603 no sentido 5'-3' na posição 603 pb do gene e iniciador (*primer 1*) 2321 sentido 3'-5' na posição 1821 pb após o gene foram usados para amplificação do gene. Os iniciadores, *primer 3* e *2*, foram usados no sequenciamento no sentido 5'-3' e 3'-5', respectivamente.

Os produtos purificados foram sequenciados no Sequenciador 3730 DNA Analyser (*Applied Biosystems*), na Plataforma de Sequenciamento DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ. A reação foi realizada utilizando *BigDye* (*Applied Biosystems* - PN.:4336917- kit de 100 rçs) e 150µL de tampão de sequenciamento 5x (*Applied Biosystems* – PN:4336699).

A análise da qualidade das sequências obtidas foi realizada com auxílio do *software Phred* (versão 19.0), onde somente as sequências que obtiveram score  $\geq 20$  foram individualmente analisadas. Para a análise da composição das sequências obtidas, foram utilizados inicialmente os *softwares Bioedit* (versão 7.0.5.3) e *Mega* (versão 4.0.2).

Para determinação das mutações, os alelos foram comparados com o alelo da cepa sensível de *P. aeruginosa* PAO1 (GCA\_000006765.1) utilizando o *software Geneious*, versão 6.1.7. (*Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand*).

### **3.6. Análise do polimorfismo genético através de PFGE.**

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras 88 amostras de *P. aeruginosa* foi realizada segundo Ribot e colaboradores (2006) (204).

As amostras foram semeadas em tubos com ágar nutriente (Oxoid) e incubados a 35°C+ -2°C por 24 horas para crescimento bacteriano. Após a incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana, adicionando 1 mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8,0, TRIS-HCl 1M pH 8) até alcançar o padrão de turvação 3 da escala de MacFarland. Em seguida, 200 µL da suspensão foram transferidos para um microtubo tipo eppendorf contendo 5 µL de proteinase K (50 mg/ µL- Sigma) e homogeneizados por inversão. Foram adicionados à suspensão de células, 200 µL de agarose contendo SDS (0,1 g de agarose (Seakem Gold®), 0,5 mL de SDS 1%, 9,4 mL de TE (TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 MM pH 8,0). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano, os mesmos foram transferidos para tubos Falcon contendo 2 mL de Solução de Lise (Trisma base 1,0M pH 8,0/ EDTA 0,5M pH8,0/ N-Lauril sarcosil 10%/ Água Milli Q (q.s.p) e 5 µL de proteinase K (50 mg/ µL - Sigma) e incubados a 50°C por 2 horas. Após a incubação, os blocos foram lavados 3 vezes com 10 mL de água MilliQ a  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e uma vez com 7 mL de Tampão TE a  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após as lavagens, os blocos foram armazenados em 2 mL de TE na geladeira.

Um terço de um plug foi cortado e transferido para um microtubo tipo eppendorf contendo solução tampão da enzima de restrição *SpeI* (*Fastdigest* – Fermentas por *Thermo Scientific*) (90 µL de água esterilizada e 10 µL de solução tampão da enzima) e incubadas em geladeira por 30

minutos. Posteriormente, os blocos foram tratados com o mix contendo a enzima de restrição *SpeI* (5 µL de solução tampão da enzima, 0,5 µL da enzima e 44,5 µL de água MilliQ) por 3 horas a 37°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1,1% (Seakem Gold®), preparado em TBE 0,4X, através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA). Foram utilizadas as seguintes condições para a corrida eletroforética: pulso crescente de 5 a 35 segundos, por 13,5 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C. Foi utilizado como marcados molecular o Lambda Ladder PFG Marker (50 ug/mL - New England BioLabs, Ipswich, MA).

Após as corridas eletroforéticas, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), visualizados sob luz UV e fotografados, utilizando-se ferramenta de fotodocumentação Transiluminador L.PIX (Loccus Biotecnologia). As análises dos géis e a confecção dos dendrogramas foram realizadas com auxílio do software BioNumerics (versão 6.6, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de *Dice*, e os valores de otimização e tolerância de 1,5%. O percentual de similaridade usado foi acima de 80% para que as amostras pertencessem ao mesmo grupo clonal.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Através do teste de disco difusão em ágar foi possível observar que as maiores taxas de susceptibilidade foram para polimixina B e colistina (100%) e a maior taxa da não susceptibilidade (agrupando os resultados de resistência plena e intermediária) foi para ticarcilina + ácido clavulânico (93,2%; n= 82). Para os demais antimicrobianos testados as taxas de não susceptibilidade variaram de 27 a 60% (Figura 4.1).

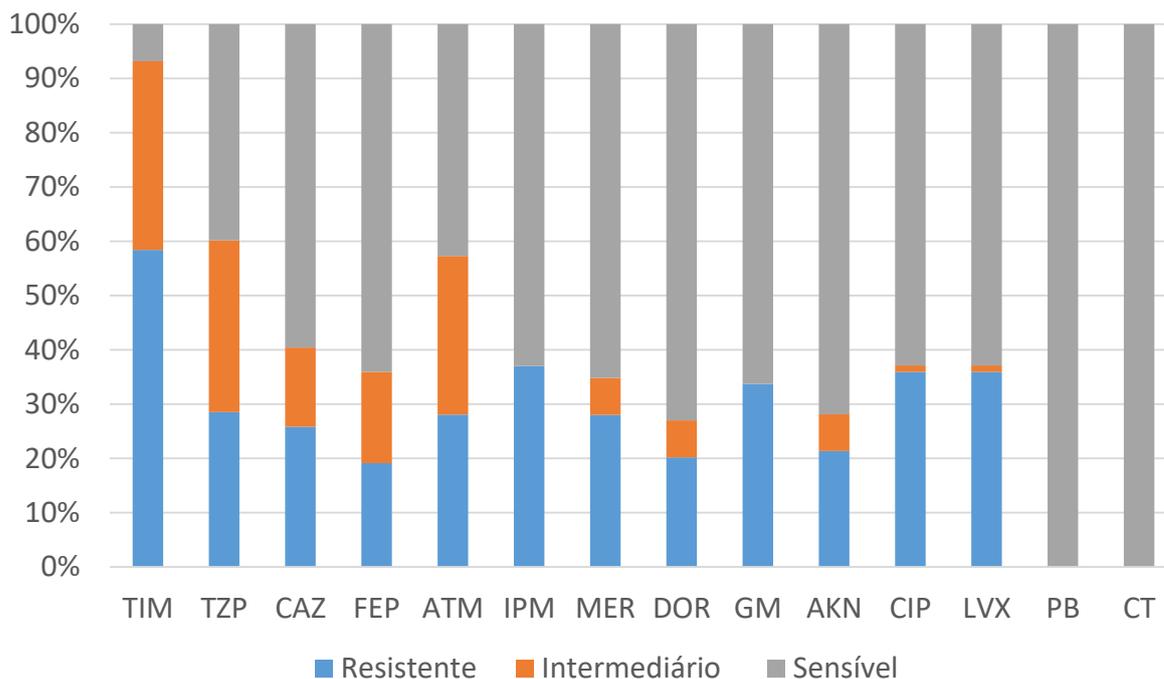


Figura 4.1: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 88 amostras de *P. aeruginosa* isoladas no Rio de Janeiro no período de 1995-2015 incluídas no estudo.

Legenda: AKN – Amicacina; ATM – Aztreonam; TIM – Ticarcilina/Ácido clavulânico; TZP – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; FEP – Cefepime; CIP – Ciprofloxacina; IMP – Imipenem; MER – Meropenem; DOR – Doripenem; GM – Gentamicina; LVX – Levofloxacina.

### 4.2. Análise de perfil de multirresistência

Para considerar a amostra como multirresistente utilizamos o critério proposto por Magiorakos e colaboradores (2011). Diante desta classificação proposta, 28,4% das amostras foram agrupadas no perfil de XDR (n=25), 31,8% (n=28) foram classificadas como MDR; 34,8% como Resistentes (n=31) e 4,5% (n=4) foram Sensíveis a todas as categorias testadas.

Das amostras com fenótipo XDR, 17 apresentaram susceptibilidade apenas as polimixinas e 8 amostras apresentaram susceptibilidade as polimixinas e mais uma outra

categoria de antimicrobianos testados (aminoglicosídeos – n=3; cefalosporinas – n=3; fluoroquinolonas – n=1; carbapenemas – n=1).

Os perfis MDR prevalentes foram os de susceptibilidade aos carbapenemas, cefalosporinas e polimixinas (n=5) e susceptibilidade aos aminoglicosídeos, carbapenemas, fluoroquinolonas e polimixinas (n=10). Enquanto que a maioria das amostras classificadas como resistentes foram não susceptíveis apenas as penicilinas + inibidores de beta-lactamases (n=23).

Tabela 4.1: Perfil de resistência das 88 amostras de *P. aeruginosa* isoladas no Rio de Janeiro no período de 1995-2015.

Perfil	Nº de categorias	Categorias não susceptíveis	Total de amostras
XDR	6	Pen + inib/Cefalosp/ Monobact/Carbap/Aminogl/Fluoroq	17
XDR	5	Pen + inib/Cefalosp/Monobact/Carbap/Fluoroq	3
XDR	5	Pen + inib/Monobact/Carbap/Aminogl/Fluoroq	3
XDR	5	Pen + inib/Cefalosp/Monobact/Aminogl/Fluoroq	1
XDR	5	Pen + inib/Cefalosp/Monobact/Carbap/Aminogl	1
MDR	4	Pen + inib/ Monobact/Aminogl/Fluoroq	5
MDR	4	Pen + inib/ Cefalosp/Monobact/Fluoroq	1
MDR	4	Pen + inib/ Monobact/Carbap/Aminogl	1
MDR	4	Pen+ inib/Cefalosp/Monobact/Carbap	1
MDR	4	Pen + inib/Cefalosp/Carbap/Aminogl	1
MDR	3	Pen + inib/Cefalosp/Monobact	10
MDR	3	Pen + inib/Monobact/Carbap	2
MDR	3	Pen + inib/Carbap/Aminogl	2
MDR	3	Pen + inib/Monobact/Aminogl	1
MDR	3	Pen + inib/Cefalosp/Carbap	1
MDR	3	Pen + inib/Cefalosp/Aminogl	1
MDR	3	Pen + inib/Monobact/ Fluoroq	1
MDR	3	Pen + inib/Monobact/Carbap	1
R	2	Pen + inib/Aminogl	2
R	2	Pen + inib/Monobact	2
R	2	Pen + inib/Carbap	2
R	2	Pen + inib/Fluoroq	1
R	1	Pen + inib	23
R	1	Carbap	1
S	0	-	4

Legenda: XDR - Extensivamente resistente; MDR – Multirresistente; R – Resistente; S – Sensível; Pen + inib – Penicilinas + inibidores; Cefalosp – Cefalosporina; Monobact – Monobactamicos; Carbap – Carbapenemas; Aminogl – Aminoglicosídeos; Fluoroq – Fluoroquinolonas.

Nossos resultados mostraram que houve aumento da resistência aos antimicrobianos ao longo dos anos, com significativo aumento do número de amostras XDR de 1995 para 2015. Durante o primeiro período (1995-1999), das 22 amostras, 9% foram sensíveis aos antimicrobianos testados (n=2), 36,4% resistentes a uma ou duas categorias de antimicrobianos (n=8) e 54,5% foram classificadas como MDR (n=12). No segundo período (2000-2005) foram recuperados 11 isolados onde 45,5% foram resistentes a uma ou duas categorias de antimicrobianos testados (n=5), 36,4% foram classificadas como MDR (n=4) e 18,2% como XDR (n=2). Durante o terceiro período do estudo (2006-2010), 5,1% foram sensíveis (n=2), 46,2% classificadas como resistente (n=18), 23,1% como MDR (n=9) e 25,6% como XDR (n=10). No quarto período (2011-2015), 18,75% (n=3) das amostras foram consideradas MDR e 81,25% XDR (n=13) (Gráfico 4.2).

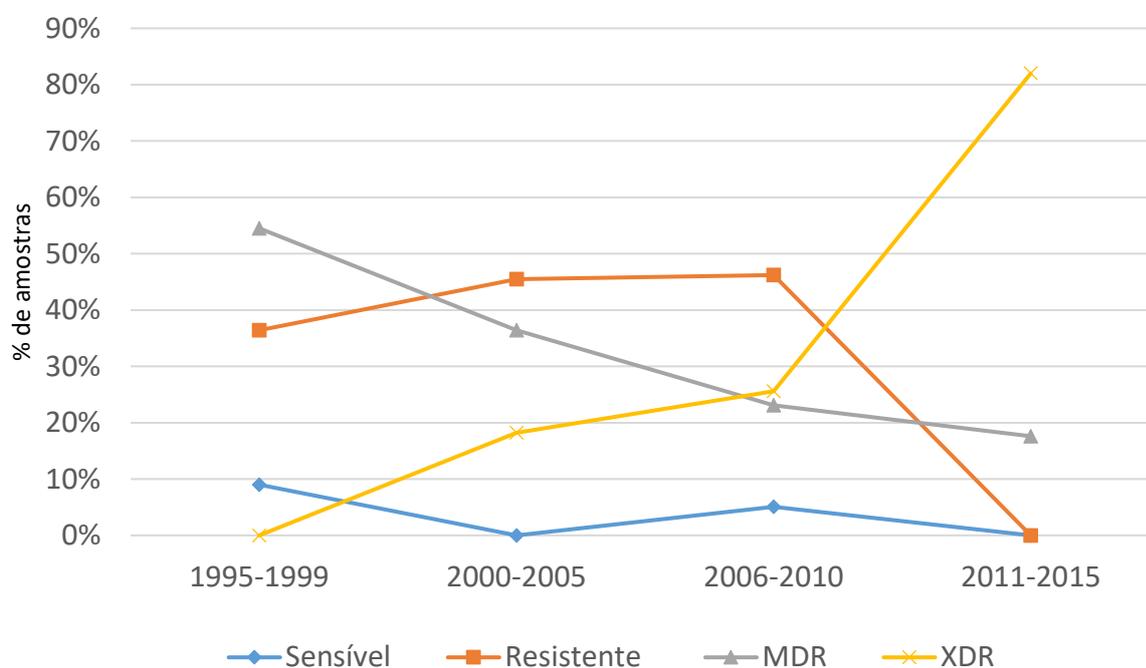


Figura 4.2: Evolução do perfil de resistência ao longo dos 4 períodos estudados.

Analisando individualmente cada classe de antimicrobiano observamos um aumento crescente da resistência plena ou intermediária a todas as categorias testadas, exceto para penicilinas + inibidores de beta-lactamases e polimixinas. O aumento foi bastante expressivo para os carbapenemas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Para os carbapenemas, a taxa de não susceptibilidade no 1º período do estudo foi de 4,5%, no 2º período de 18,1%, 3º período de 43,6%, chegando a 100% no último período. Para as aminoglicosídeos, a taxa de não susceptibilidade passou de 4,5% no 1º período para 76,4% no 4º período. E para as fluoroquinolonas as taxas passaram de 4,5% no 1º período para 70,5% no último período. (Gráfico 4.3).

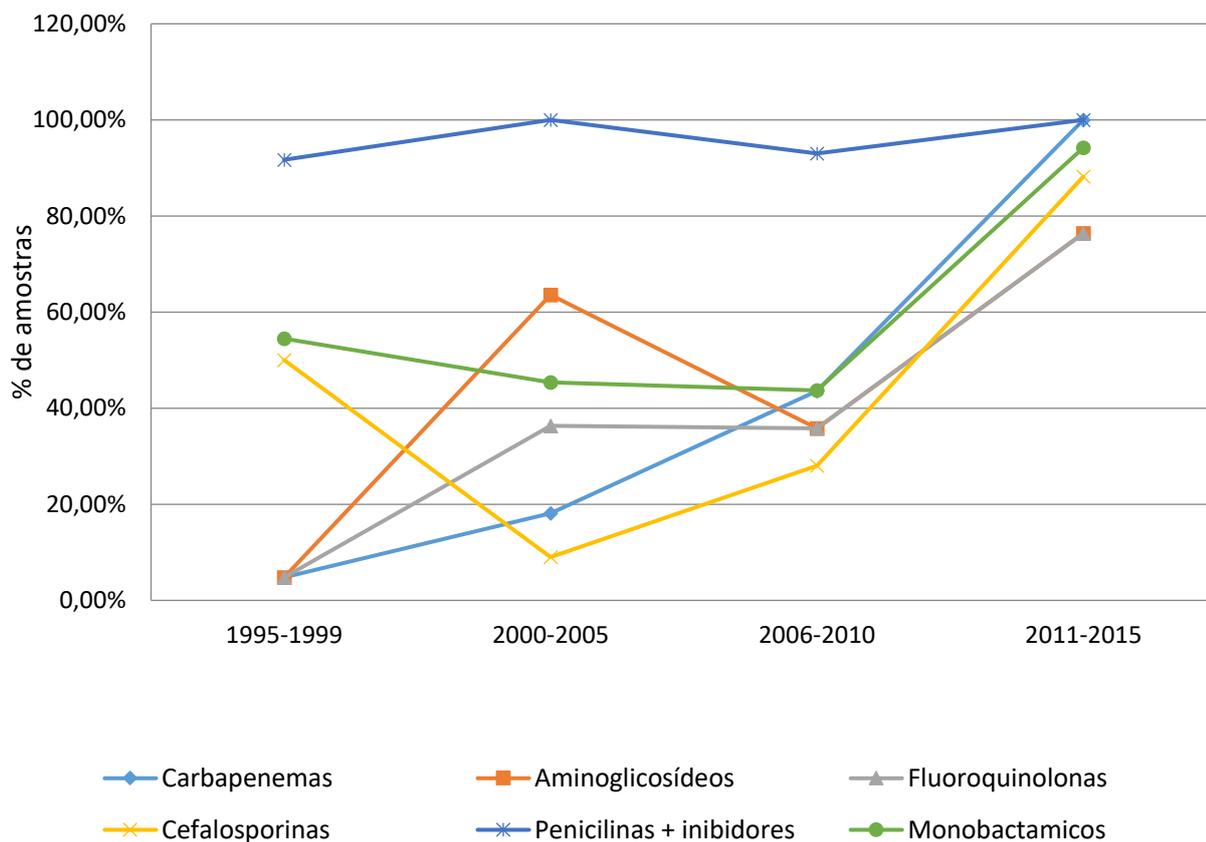


Figura 4.3: Evolução da resistência as classes de antimicrobianos testados nas amostras de *P. aeruginosa* isoladas ao longo dos 21 anos no Rio de Janeiro.

### 4.3. Determinação da concentração inibitória mínima do imipenem

A concentração mínima inibitória (CIM) do imipenem foi realizada pela técnica de Etest para todos os isolados, tendo boa correlação com a disco difusão (96,5%). As CIM variaram de 0,5 a  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  com CIM<sub>50</sub> de  $2 \mu\text{g/mL}$  e CIM<sub>90</sub> de  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  (Gráfico 4.4).

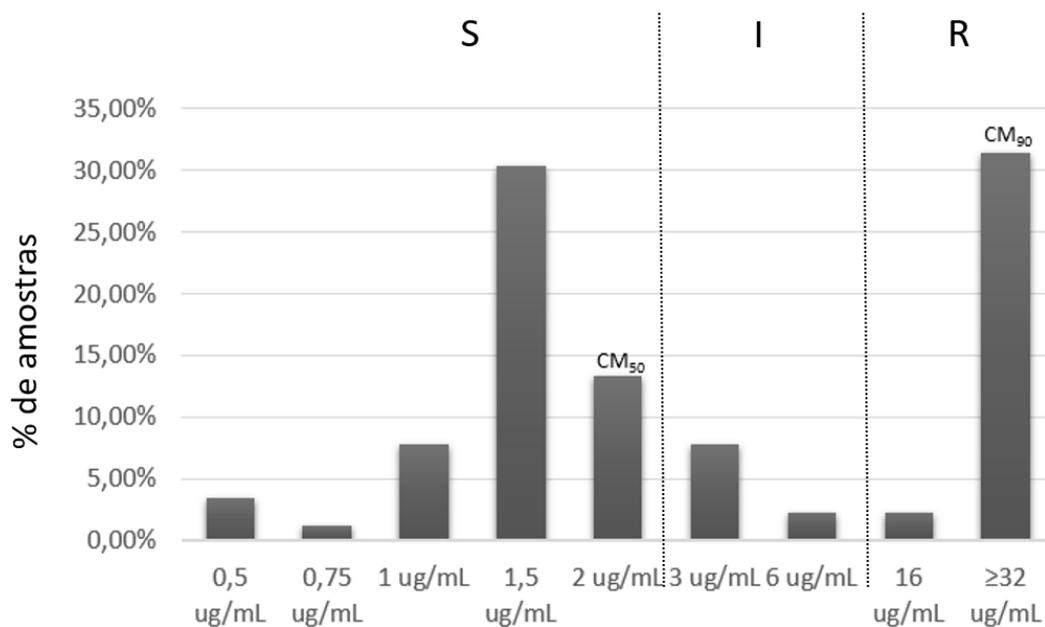


Figura 4.4: Concentração inibitória mínima de imipenem das 88 amostras de *P. aeruginosa* incluídas no estudo.

A CIM do imipenem foi crescente ao longo dos anos. No 1º período de estudo, a maioria das amostras (76,1%) apresentaram CIM = 1,5 µg/ml (CIM<sub>50</sub> = 1,5 µg/ml), no 2º período, 54,5% das amostras apresentaram CIM = 2,0 µg/ml com CIM<sub>50</sub> = 2,0 µg/ml, no 3º período houve uma maior variação de CIM, porém 33,3% das amostras apresentaram CIM ≥ 32 µg/ml (CIM<sub>50</sub> ≥ 32 µg/ml) e no 4º período mais de 76,4% tiveram CIM ≥ 32 µg/ml (CIM<sub>50</sub> ≥ 32 µg/ml) (Gráfico 4.5).

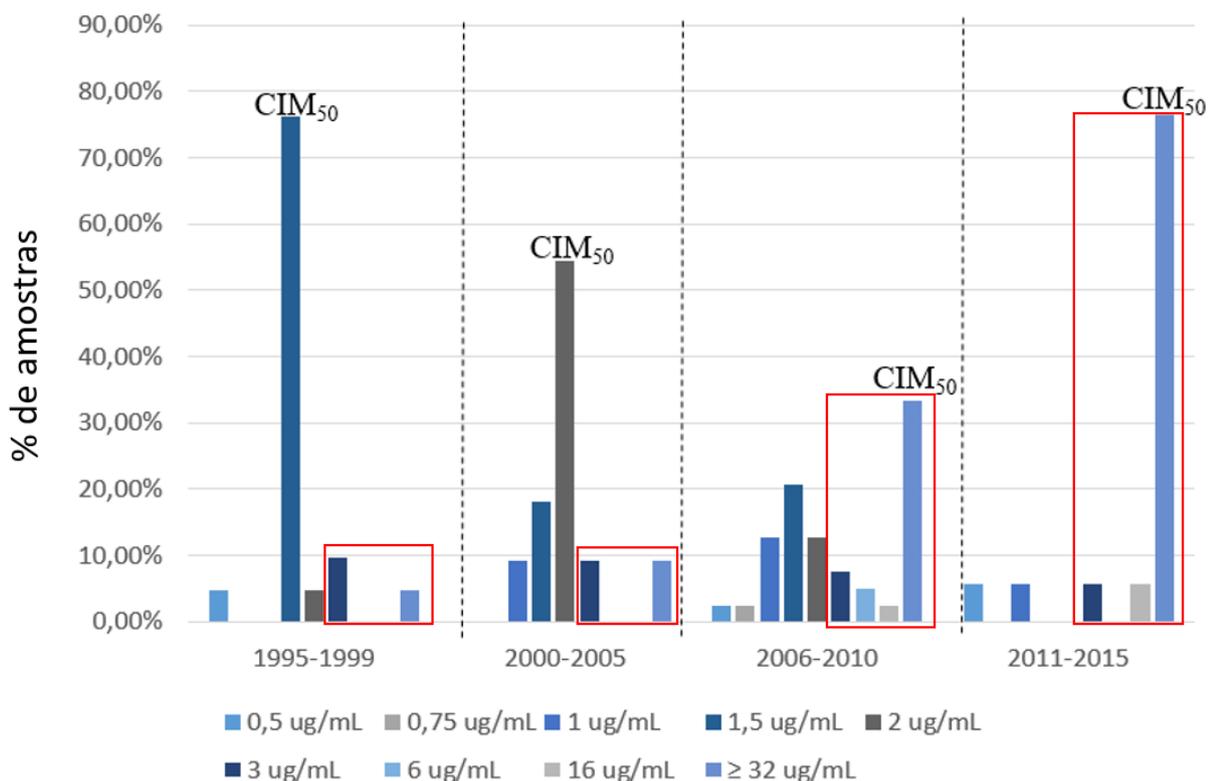


Figura 4.5: Evolução da CIM frente ao imipenem para as 88 amostras de *P. aeruginosa* ao longo de 21 anos de estudo no Rio de Janeiro.

Legenda: Em vermelho as CIM consideradas resistentes.

#### 4.4. Detecção colorimétrica da hidrólise do imipenem – Carba NP

A detecção fenotípica da hidrólise do imipenem foi realizada para todas as amostras resistentes a pelo menos um dos carbapenemas testados (Imipenem, meropenem e doripenem) através do teste de disco difusão, totalizando 36 (40,9%) amostras testadas.

Das 36 amostras testadas, 28 (77,8%) não apresentaram hidrólise do imipenem pelo teste colorimétrico – Carba NP, enquanto 8 amostras (22,2%) apresentaram positividade no teste. Dentre as amostras positivas no teste de hidrólise do imipenem, 3 apresentaram inibição da hidrólise na presença do EDTA, sugestivo de MBL e 5 amostras foram sugestivas da presença de serino carbapenemases, pois não houve inibição da hidrólise na presença do EDTA.

#### **4.5. Detecção dos genes codificadores de carbapenemases**

Todas as 88 amostras foram submetidas a detecção molecular via PCR dos genes codificadores de carbapenemases. O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi detectado em 5 amostras (5,7%), e o gene *bla<sub>SPM</sub>* em 3 amostras (3,4%). Não houve detecção de outras carbapenemases testadas.

Não foi detectado nenhum gene de carbapenemase em amostras sensíveis aos carbapenemas. As amostras positivas para *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>SPM</sub>* apresentaram perfil de resistência aos três carbapenemas testados e CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$  para o imipenem. As amostras positivas para *bla<sub>KPC</sub>* foram isoladas no ano de 2015 (4º período de estudo), oriundas de dois hospitais, uma isolada no hospital H1 e quatro no hospital H5. O gene *bla<sub>SPM</sub>* foi detectado apenas no hospital H5 nos anos de 2007, 2008 e 2010 (3º período de estudo).

#### **4.6. Correlação entre os testes fenotípicos e genotípicos para detecção de carbapenemases**

Das 36 amostras testadas, oito foram positivas para algum gene de carbapenemase testados. As amostras positivas para *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>SPM</sub>* foram corretamente detectadas no teste de hidrólise Carba NP. As amostras positivas para *bla<sub>KPC</sub>* foram identificadas como produtoras de serino carbapenemases e as positivas para *bla<sub>SPM</sub>* foram sugestivas de MBL pelo teste de hidrólise.

Dentre os isolados negativos no teste Carba NP e sem detecção de carbapenemase (n=28) a CIM para o imipenem variou de 0,5 a  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$  sendo que a maioria (71,5%) apresentou CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Associação entre os fenótipos de resistência e detecção de carbapenemases através do teste de hidrólise e PCR.

Genes de Carbapenemase	CIM para imipenem (µg/mL)	Teste de hidrólise	
		Sem EDTA	Com EDTA
<i>bla<sub>SPM</sub></i> (n=3)	≥32	Pos	Neg
<i>bla<sub>KPC</sub></i> (n=5)	≥32	Pos	Pos
Negativas (n=28)	≥32 (n=20); 16 (n=2); 6 (n=1); ≤4 (n=5)	Neg	Neg

#### 4.7. Detecção de genes de resistência aos aminoglicosídeos

A detecção dos genes de resistência aos aminoglicosídeos foi realizada nas amostras que apresentaram resistência plena ou intermediária a pelo menos um dos aminoglicosídeos testados. Desta forma, 35 amostras foram testadas para a presença destes genes. Dentre estas, 5 amostras (14,3%) foram positivas para o gene *rmtD* e mostraram-se resistentes a amicacina e gentamicina. As amostras foram provenientes do hospital H5 nos anos de 2007 (n=1) e 2010 (n=2) e do hospital H9 em 2007 (n=2). Três amostras apresentaram perfil XDR e duas MDR, sendo uma sensível aos carbapenemas.

#### 4.8. Detecção de genes de resistência as fluoroquinolonas

A detecção dos genes plasmidiais de resistência as fluoroquinolonas foi realizada para todas as amostras não susceptíveis a pelo menos uma das fluoroquinolonas testadas. Dentre as 31 amostras submetidas a esta metodologia nenhum dos genes testados (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrS*) foram detectados.

#### 4.9. Avaliação da presença de mutações nos genes *oprD*, *mexT* e *gyrA*

A avaliação da presença de mutações no gene *oprD* foi realizada nas 36 amostras resistentes a pelo menos um dos carbapenemas testados e 9 amostras sensíveis a todos os carbapenemas (selecionadas aleatoriamente), totalizando 45 amostras para esta análise. Destas, foi possível obter a sequência de 24 (53,3%) amostras (9 sensíveis e 15 resistentes), pois de 21 (46,6%) amostras o sequenciamento não obteve qualidade suficiente para análise (valor de *prhed* <20).

Para a análise do gene *mexT*, um total de 42 amostras foram selecionadas de acordo com o perfil de resistência as fluoroquinolonas e/ou carbapenemas. Entretanto, de 18 (38%) amostras as sequências nucleotídicas não tiveram qualidade suficiente (*prhed* <20).

Mutações no gene *gyrA* foram avaliadas em 33 amostras que se mostraram resistentes a ciprofloxacina e/ou levofloxacina. Destas, 27 (82%) sequências foram obtidas, enquanto 6 (18%) não tiveram qualidade de sequenciamento para as análises (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Total de sequências obtidas para os genes de *oprD*, *mexT* e *gyrA*.

	Sequenciamento com valor de <i>prhed</i> >20	Sequenciamento sem valor de <i>prhed</i> <20	Total de amostras
<i>OprD</i>	24 (15 R e 9 S)	21 (53,3%)	45
<i>MexT</i>	27 (64,3%)	15 (35,7%)	42
<i>GyrA</i>	27 (82%)	6 (18%)	33

Legenda: R – Resistentes; S – Sensíveis.

##### 4.9.1. Análise de mutações no gene *oprD*

A sequência nucleotídica do gene *oprD* da cepa *P. aeruginosa* PAO1, sensível aos antimicrobianos foi utilizada como referência. A sequência nucleotídica completa do gene *oprD* possui 1332 pares de base (pb), com os iniciadores utilizados obtivemos uma sequência de 1206 pb, com início do anelamento aproximadamente no nucleotídeo 126 da sequência de referência.

Das 24 amostras com sequências analisadas, três amostras (CCBH 1387, 6234 e 7277) apresentaram a sequência de nucleotídeos idêntica a da amostra PAO. Estas amostras foram isoladas nos anos de 2005, 2007 e 2008 em hospitais diferentes, com perfil de resistência XDR. A CCBH 1387 apresentou CIM para o imipenem de 1,5 ug/mL, enquanto as demais foram resistentes com CIM de  $\geq 32$  ug/mL.

Sete amostras (CCBH 91, 95, 522, 183, 184, 311, 7944) apresentaram PNU (polimorfismo de sequenciamento único) com alteração de aminoácidos, porém sem alteração da proteína, segundo o Provean. Seis destas amostras foram provenientes de 2 hospitais diferentes no primeiro período do estudo e sensíveis aos carbapenemas, com CIM de 1,5 ug/mL para o imipenem. A CCBH 7944 foi isolada em 2005 com fenótipo XDR, apresentou resistência ao imipenem com CIM de  $\geq 32$  ug/mL e sensível ao doripenem.

As demais amostras apresentaram alterações no quadro de leitura devido a inserções (amostras CCBH 6183, 5954, 5894 e 187) ou deleções (amostras CCBH 6152, 5939, 3518, 1151, 7677, 7676, 1259, 7121, 5689, 5966). Dessas, 4 amostras (CCBH 7676, 1259, 7121, 5689) apresentaram nova deleção que restaurou o quadro de leitura anterior o que gerou a alteração de 7 aminoácidos.

As amostras que apresentaram inserção foram resistentes ao imipenem, (CIM de  $\geq 32$  ug/mL) do ano de 2010, com exceção da CCBH 187 que apresentou sensibilidade ao mesmo (CIM 1,5 ug/mL), isolada em 1995 com fenótipo de resistência apenas as penicilinas + inibidores. As CCBH 5954 e 5894 apresentaram fenótipo de XDR, enquanto a CCBH 6183 apresentou fenótipo de resistência somente ao imipenem.

As amostras com deleção foram provenientes de todos os períodos de estudo (1º período - n=1, 2º período - n=1, 3º período - n=6 e 4º período - n=2). A amostra do primeiro período (CCBH 1151) e segundo período apresentaram fenótipo MDR com CIM de  $\geq 32$  ug/mL. As amostras do terceiro período apresentaram fenótipo de XDR (n=2), MDR (n=2) e R (n=1), quatro amostras foram resistentes ao imipenem com CIM de  $\geq 32$  ug/mL, a CCBH 5939 foi produtora de SPM, e duas amostras, CCBH 5689 e 5966, apresentaram CIM de 2 e 0,75 ug/mL, respectivamente (Tabela 4.4; Gráfico 4.6).

Tabela 4.4: Alterações encontradas no gene de *oprD* das 24 amostras sequenciadas.

Modificação	Nº de amostras
Inserção	4
Deleção	10
PNU*	7
WT	3
Total	24

Legenda; PNU\* - Polimorfismo de nucleotídeo único com alteração de aminoácido sem alteração da proteína segundo Provean; WT – Sequencia selvagem, sem alteração.

Figura 4.6: Sequência proteica da oprD obtida para 24 amostras comparadas com a sequência da oprD PAO-1 a partir do resíduo 92 ao 444.

Período	Hospital	IPM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
3°	H9	0,75 $\mu\text{g/mL}$	5966
3°	H5	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	7677
1°	H6	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	1151
3°	H9	2 $\mu\text{g/mL}$	5689
3°	H10	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	7121
2°	H5	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	1259
3°	H5	16 $\mu\text{g/mL}$	7676
1°	H4	1,5 $\mu\text{g/mL}$	187
3°	H5	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	7944
3°	H9	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	6234
3°	H2	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	5894
2°	H5	1,5 $\mu\text{g/mL}$	1387
3°	H10	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	7277
			<b>oprD PAO-1</b>
3°	H5	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	5954
3°	H5	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	3518
3°	H5	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	5939
3°	H9	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	6152
3°	H5	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	6183
1°	H6	1,5 $\mu\text{g/mL}$	183
1°	H4	1,5 $\mu\text{g/mL}$	311
1°	H6	1,5 $\mu\text{g/mL}$	184
1°	H4	1,5 $\mu\text{g/mL}$	91
1°	H4	1,5 $\mu\text{g/mL}$	95
1°	H6	1,5 $\mu\text{g/mL}$	522

Legenda: Preto – sequência diferente da oprD.

#### 4.9.2. Análise de mutações no gene *mexT*

O gene *mexT*, possui 1044 pares de bases. Quando comparados com a sequência de referência PAO1, 26 (92,3%) demonstraram perda de 8 nucleotídeos na posição 236-245 pb, gerando um novo quadro de leitura. Além disso, 13 destas amostras apresentaram uma mutação na posição 178 (C →T) com alteração de aminoácido de Prolina (P) para Serina (S) no resíduo 60, a qual foi considerada neutra para a proteína segundo o Provean. Uma amostra apresentou PNU com alteração de aminoácido em três resíduos, o que inclui o resíduo 60, mais a alteração de uma fenilalanina para isoleucina no resíduo 172 e uma de arginina para prolina no resíduo 336. Destas apenas a alteração no resíduo 336 foi considerada deletéria para a proteína segundo o Provean (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Mutações encontradas no *mexT* nos 27 isolados de *P. aeruginosa*.

Mutações mais encontradas	Nº de isolados	Descrição (n)
Polimorfismo (com alteração de aminoácido)	1	P60S, F172I, R336P (1).
Deleção	26	Deleção de 8 nucleotídeos (CCAGCCGG) na posição 236-245 pb gerando alteração do quadro de leitura (13); PNU P60S e Deleção de 8 nucleotídeos (CCAGCCGG) na posição 236-245 pb gerando alteração do quadro de leitura (13).

Amostras dos 4 períodos do estudo apresentaram a perda de 8 nucleotídeos na posição 236-245pb (Figura 4.7). As 13 amostras que apresentaram alteração de uma prolina para uma serina no resíduo 60 e mais perda de 8 nucleotídeos (CCBH 1306, 1347, 1353, 1259, 1387, 6713, 7277, 8478, 8819, 9332, 7677, 7944, 15031) foram distribuídas entre os anos de 2000 a 2014 e destas, cinco apresentaram resistência somente as fluoroquinolonas, uma somente aos carbapenemas e seis a ambas as categorias. Destas, sete apresentaram fenótipo XDR e 6 foram consideradas MDR.

As outras 13 amostras que apresentaram somente a perda de 8 nucleotídeos (CCBH 139, 1151, 1297, 6152, 7121, 7673, 6570, 7921, 17436, 20479, 20480, 20482, 20483) foram isoladas nos 4 períodos do estudo (1995-2015). Duas foram resistentes as fluoroquinolonas, duas aos carbapenemas e nove a ambas as classes, com fenótipos de R (n=2), MDR (n=5) e XDR (n=7).

A amostra que apresentou apenas PNU com alteração de aminoácidos em três sítios (CCBH 5832) foi isolada em 2010. Era resistente as fluoroquinolonas e sensível aos carbapenemas, tendo fenótipo de resistência de MDR.

Figura 4.7: Sequencia proteica do *mexT* obtida para 27 amostras comparadas com a sequencia da PAO-1.

Período	Hospital	IPM (µg/mL)			
2º	H5	2 µg/mL	1353		
3º	H10	≥32 µg/mL	8478		
2º	H5	1,5 µg/mL	1387		
3º	H10	1,5 µg/mL	9332		
3º	H10	≥32 µg/mL	7277		
2º	H5	2 µg/mL	1347		
4º	H2	≥32 µg/mL	15031		
			mexT PA..		
1º	H4	1,5 µg/mL	139		
4º	H5	≥32 µg/mL	7677		
3º	H5	2 µg/mL	5832		
3º	H10	6 µg/mL	7673		
3º	H9	≥32 µg/mL	6152		
4º	H5	≥32 µg/mL	7921		
3º	H5	≥32 µg/mL	7944		
4º	H9	16 µg/mL	6713		
3º	H5	1,5 µg/mL	1297		
3º	H10	1 µg/mL	8819		
3º	H5	≥32 µg/mL	6570		
2º	H6	3 µg/mL	1306		
1º	H6	≥32 µg/mL	1151		
4º	H5	≥32 µg/mL	20482		
4º	H5	≥32 µg/mL	20483		
2º	H5	≥32 µg/mL	1259		
3º	H10	≥32 µg/mL	7121		
4º	H5	≥32 µg/mL	20479		
4º	H5	≥32 µg/mL	20480		
4º	H5	≥32 µg/mL	17436		

Legenda: Preto – sequencia diferente da oprD. Traço – perda de 8 nucleotídeos.

#### 4.9.3. Análise de mutações no gene *gyrA*

Das 27 amostras analisadas, 21 (77,8) apresentaram alteração na posição 248 (C para T), o que levou a uma alteração de aminoácido, de treonina (T) para isoleucina (I) na proteína. Enquanto 6 amostras (22,2%) não apresentaram esta mutação. Estas 6 amostras foram resistentes às duas fluoroquinolonas testadas e foram consideradas XDR (n=4) e MDR (n=2) e foram isoladas ao longo dos 4 períodos do estudo (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Perfil de mutação e alteração de aminoácidos na região QRDR do gene *gyrA* e o perfil de resistência as fluoroquinolonas testadas.

Nº de amostras	Perfil de resistência		Mutação no gene <i>gyrA</i>	Alteração de aminoácido
	CIP	LVX		
21	R	R	C->T	T83I
6	R	R	WT	WT

Legenda: R – resistente; C – citosina; T – timina; WT – selvagem, sequência sem alteração; T83I – Alteração de uma treonina para uma isoleucina.

#### 4.10. Análise do polimorfismo genético através de PFGE

Para análise da similaridade genética, as 88 amostras de *P. aeruginosa* foram submetidas a tipagem molecular pela técnica de PFGE. Entretanto, em 7 amostras não foi possível obter um perfil de bandas pela metodologia utilizada. Foi incluída nesta análise uma cepa já caracterizada do clone epidêmico brasileiro (Clone SP - ST277) pertencente a CCBH/IOC (CCBH 4851).

Nesta análise, consideramos como pertencentes ao mesmo grupo clonal as amostras que apresentaram no mínimo 80% de similaridade através da análise pelo *software BioNumerics*. Os perfis foram nomeados por letras em ordem alfabética e ultrapassados as 26 letras em maiúsculo, letras em minúsculo foram adicionadas a estas, desta forma os perfis foram nomeados de A até Hh. As 81 amostras analisadas foram agrupadas em 34 grupos clonais, sendo os grupos clonais J (n=11) e U (n=11) os mais frequentes. Um total de 15 amostras apresentou perfil de fragmentação único, com fenótipos de resistência variando de sensível a MDR. Além disso, 4 perfis clonais agruparam 3 amostras, 9 grupos agruparam 2 amostras cada, 1 perfil agrupou 4 amostras e 5 amostras com 2 perfis (Figura 4.8).

A cepa pertencente ao ST277 incluída nesta análise (CCBH 4851) foi agrupada no clone J, onde também foram agrupadas as amostras produtoras de SPM, três amostras positivas para *rmtD*. As amostras deste grupo clonal foram provenientes de três hospitais e isoladas nos 3º e 4º períodos do estudo, (2007 - n=4, 2008 - n=2, 2009 - n=1, 2010 - n=1, 2011 - n=2 e 2014 - n=1) (Figura 4.8 e Figura 4.9).

O perfil clonal U foi predominante no primeiro período do estudo (1996 - n=1, 1997 - n=3, 1998 - n=5), mas também foi encontrado no 3º período do estudo (2008 - n=1 e 2009 - n=1), com perfis de resistência MDR e R. Este grupo clonal foi encontrado em 3 hospitais (H4, H6 e H10). (Figura 4.8 e Figura 4.9).

Nos quatro períodos estudados foi observada uma grande variabilidade de grupos clonais entre as amostras estudadas. Entretanto, no 3º e no 4º período de estudo, observou-se uma maior proporção de amostras com perfis de fragmentação únicos e grupos clonais com duas amostras (52,8% das amostras isoladas no 3º período e 46,7% das amostras do 4º período). Nenhum clone esteve presente em todos os períodos estudados (Figura 4.9).

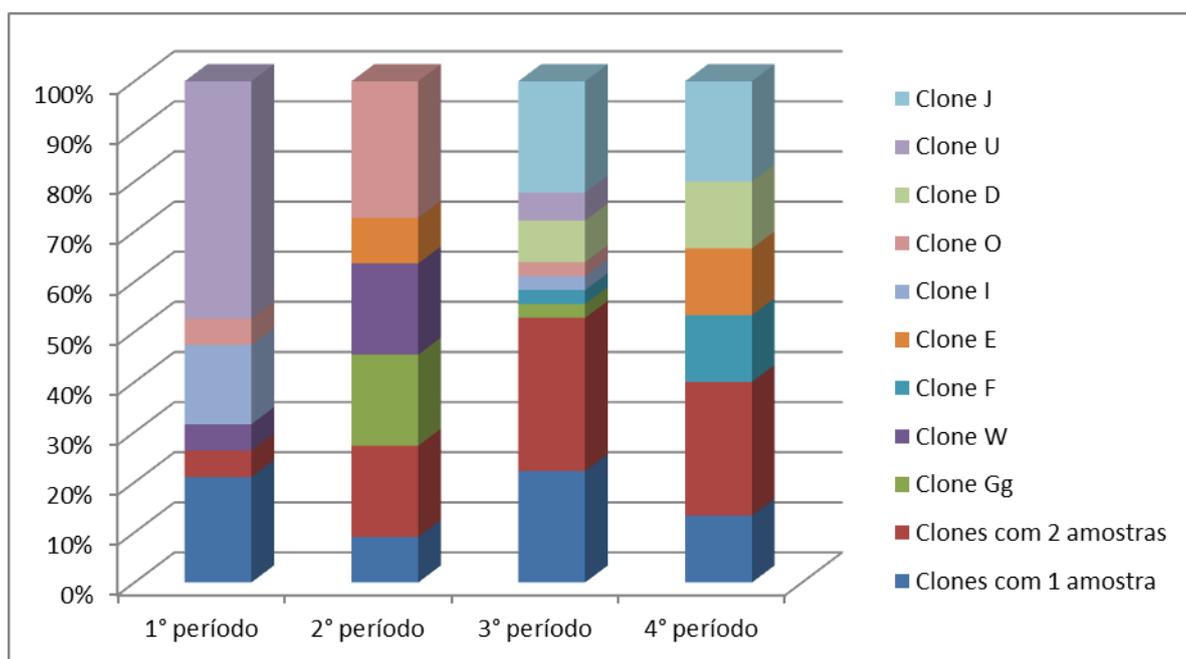


Figura 4.8: Distribuição dos 81 clones encontrados ao longo dos períodos estudados.





## 5. DISCUSÃO

Ao longo dos anos *P. aeruginosa* se tornou um dos principais patógenos associados a IRAS, em parte, pela incrível capacidade de adaptação ao meio ambiente e mecanismos de resistência intrínsecos. Porém, este patógeno tem se tornado ainda mais preocupante pela sua capacidade de desenvolver resistência durante o tratamento (205).

A presença de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar é seguida pelo rápido aumento da resistência a várias classes de antimicrobianos. Além do grande arsenal de resistência, intrínseca e adquirida, esta espécie ainda possui diversos mecanismos de virulência, onde uma vez estabelecida a sua entrada no hospedeiro, sua erradicação se torna um desafio para a comunidade médica (205).

De acordo Gales e colaboradores (2012) a frequência de infecções por *P. aeruginosa* é maior nos países da América Latina. Esta maior prevalência pode ser devido a sua localização geográfica com clima quente e úmido, o que favorece este patógeno. Esta prevalência e resistência intrínseca em *P. aeruginosa* levam a utilização de antimicrobianos de amplo espectro, o que gera maior pressão seletiva para o surgimento de mutantes resistentes (10).

Com isso, é possível observar diferentes padrões de resistência pelo mundo. De acordo com os dados coletados nos EUA, Europa e Regiões do Mediterrâneo, pelo sistema de vigilância SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), durante o período de 2009 a 2012 *P. aeruginosa* foi o patógeno mais isolado de pneumonia apresentando taxas de resistência para os EUA (n= 1439) e Europa e Região Mediterrânea (n=1250) de 15,6% vs 21,3% para piperacilina + tazobactam, 16,1% vs 24% para ceftazidima, 9,5% vs 13,1% para cefepime, 16,1% vs 25,9% para meropenem, 1,7% vs 9% para amicacina, 9,2% vs 21,2% para gentamicina, 21,3% vs 29,1% levofloxacina e 0,3% em ambos para polimixina B (206).

Na Alemanha, um estudo conduzido ao longo de 10 anos, em pacientes com pneumonia, mostrou taxas de resistência crescentes para ciprofloxacina (30,1%; n=168), piperacilina + tazobactam (25,6%; n=168), meropenem (20,2%; n=163), cefepime (16,6%; n= 163), gentamicina (22,2% n= 168) e amicacina (9,7%; n= 103), porém todos sensíveis as polimixinas. O estudo ainda chama atenção para o aumento da resistência a piperacilina + tazobactam, uma das principais opções terapêutica para pneumonia por *P. aeruginosa* na Alemanha (207).

Estudos do SENTRY com amostras da América Latina têm mostrado maior taxa de resistência aos antimicrobianos em relação a outros países. Em 2011, as taxas de resistência em *P. aeruginosa* (n=586) para o imipenem foi de 44,9% e para o meropenem foi de 38,4%. Para os demais antimicrobianos as taxas foram 38,2% para levofloxacina, 29,4% para

gentamicina e ceftazidima, 25,9% para cefepime, 22,9% para piperacilina + tazobactam, 20,5% para amicacina, sendo todos susceptíveis as polimixinas (208).

No Brasil, um estudo envolvendo amostras da corrente sanguínea coletadas entre junho de 2007 e março de 2010 demonstrou elevadas taxas de resistência para gentamicina (45,7%; n=184), ciprofloxacina (45,6%; n=193), cefepime (42,9%; n= 205), imipenem (36,8%; n= 212), ceftaziadima (36,6%; n= 205), meropenem (35,8%; n = 201) e piperacilina + tazobactam (33,9%; n= 174) (209).

Dados da rede de monitoramento e controle da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde da ANVISA mostraram que as taxas de resistência em *P. aeruginosa*, isoladas de infecções da corrente sanguínea no Brasil, durante julho 2006 a junho 2008 foram em torno de 50% para ceftazidima, imipenem, ciprofloxacina, gentamicina e amicacina (210).

Em nosso estudo, as taxas de resistência as FQs e aminoglicosídeos testados variaram de 28 a 37% e as maiores taxas de resistência foram observadas para os beta-lactâmicos, principalmente a ticarcilina + ácido clavulânico (93,2%).

Xu e colaboradores (2013), num estudo realizado na China envolvendo amostras de *P. aeruginosa* isoladas num hospital universitário, ao longo de 9 anos, também observaram as maiores taxas de resistência para ticarcilina + ácido clavulânico (211). Os beta-lactâmicos são uma das principais opções terapêutica para bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* seu uso na prática clínica tem sido relatado por mais de 70 anos e o aumento da resistência a esta classe é notório desde então. O primeiro inibidor de beta-lactâmase, associado a penicilinas anti-pseudomonas foi o ácido clavulânico, descrito em 1972, e utilizado extensivamente em infecções por amostras produtoras de ESBL. Além disso, alguns estudos apontam para a capacidade do ácido clavulânico de induzir a expressão da cefalosporinase *AmpC* em *P. aeruginosa*, tendo, portanto, um papel antagonista para ticarcilina (212). Isto pode explicar a alta taxa de não susceptibilidade a esta combinação encontrada em nosso estudo.

Independente do mecanismo de resistência envolvido, um consenso sobre a definição de MDR e XDR não era claro até a publicação de Magiorakos e colaboradores (2012) (179). Com isso, foi possível observar que a prevalência de amostras de *P. aeruginosa* com fenótipo de MDR vem aumentando ao longo dos anos e alguns estudos apontam para um faixa de 15 a 30% de amostras MDR, além da evolução da resistência de isolados MDR para XDR, o que limita ainda mais as opções terapêuticas. Em nosso estudo foi observado que 60,2% das amostras estudadas apresentavam perfil de resistência MDR ou XDR. Assim, isolados mais resistentes, classificados como MDR ou XDR, são um dos principais problemas nas instituições de saúde de todo o mundo. Com o surgimento destes isolados, surgiu a necessidade de uma vigilância e medidas de contenção de sua disseminação (213, 214, 215, 216).

A resistência microbiana é um problema complexo associado a diversos fatores interligados, como por exemplo, o uso do antimicrobiano em concentrações sub-inibitórias ou ainda o seu uso excessivo. Xu e colaboradores (2013) mostraram que a associação entre o aumento da resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* ao longo de 9 anos (2003-2011) estava relacionado ao uso de antimicrobianos. Esta relação foi estatisticamente significativa para imipenem, meropenem, ceftazidima e cefepime (211).

No presente estudo, também observamos um aumento da resistência as principais classes de antimicrobianos como carbapenemas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos ao longo dos anos, inclusive o aumento do percentual de amostras XDR. As CIM<sub>50</sub> para o imipenem também apresentaram aumento ao longo dos anos.

No primeiro período do nosso estudo (1995 – 1999) apenas 4,5% das amostras eram resistentes aos carbapenemas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Entretanto estudos publicados com amostras de *P. aeruginosa* isoladas em hospitais no Rio de Janeiro neste mesmo período de estudo mostravam taxas de resistência mais elevadas que as encontradas em nosso estudo.

Romão e colaboradores (2005) mostraram que 71% das amostras de *P. aeruginosa* isoladas no Rio de Janeiro, durante o período de 1995 à 2002, foram considerados com perfil de MDR e a maior taxa de não susceptibilidade foi dada ao imipenem (89%), seguido de piperacilina + tazobactam (79%), cefepime e ceftazidima (57%) (217). Em outro estudo realizado por Moraes e colaboradores (2002) com amostras de *P. aeruginosa* isoladas, durante o período de 1997 a 1999, no Hospital Maternidade Alexandre Fleming, no Rio de Janeiro, também mostrou taxas de resistência mais elevadas a amicacina (85%) e imipenem (35%) (218).

Em um estudo conduzido no Rio de Janeiro durante o período de outubro 1999 a abril de 2000, foram isoladas 85 amostras de *P. aeruginosa* de diferentes infecções em um hospital terciário. Estas amostras apresentaram elevadas taxas de resistência aos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e FQs, todas sensíveis as polimixinas (219). Enquanto isto, em 1998 foi relatado no Hospital Universitario Clementino Fraga Filho (HUCFF) amostras de *P. aeruginosa* sensível somente as polimixinas. As taxas de resistência relatadas neste período por Pellegrino e colaboradores (2002) foram de 48% para gentamicina, 43% para ciprofloxacina, 41% para cefepime, 38,3% para imipenem, 36,5% para piperacilina + tazobactam e ceftazidima, 35,6 % para amicacina e 30,4% para meropenem. Enquanto que Cacci e colaboradores (2013), durante 2007 e 2008, relatou resistência de 37,5% para ceftazidima e cefepime, 36,4% para piperacilina + tazobactam, 35,2% para o imipenem, 34,1% para ciprofloxacina e gentamicina, 27,3% para meropenem e 18,2% para amicacina (220, 221).

A partir do segundo período do nosso estudo (2000-2005), as taxas de resistência aos carbapenemas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos começaram a aumentar (18,1%, 36,3% e 63,6%, respectivamente), chegando a níveis bastante altos no último período de estudo (100%, 76,4% e 76,4%, respectivamente). Este importante aumento nas taxas de resistência, principalmente aos carbapenemas pode ser explicado pelo aumento do uso dos carbapenemas, principalmente imipenem, desde o final da década de 90, nos hospitais brasileiros devido ao surgimento e aumento de amostras produtoras de ESBL, o que, provavelmente, gerou uma pressão seletiva de amostras com múltiplos mecanismos de resistência. Além disso, no início dos anos 2000 houve a disseminação da MBL SPM-1 entre amostras de *P. aeruginosa* isoladas em diferentes estados no Brasil (94, 222).

Um estudo realizado durante os anos de 2001 a 2008, com amostras de *P. aeruginosa* isoladas do sul do Brasil mostrou que de 142 amostras resistente aos carbapenemas, provenientes de colonização e/ou infecção, 91 possuíam o gene *bla*<sub>SPM</sub> e duas o *bla*<sub>IMP</sub>. O perfil de resistência foi ainda mais preocupante ao mostrar elevadas taxas de não susceptibilidade a ciprofloxacina (94%), gentamicina (92%), cefepime (88%), ceftazidima (84%), amicacina (82%), aztreonam (61%) e piperacilina + tazobactam (58%). Além da resistência a polimixina B em 13% das amostras (223).

O surgimento mundial de bactérias resistentes aos carbapenemas, pela presença de carbapenemases, tem grande importância pela sua fácil disseminação, uma vez que estes genes estão presentes em elementos genéticos móveis, e podem ser disseminados através da transferência horizontal de genes (224). Em nosso estudo encontramos 5 amostras (5,6%) de *P. aeruginosa* produtoras da carbapenemase KPC e 3 amostras (3,8%) produtoras da MBL SPM. As amostras produtoras de SPM foram isoladas entre 2007 a 2010 e as amostras produtoras de KPC em 2015. No Rio de Janeiro, Pellegrino e colaboradores (2008) foram capazes de detectar o gene *bla*<sub>SPM</sub> em 18 amostras isoladas em 5 hospitais, entre os anos de 1999 e 2000, de um total de 71 amostras resistentes aos carbapenemas (225). Por outro lado, um outro estudo realizado em um dos hospitais avaliados no estudo anterior, mostrou uma diminuição da detecção da SPM durante o período de 2007 a 2008, onde, de um total de 31 amostras resistentes ao imipenem, apenas uma amostra apresentou o gene *bla*<sub>SPM</sub> (221).

Ainda no Rio de Janeiro, Silva e colaboradores (2016) demonstraram que de 35 amostras isoladas de queimaduras em um Hospital público durante o período de setembro a dezembro de 2012, 34,3% carream o gene de *bla*<sub>GES-1</sub>, sem a detecção do gene *bla*<sub>SPM</sub> entre as amostras (226).

Dessa forma, estes estudos mostram que apesar da carbapenemase SPM ter se disseminado no Brasil no início dos anos 2000, e ter sido relatada em cerca de 40% das amostras

resistentes aos carbapenemas daquela época, atualmente, esta enzima não é mais o principal mecanismo de resistência aos carbapenemas entre as amostras de *P. aeruginosa* (227, 228, 229).

O gene *bla*<sub>KPC</sub> é uma carbapenemase de classe A encontrada frequentemente em *K. pneumoniae* que rapidamente se disseminou para outros BGN pela sua presença em elementos móveis, como plasmídeos. O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> já foi encontrado em *P. aeruginosa* em alguns países como China (230), Irã (231), EUA (232), Trindade e Tobago (233), tendo alta incidência na Colômbia e Argentina (234, 235). No Brasil, *P. aeruginosa* produtora de *bla*<sub>KPC</sub> já foi detectada em Pernambuco e São Paulo (80, 236).

Os resultados do nosso estudo estão de acordo com o estudo de Rizek e colaboradores (2014), onde as amostras produtoras de SPM foram isoladas entre os anos 1998 a 2012 (primeiros períodos do estudo) e as amostras produtoras de KPC nos anos 2011 e 2012 (último período do estudo) em um hospital em São Paulo. Isto reflete o período de disseminação de SPM no Brasil e no Rio de Janeiro e a identificação de KPC em amostras clínicas de *P. aeruginosa* a partir de 2012 (236).

Em Recife, Cavalcante e colaboradores (2012) recuperaram amostras de *P. aeruginosa* (n=73) de um hospital em dois períodos, 2002-2003 e 2008-2009, e mostraram que durante o período 2002-2003 houve uma prevalência da MBL SPM (98,4%), estando de acordo com o que era encontrado nos trabalhos da época, porém durante o período de 2008-2009 essa prevalência diminuiu significativamente (25%), sugerindo outros mecanismos de resistência não carbapenemases. Embora a SPM tenha diminuído, o aumento da resistência foi maior durante o período 2008-2009 a todos os antimicrobianos testados (237). Em nosso estudo apesar de não encontrarmos nenhuma MBL durante o último período, as maiores taxas de resistência foram observadas neste período, com a detecção de 5 amostras produtoras de KPC.

Apesar de ser menos prevalente em *P. aeruginosa*, em comparação com outros BGN, a incidência de KPC vem crescendo em todo o mundo, levando a nos questionar se a sua presença em *P. aeruginosa* vai prevalecer assim como nos demais BGN. Podemos especular que esta disseminação pode ocorrer pelo aumento deste gene no ambiente hospitalar.

A presença de uma SPM e KPC, em um único isolado, já foi relatada no Brasil, no estado de São Paulo. Isolados de *P. aeruginosa* produtora de KPC com MBL também já foi relatada em outros lugares, como *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>IMP</sub> em Porto Rico e *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> na Colômbia (237, 238, 239, 240, 241).

A rápida detecção de isolados produtores de carbapenemases fornece informações cruciais para tomada de medidas mais eficazes de sua disseminação. Com isso, várias técnicas têm sido propostas para detecção destas amostras, incluindo espectrofotometria (242), MALDI-TOF (243), e técnicas moleculares (244). Apesar de apresentarem boa sensibilidade e

especificidade, estas requerem custos em treinamentos, equipamentos e tempo. Pensando mais na prática clínica, a detecção fenotípica da produção de carbapenemases tem sido bastante utilizada. As metodologias mais utilizadas baseiam-se na inibição da atividade de carbapenemase pela ação de inibidores (EDTA – inibidor de MBL e ácido fenilborônico – inibidor de serino carbapenemases). Apesar de apresentarem boa correlação com a detecção genotípica de carbapenemases, estes testes requerem um longo tempo de incubação (18-24 horas) (245).

Recentemente, foi proposta uma metodologia bioquímica para a detecção de carbapenemases chamada de Carba NP. Esta metodologia se baseia na detecção da hidrólise do imipenem através da modificação do pH e consequente alteração de cor (246). Este teste é recomendado, pelo CLSI, para Enterobactérias, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. apresentando sensibilidade e especificidade maior que 90% na detecção de KPC, NDM, VIM, IMP, SPM e SME, ou seja, as carbapenemases de classe A e B, porém com baixa sensibilidade e especificidade (em torno de 11%) para carbapenemases de classe D, como a OXA-48 (247). Contudo, poucos artigos mostram a aplicação do teste para SPM (248).

Em nosso estudo, todas as amostras produtoras de SPM e KPC foram corretamente identificadas pelo teste Carba NP, mostrando boa correlação entre o PCR para detecção de carbapenemases e o teste de hidrólise. Das 36 amostras resistentes ao imipenem, 28 amostras não apresentaram hidrólise do imipenem pelo Carba NP e nem a presença de genes de carbapenemases pesquisados, o que pode sugerir a presença de mecanismos não enzimáticos nestas amostras. Entre estes mecanismos, destacam-se a perda da permeabilidade através de porinas e sistemas de efluxo (249).

Perfis MDR ou XDR são frequentemente associados ao aumento das taxas de mutações espontâneas devido a pressão seletiva exercida, a adaptação, regulação entre os mecanismos de resistência, virulência e as elevadas taxas mutacionais em *P. aeruginosa* que contribuem para a sobrevivência desta espécie no ambiente hospitalar (185).

A diminuição da permeabilidade, pela inativação da porina OprD é um dos mecanismos mais comuns de resistência ao imipenem em *P. aeruginosa*, podendo ocorrer em 50% das infecções tratadas por período superior a 7 dias com (250). Isto tem sido observado em diferentes partes do mundo. Em Taiwan, um estudo com 78 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem, isolados de bacteremia durante o período de 2000 a 2010, mostrou a presença de carbapenemases do tipo VIM em 5 amostras, mas o principal mecanismo de resistência aos carbapenemases detectado foi a alteração no gene da porina *oprD* e a produção de sistemas de efluxo (251). No estudo realizado por Kim e colaboradores (2016), das 55

amostras de *P. aeruginosa* estudadas, 22 eram resistentes ao imipenem e, com exceção de uma amostra, todas as outras apresentaram alterações no gene *oprD* (252).

A inativação desta porina pode ocorrer por várias vias, sendo a principal por mutações no gene *oprD*, como por exemplo por PNU gerando códon de parada prematuro, inserções ou deleções, alterando o quadro de leitura da proteína (253). A proteína OprD tem estrutura de barril com 8 alças transmembranares. Alterações na alça 3, devido a alterações de aminoácidos, inserções ou deleções, podem contribuir para o aumento da CIM ao imipenem (254).

A inserção de diferentes sequências de inserção (IS) também tem sido caracterizadas no gene *oprD* em amostras clínicas de *P. aeruginosa*. A IS do tipo ISRP10 foi a primeira a ser relatada dentro do codon 69 do gene da *oprD* na Croácia. A ISPa8 já foi encontrada no gene de *oprD* em isolados de FC nos EUA, assim como a sequência ISPa1635. Na China, a sequência ISOA1328 tem sido relativamente problemática ao elevar a CIM do imipenem pela alteração da sequência gênica da *oprD*. Esta mesma sequência foi identificada na França nos genes de *oprD* (255, 256, 257, 258, 259, 260, 261).

Em nosso estudo, das 24 amostras analisadas, 14 apresentaram alteração no gene *oprD* que possivelmente levariam a alteração da proteína. As alterações do tipo inserção ou deleção foram as mais frequentemente encontradas entre as sequências nucleotídicas alteradas. Entretanto, encontramos algumas amostras com perfil XDR e com CIM para imipenem  $\geq 32$  ug/mL que não possuíam nenhuma mutação na região analisada, quando comparada a *P. aeruginosa* PAO. Assim, é possível que a resistência aos carbapenemas nessas amostras seja devido a outros mecanismos de resistência. Entretanto, não analisamos todo o gene, logo não podemos descartar a possibilidade de alterações nas regiões não analisadas.

Além disso, três amostras sensíveis ao imipenem apresentaram alterações que possivelmente alteraria a sequência proteica, de acordo com o Provean. Amostras com alterações na sequência do gene *oprD* e susceptíveis ao imipenem já foram relatados. No estudo de El Amin e colaboradores (2005), quatro amostras susceptíveis ao imipenem apresentaram mutações no gene *oprD*, que levavam a alteração do quadro de leitura, ocasionando diminuição da expressão deste gene. Estes dados mostram que o fenômeno da resistência em *P. aeruginosa* é multifatorial e nem sempre corresponde ao fenótipo encontrado (262).

Em Recife foi detectado que 5 amostras produtoras de *bla*<sub>GES-1</sub> possuíam alteração da *oprD* através de códons de parada e o único isolado produtor de SPM apresentou alteração do quadro de leitura e geração de códon de parada na *oprD*. Além disso, os isolados sem carbapenemases apresentaram aumento da AmpC e alteração do quadro de leitura da *oprD*, gerando uma proteína não funcional (263).

Além da diminuição da permeabilidade e produção de carbapenemases, *P. aeruginosa* pode se tornar resistente aos carbapenemas pela produção de sistemas de efluxo como os sistemas ABM e EFN.

Em nosso estudo, investigamos a presença de mutações no gene *mexT* que é um regulador positivo do sistema EFN. Este gene é um regulador da família *LysR* e também tem sido associado a regulação de outras proteínas e sistemas, incluindo a regulação negativa da expressão de OprD e do sistema de efluxo ABM. Assim, a perda de 8 nucleotídeos encontrada no gene *mexT*, em quase todas as amostras testadas em nosso estudo, além de levar a expressão do sistema de efluxo EFN pode também estar contribuindo para diminuição da expressão da OprD (264). Entretanto, dentre as amostras analisadas observamos amostras sensíveis aos carbapenemas que apresentavam mutações no gene *mexT*. Dessa forma, como dito anteriormente a resistência em *P. aeruginosa* é multifatorial.

Esta mesma perda de 8 nucleotídeos já foi relatada em diversos artigos e trabalhos em diferentes amostras clínicas e muitos estudos relacionam esta perda ao aumento da expressão do *mexT* seguido do aumento do *mexS*, sendo ambos necessários para regulação de alguns fatores de virulência em *P. aeruginosa*. Em modelos experimentais, tem sido proposto que *mexS* modula *mexT*, que ativa o sistema e leva ao aumento da produção de piocianina e elastase, enquanto suprime a expressão do sistema de secreção do tipo 3, além do sistema de Quorum Sensing (265).

O tratamento para infecções por *P. aeruginosa*, geralmente, é realizado pelo sinergismo de duas classes de antimicrobianos. Geralmente a associação de um beta-lactâmico com um aminoglicosídeo ou uma fluoroquinolona. Porém, como observado no presente estudo, amostras MDR e XDR podem apresentar resistência a todas estas classes comprometendo o sucesso terapêutico (90).

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos em BGN-NF são as EMAs. No Brasil e no México, os genes *aac(6')/aadA1* e *aadA2* parecem ser os mais frequentes. Na Europa tem sido observado a prevalência de *aac(6')* e *ant(2'')*, na Coreia, os genes *aph(3')-VI*, *ant(2'')* e *aac(6')* e no Iran a presença de *aac(6')*, *aad(2'')* e *aph(3')* tem sido bem identificados. O fato destes genes estarem localizados em integrons e amostras carregarem múltiplas cópias destes genes, contribuem para a sua disseminação e aquisição (266, 267, 268).

As diferenças na epidemiologia das EMAs podem se dar pelas diferentes pressões seletivas exercidas em relação a utilização dos aminoglicosídeos. Outros mecanismos também podem estar envolvidos no fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos, como alterações da permeabilidade de membrana, sistemas de efluxo, alterações na subunidade ribossomal e enzimas 16s RNA metilases (269, 270).

Um dos mecanismos mais recentes de resistência aos aminoglicosídeos e que confere altos níveis de resistência a toda a classe é a produção de 16s RNA metilases. Em nosso estudo, detectamos a presença de 5 amostras produtoras de RmtD.

A RmtD é particularmente problemática no Brasil e tem sido descrita principalmente em amostras produtoras de SPM, conferindo um fenótipo de resistência preocupante de MDR ou XDR (271). *P. aeruginosa* produtoras de SPM e RmtD são extremamente preocupantes no ambiente hospitalar e estudos demonstram que sua presença não está apenas restrita a este ambiente. Fontes e colaboradores (2011) demonstraram a presença de *P. aeruginosa* carreando SPM e RmtD no rio Tiete em São Paulo, levantando o questionamento do monitoramento de amostras ambientais e seu papel como reservatório de genes de resistência (272). A localização genética do *rmtD* em *P. aeruginosa* tem sido associada a um elemento genético móvel chamado ISCR14 adjacente a um integron de classe 1, chamado *InI63*, localizado em uma ilha genômica denominada de PEGI-13 (273).

Em relação às FQs, apesar de outros mecanismos de resistência a estas drogas estarem envolvidos, como a expressão de sistemas de efluxo e a alteração de permeabilidade, as mutações nas regiões QRDR dos genes *gyr* e *par* são os principais mecanismos de resistência. Mutações nos genes *gyrA* e *parC* levam a resistência a altas concentrações de FQs, enquanto que mutações no *gyrB* e *parE* causam resistência a baixas concentrações e são descritas em menor proporção nas amostras clínicas (276, 277).

Em nosso estudo, das 27 amostras pesquisadas para a presença de mutações na região QRDR do gene *gyrA*, 21 amostras apresentaram uma alteração de nucleotídeo (C-T) na posição 248 pb, o que levou a uma alteração do aminoácido 83 (de treonina para uma isoleucina). Este mesmo tipo de mutação tem sido descrita como o principal mecanismo de resistência as FQs em *P. aeruginosa*. No Iran, de 100 amostras de *P. aeruginosa* coletadas de 2013 a 2014, a resistência a ciprofloxacina foi de 64%. Nas amostras susceptíveis ou com resistência intermediária não foram detectadas nenhum tipo de alteração nas sequências de *gyrA* e *parC*. Dentre as amostras resistentes, todas apresentaram a mesma alteração encontrada em nosso estudo. Em cinco amostras foi observado também alterações no resíduo 87 e em 44 amostras também foi observado alterações no *parC* (277).

Dentre as amostras em que foram investigadas as mutações no *gyrA* no presente estudo, seis amostras não possuíam mutações neste gene. Estas amostras foram distribuídas em todos os períodos do estudo, apresentaram resistência plena às FQs com fenótipo de MDR (n=2) e XDR (n=4), sendo uma produtora da SPM. Estes dados especulam o papel dos sistemas de efluxo ou mecanismos plasmidiais na resistência as FQs.

Na década de 90, foram descritos mecanismos plasmidiais de resistência as FQs (genes *qnr*, *acc(6')-Ib-cr* e *qep*), principalmente em *Enterobacteriaceae*. Sua presença em BGN-NF é rara, porém preocupante (146). Em nosso estudo, investigamos a presença de genes *qnr* entre as amostras que apresentaram resistência plena ou intermediária a pelo menos uma das fluoroquinolonas testadas e não encontramos nenhuma amostra positiva, o que está de acordo com os estudos publicados até o momento (278).

Para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* MDR ou XDR, principalmente aquelas produtoras de carbapenemases, tem sido utilizado as polimixinas. Vários estudos têm mostrado o aumento da resistência a esta classe de antimicrobianos principalmente em *K. pneumoniae* produtoras de KPC (279). Apesar de já haver alguns relatos de resistência a esta classe de antimicrobianos em *P. aeruginosa*, em diferentes regiões do mundo, geralmente baixa (<5%) (280), em nosso estudo todas as amostras foram consideradas sensíveis. A resistência as polimixinas tem surgido como consequência da maior utilização para tratamento de infecções MDR e XDR.

Devido a grande disseminação de KPC no mundo e a dificuldade de tratamento dessas infecções, em fevereiro de 2015 foi aprovada, nos EUA, uma nova opção terapêutica contra este tipo de infecção, Ceftazidime / avibactam (Avycaz®). No estudo publicado por Levasseur e colaboradores (2012), a ceftazidima foi o beta-lactâmico que apresentou maior atividade quando associada ao avibactam. Para *P. aeruginosa*, esta droga também tem se mostrado bastante eficaz. De 126 amostras de *P. aeruginosa* coletadas de 2006 a 2007, 65% foram susceptíveis a ceftazidima e quando associada ao avibactam esta susceptibilidade passou para 94%. Porém, este novo inibidor não abrange as MBLs. Assim, a pressão seletiva exercida por esta nova droga pode levar a uma maior disseminação de MBL em diferentes regiões do mundo (281, 282).

Com o surgimento de bactérias MDR e XDR em todo o mundo, os estudos sobre a determinação da epidemiologia da disseminação destas amostras tornam-se fundamentais. No Brasil, através de técnicas de tipagem molecular, foi possível mostrar a existência de um clone epidêmico produtor de SPM. Através da técnica de PFGE foi observado similaridades dos perfis de fragmentação do DNA entre amostras produtoras de SPM isoladas em diferentes estados brasileiros. Este clone foi então chamado de Clone SP (94). Posteriormente, pelo método de MLST, que tem se mostrado uma valiosa ferramenta no entendimento da epidemiologia de bactérias MDR, XDR e PDR, foi determinado que o Clone SP pertencia a sequência tipo 277 (ST277) (283).

Em nosso estudo, usando uma cepa produtora de SPM, pertencente ao ST277 (CCBH 4851) como parâmetro para comparação no PFGE, foi possível observar que no Rio de Janeiro,

as amostras produtoras de SPM assim como a amostra CCBH 4851 foram agrupadas no grupo clonal J. Este clone apresentou elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos, com perfis de MDR e XDR além da acumulação de mecanismos de resistência, como o gene *rmtD*, alterações no gene *oprD*, *mexT* e no gene *gyrA*.

O sequenciamento total de uma amostra do clone SP produtora de SPM do estado de Goiás, no ano de 2008, revelou então a presença de outros determinantes de resistência aos aminoglicosídeos, *aacA4*, *aph (31)IIIb*, *aadA7* e *rmtD* e aos beta-lactâmicos, *bla<sub>OXA-50</sub>*, *bla<sub>OXA-56</sub>* e *bla<sub>SPM</sub>* (284). Mostrando a capacidade de clones resistentes albergarem diferentes mecanismos de resistência.

As amostras pertencentes ao clone J (clone SP) foram isoladas de 2007 a 2014 (3º e 4º períodos do estudo). Apesar de não termos encontrado este clone entre as amostras isoladas no 1º e 2º períodos, Pellegrino e colaboradores (1999) foram capazes de detectar o clone SP em 1999 em um hospital universitário no Rio de Janeiro (220).

Estudos tem demonstrado a diminuição deste clone, juntamente com detecção da MBL SPM. Em um hospital em Recife foi demonstrado diferenças significativas na epidemiologia molecular das infecções por *P. aeruginosa*, durante o período de 2002-2003 e 2008-2009, onde no primeiro período foi relatado a prevalência do clone SP, produtor da SPM em 98,4% das amostras, considerado alto para os estudos da época. Entretanto, durante o período de 2008-2009 a presença desse clone diminuiu drasticamente, mostrando uma diversidade clonal maior do que a relatada durante o primeiro período, além do aumento da resistência (285).

Rizek e colaboradores (2014) demonstraram, através de PFGE, a presença de 6 perfis clonais entre 19 amostras que albergavam o gene *bla<sub>SPM</sub>*. Destas, 10 co-abrigavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, sendo que 6 pertenciam ao mesmo clone, mostrando que diferentes clones podem estar associados a disseminação e consequente estabelecimento de um surto (236). Em nosso estudo, 4 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de KPC foram oriundas do hospital H5 do ano de 2015, sendo que 2 pertenciam ao mesmo clone (Q), uma ao clone P junto com uma amostra do hospital H3, no ano de 2013 e uma não foi possível determinar o perfil de fragmentação. Um outro perfil foi encontrado no hospital H1 no ano de 2015. Estes dados demonstram que o *bla<sub>KPC</sub>* não está associado a um clone específico, mas sim a sua localização em elementos genéticos móveis o que facilita a sua disseminação para diferentes amostras no ambiente hospitalar.

Em nosso estudo, durante o primeiro período, das 21 amostras analisadas, foram detectados 8 perfis clonal pelo PFGE, com a prevalência do perfil U em diferentes hospitais durante os anos de 1997, 1998 e 1999. Este clone também foi detectado no 3º período do estudo. No estudo realizado por Romão e colaboradores (2005) com 35 amostras isoladas em diferentes hospitais no Rio de Janeiro, entre 1996-2000 foi observado a presença de 18 perfis

clonais com prevalência de um clone entre os anos estudados em diferentes hospitais (217). Em ambos os estudos houve a prevalência de um clone neste período. Entretanto, não podemos afirmar que seja o mesmo clone.

Em nosso estudo, encontramos uma grande variedade de grupos clonais ao longo dos anos. A alta diversidade genética encontrada também já foi observada em *P. aeruginosa* em outros estudos por diferentes técnicas (PFGE, RIBOTIPAGEM, MSLT, etc) e pode ser explicada pela alta recombinação genética nesta espécie, garantindo uma estrutura populacional não relacionada (286, 172)

Em parte, a grande capacidade de aquisição e recombinação genética tem sido descrita como consequência da diminuição do sistema CRISPR (do inglês *regularly interspaced short palindromic repeats system*) que atua como mecanismo de defesa bacteriano contra DNA exógenos, principalmente de fagos, eliminando esses segmentos do genoma bacteriano (287).

Em contrapartida, um estudo realizado por Cabott e colaboradores (2012) na Espanha mostrou uma menor diversidade clonal entre os isolados MDR e XDR, enquanto isolados sensíveis, quase sempre, eram representados por genótipos únicos. Peña e colaboradores (2015) também demonstraram que de 81 amostras de *P. aeruginosa* com perfil XDR, 73 amostras pertenciam a apenas 3 grupos clonais, designados como ST111, ST175 e ST235, que são descritos em algumas regiões do mundo (213). Esses dados mostram que a epidemiologia por *P. aeruginosa*, apesar de ser considerada policlonal, pode variar de região para região, de acordo com as medidas de contenção de sua disseminação e utilização de antimicrobianos de amplo espectro.

Em nosso estudo fomos capazes de demonstrar uma maior diversidade clonal no 3º e 4º períodos do estudo, período em que a resistência foi maior a todas as classes de antimicrobianos testadas. Da mesma forma, Cassi e colaboradores (2016) demonstraram a diminuição do clone SP em um hospital universitário no Rio de Janeiro e o surgimento de uma disseminação policlonal entre o período de 2007 a 2008, porém com a presença dos ST235 e ST244, ambos clones de alto risco encontrado em diferentes regiões do mundo (288).

Estes dados sugerem que com o surgimento da SPM nos hospitais brasileiros em 1997 e a demonstração da sua disseminação pelo território brasileiro em 2003, provavelmente as instituições de saúde aumentaram os programas de vigilância para *P. aeruginosa* produtoras de MBL, a fim de controlar sua disseminação. O monitoramento de amostras produtoras de MBL, associado ao aumento do uso de antimicrobianos de amplo espectro, podem ter levado a substituição do clone SP produtor de SPM por outras cepas resistentes aos carbapenemas. A diminuição ou estagnação da resistência em algumas instituições de saúde, como mostrado por alguns estudos pode ser explicado pela diminuição da SPM e ausência do gene *rmtD*. Apesar

disso, Cissa e colaboradores (2016) demonstraram que a diminuição dessa resistência durante o período de 2007 em diante não afetou o aumento da resistência tanto para os carbapenemas, quanto para a piperacilina + tazobactam, mostrando a capacidade de adaptação e resistência em *P. aeruginosa* a estes antimicrobianos, principalmente por processos mutacionais (288).

Dessa forma, nosso estudo enfatiza a necessidade contínua de estratégias de vigilância e medidas de controle de infecção por *P. aeruginosa* independente da produção de MBL, uma vez que outros mecanismos de resistência estão contribuindo para o fenótipo MDR ou XDR encontrado nas diferentes instituições do Rio de Janeiro.

## 6. CONCLUSÃO

- Observou-se o aumento da resistência as 3 principais opções terapêuticas, carbapenemas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, ao longo dos anos.
- Os fenótipos de resistência e multiresistência foram substituídos por fenótipos de extrema resistência nos hospitais do Rio de Janeiro nos últimos anos.
- Observamos uma boa correlação entre o PCR para detecção de carbapenemases e o teste de hidrólise Carba NP.
- A CIM frente ao imipenem foi crescente ao longo dos períodos estudados, passando de CIM<sub>50</sub>=1,5µg/mL no 1º período (1995-1999) para CIM<sub>50</sub>≥32µl/mL no 4º período de estudo (2011-2015).
- Apesar das carbapenemases serem o mecanismo de resistência epidemiológico mais importante, apenas 8 amostras foram produtoras de carbapenemases, sendo 3 produtoras de SPM detectadas entre os anos 2007, 2008 e 2010 e 5 produtoras de KPC detectadas em 2015. O principal mecanismo de resistência aos carbapenemas neste estudo foram alterações no gene codificador da porina OprD.
- Em relação aos aminoglicosídeos, apenas 5 amostras foram encontradas o gene *rmtD* em 2007 e 2010, além da associação deste gene com a carbapenemase SPM, conferindo altos níveis de resistências aos carbapenemas e aminoglicosídeos.
- O principal mecanismo de resistência as FQs foi a presença de mutações no gene *gyrA*.
- O gene *mexT* foi encontrado alterado em 26 das 27 amostras estudadas, contribuindo para o fenótipo de multiresistência, podendo ter um papel na virulência destas amostras.
- Foi observado uma alta diversidade clonal entre os isolados deste estudo. O clone SP foi encontrado no 3º e 4º período do estudo.
- Foi demonstrado uma maior diversidade clonal no 3º e 4º períodos do estudo, período em que a resistência foi maior a todas as classes de antimicrobianos testadas. Ressalto o papel das mutações no genoma de *P. aeruginosa* contribuindo para um fenótipo MDR e XDR.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Gessard, C. Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. Rev. Infect. Dis. 1984; 6 (Suppl. 3) : S775-S776.
2. Palleroni NJ. Genus I. *Pseudomonas* Migula. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1894, vol 1, pp141-99, Krieg NR and Holt JG, editors. Baltimore, Williams and Wilkins.
3. Blondell-Hill E, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. In: Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>a</sup> ed. ASM press, Washington, DC, USA; 2007. Pag 734-748.
4. Philip D. Lister, Daniel J. Wolter and Nancy D. Hanson. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009 Oct; 22(4): 582–610.
5. Driscoll JA, Brody SL, and Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs. 2007; 67: 351-68.
6. Pollack, M. *Pseudomonas aeruginosa*, In G. L. Mandell, R. Dolan, and J. E. Bennett (ed.), Principles and practices of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, NY. 1995, p. 1820-2003.
7. Morrison, A. J., and R. P. Wenzel. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 1984. 6 (Suppl.3) : S627–S642.
8. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. Int J Antimicrob Agents, 2014. N. 43, V. 4, P. 328-334.
9. Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. Clin Infect Dis. 2010; N. 51, P. 81-87.
10. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial

- Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diag. Microbial. Infect. Dis.* 2012; N. 73, V. 4, P. 354-360.
11. Andradess, Sader HS, Barth AL, Ribeiro J, Zoccoli C, Pignatari AC, Gales AC. Antimicrobial Susceptibility of Gram-negative bacilli isolated in Brazilian Hospitals participating in SENTRY program (2003-2008). *Braz. J. Infect. Dis.*, 2008; N. 12, P. 3-9.
  12. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jan; 50(1):43-8.
  13. Yehuda Carmeli, Nicolas Troillet, George M. Eliopoulos, and Matthew H. Samore. Emergence of Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Risks Associated with Different Antipseudomonal Agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jun; 43(6): 1379–1382.
  14. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, N. 8, P. 71-93, 2010.
  15. Lister P, Wolter D. Levofloxacin and imipenem combination prevents the emergence of resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2005; 40: S105-14.
  16. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999; 115:462-74.
  17. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews.* 2010;23(1):160-201.
  18. Neu, H., Gootz, T. Antimicrobial Chemotherapy. Em Baron S (Eds.), *Medical Microbiology*, 1996. 4ª ed., Cap. 11, Galveston.
  19. Suarez C, Gudiol F. Antibióticos Betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27(2):116-129.

- Greenwood D. Antimicrobial Chemotherapy. 5ed. Oxford: Oxford University Press; 200.
- 20.
21. Goodman & Gilman's. Manual of Pharmacology and Therapeutics. 2008. Nova Iorque: McGraw Hill.
22. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52.
23. Sykes RB, Bonner DP. Aztreonam: The first monobactam. *Am J of Med*. 1985;78(2):2-10.
24. BRASIL. ANVISA. Antimicrobianos - Base Teórica e Uso Clínico. 2007. [Internet]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/conceitos.htm).
25. Emmerson, A.M.; Jones, A.M. The quinolones: Decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003, 51, 13–20.
26. Ruiz-Palacios GM. Norfloxacin in the treatment of bacterial enteric infections. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1986; 48:55-63. Review.
27. Guo, X., Liu, M.L., Guo, H.Y., Wang, Y.C., Wang, J.X. Synthesis and in vitro antibacterial activity of 7-(3-amino-6,7-dihydro-2-methyl-2H-pyrazolo[4,3-c]pyridin-5(4H)-yl) fluoroquinolone derivatives. *Molecules*, 2011, 16, 2626–2635.
28. Sharma, P.C.; Jain, A.; Jain, S. Fluoroquinolone antibacterials: A review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta. Pol. Pharm*. 2009, 66, 587–604.
29. Waters V, Ratjen F. Combination antimicrobial susceptibility testing for acute exacerbations in chronic infection of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015.
30. Champoux, J.J. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem*. 2001, 70, 369–413.

31. Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules*. 2016 Mar 28;21(4).
32. Walker JM, Wise R. The pharmacokinetics of amikacin and gentamicin in volunteers: a comparison of individual differences. *J Antimicrob Chemother*. 1979; 5:95-99
33. Gordon RC, Regamey C, Kirby WMM. Serum protein binding of the aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 2:214-216
34. Davis BD. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbial Rev* 1987; 51:341-350
35. Randall S. Edson, M.D., and Christine L. Terrell, M.D. The Aminoglycosides. *Mayo Clin Proc* 1999;74:519-528.
36. Gilbert DN. Aminoglycosides. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone;1995. p.279-30.
37. Reinhard MK, Hottendorf GH, Powell ED. Differences in the sensitivity of Fischer and Sprague-Dawley rats to aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicol Pathol*. 1991;19(1):66-71.
38. Davis BD. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbial Rev* 1987; 51 : 341-350
39. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem*. 1977; 46 :723-63.
40. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*. 2006;10:R27
41. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother*. 1999;33:960-7.
42. Dzidic S SJ, Kos B. . Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol Biotechnol*. 2008;46(1):11-21.

43. Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health*. 2014 Sep 16;2:145. doi: 10.3389/fpubh.2014.00145. eCollection 2014.
44. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Feb 13; 8(2):129-36.
45. CDC. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013. US Department of Health. 2013.
46. Capita, R., Alonso-Calleja, C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2013. 53, 11–48.
47. Strateva T, Yordanov D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 58 (Pt 9):1133-48.
48. Tavares W. Resistência bacteriana. Em: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3ed. São Paulo: Atheneu; 2001.
49. Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, Oliver A. Pan- $\beta$ -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012. 56(9):4771-8.
50. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*. 2006. 14:413-420.
51. Ambler RP. The Structure of  $\beta$ -Lactamases. *Biological Sciences*. 1980;289(1036)321-331.
52. Bush K, Fisher JF. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New  $\beta$ -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2011; 65: 455-78.
53. Zhao WH, Hu ZQ. 2010. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol*. 36(3):245-58.

54. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Jul;50(1):11-8.
- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan; 22(1):161-82, Table of Contents.
- 55.
56. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. 46(1):1-11.
57. Philip D. Lister, Daniel J. Wolter, and Nancy D. Hanson. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct; 22(4): 582–610.
58. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002. 8(6):321-31.
59. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2014; 20 (9): 821-30.
60. Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolas MF, Vasconcelos AT, Oliveira V, Gales AC. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2015;59(9):5159-64.
61. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, Bush K. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Nov; 44(11):3035-9.
62. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug; 9(8):999-1002.

63. Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, Ricover N, Ayala JA. First class A carbapenemase isolated from Enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Mar; 48(3):1068-9.
- Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA.
64. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Sep; 40(9):2080-6.
65. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul; 20(3):440-58, table of contents.
66. Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. 2009b. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(9):3908-13.
67. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. 2001. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* Sep;45(9):2598-603.
68. Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouveleki LS. 2010. GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):1331-3.
69. Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffmann KM. 2013. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(1):396-401.
70. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2001;45(4):1151-61 (Erratum, 52:809, 2008.).
71. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2005;56(1):128-32.

72. Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Nov; 49(11):4760-2.
73. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents.* 2010;36 Suppl 3:S8-14.
74. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1553-5.
75. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:557-62.
76. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:470-82.
77. Shen P, Wei Z, Jiang Y, Du X, Ji S, Yu Y, et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2009;53(10):4333-8.
78. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2009;53(1):333-4.
79. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2009;63(2):265-8.
80. Paula Regina Luna de Araújo Jácome, Lílian Rodrigues Alves, Adriane Borges Cabral, Ana Catarina S. Lopes, and Maria Amélia Vieira Maciel First Report of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep; 56(9): 4990.

81. Anna C. S. Almeida, Marinalda A. Vilela, Felipe L. S. Cavalcanti, Willames M. B. Martins, Marcos A. Morais, Jr, Marcia M. C. Morais. First Description of KPC-2-Producing *Pseudomonas putida* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Apr; 56(4): 2205–2206.
82. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis.* 2011 May; 11(5):381-93.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 Jul; 33(4):757-84.
83. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991 Jan; 35(1):147-51.
84. Laraki N1, Galleni M, Thamm I, Riccio ML, micosante G, Frère JM, Rossolini GM. Structure of In31, a blaIMP-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phylogenically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):890-901.
85. Patrice Nordmann, Thierry Naas, and Laurent Poirel. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct; 17(10): 1791–1798.
86. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. 2004. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*<sub>IMP-16</sub>, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(12):4693-702.
87. Xavier DE, Gales AC, Mendes RE, Pignatari ACC, Filho LS, Cirilo LF, Castanheira M. 2006. IMP-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): increasing diversity of mobile metallo-beta-lactamase (MBL) in Brazil. In: Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46. San Francisco. *Anais Washington: American Society for Microbiology.* p.110.
- 88.

89. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul; 43(7):1584-90.
90. Duck Jin Hong, Il Kwon Bae, In-Ho Jang, Seok Hoon Jeong, Hyun-Kyung Kang, and Kyungwon Lee. Epidemiology and Characteristics of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.* 2015 Jun; 47(2): 81–97.
91. Patrice Nordmann LD, Laurent Poirel. Infections Due to NDM-1 producers. *Emerging Infectious Diseases: Clinical Case Studies.* 2014;Chapter: 21, (Publisher: Elsevier, Editors: Ergonul O.):275-95
92. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-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.* 2009 Dec; 53(12):5046-54.
93. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, Milan Kojic. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2011;55(8):3929-31.
94. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2003. 52(4):699-702.
95. Hopkins KL, Meunier D, Findlay J, Mustafa N, Parsons H, Pike R, Wright L, Woodford N. SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol.* 2016 Jul;65(7):696-7.
96. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):582

97. Fonseca EL, Marin MA, Encinas F, Vicente AC. Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>SPM-1</sub> and bicyclomycin *bcrI* resistance genes found in the pandemic *Pseudomonas aeruginosa* clone SP/ST277. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Sep;70(9):2547-50.
98. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. 54(1):24-38.
99. Delphine Girlich, Thierry Naas, and Patrice Nordmann. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun; 48(6): 2043–2048.
100. Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa isolates*, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol (Paris).* 2009. 57 (6): 493-5.
101. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011. 55(10):4828-33.
102. Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antochewis LC, Barth AL, Zavascki AP. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. 58(6):3566-7.
103. Pereira PS, Borghi M, de Araújo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015
104. Hancock RE, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol.* 2002. 56:17-38.
105. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008. 6(12):893-903.

106. Fung-Tomc JC, Huczko E, Banville J, Ménard M, Kolek B, Gradelski E, Kessler RE, Bonner DP. Structure-activity relationships of carbapenems that determine their dependence on porin protein D2 for activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995. 39(2):394-9.
107. Huang H, Hancock RE. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1996. (178):3085-3090.
108. Livermore DM. 1992. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 36(9): 2046-2048.
109. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. 2012. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 302(2):63-8.
110. Chevalier S, Bodilis J, Jaouen T, Barray S, Feuilloley MG, Orange N. 2007. Sequence diversity of the OprD protein of environmental *Pseudomonas* strains. *Environ Microbiol*. 9(3):824-35.
111. Naenna P, Noisumdaeng P, Pongpech P, Tribuddharat C. Detection of outer membrane porin protein, an imipenem influx channel, in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2010. 41(3):614-24.
112. Köhler T, Michea-Hamzhepour M, Epp SF, Pechere JC. 1999. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother*. 43(2):424-7.
113. Lister P, Wolter D, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009. 22(4): 582-610.
114. Poole, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10: 12–26

115. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006. 19(2):382-402.
116. Livermore DM. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 234:634-640.
117. Poole K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3(2):255-64.
118. Kohler, T, Michea-Hamzhepour, M, Plesiat, P, Kahr, AL, and Pechere, JC. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 2540–2543
119. Cao L, Srikumar R, Poole K. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720–PA3719. *Mol Microbiol.* 2004. 53, 1423–1436.
- Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, Neshat S, Yamagishi J, Li XZ, Nishino T. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 1996. 21(4):713-24.
- 120.
121. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(12):3322-3327.
122. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plésiat P. MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Apr; 47(4):1371-5.
123. Maseda H, Uwate M, Nakae T. Transcriptional regulation of the mexEF-oprN multidrug efflux pump operon by MexT and na unidentified repressor in nfxC-type mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010 .

124. Sobel ML, Hocquet D, Cao L, Plesiat P, Poole K. Mutations in PA3574 (nalD) lead to increased MexAB-OprM expression Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005. 49, 1782–1786.
125. Maria Bălăsoiu, A.T. Bălăsoiu, Rodica Mănescu, Carmen Avramescu, and Oana Ionete. *Pseudomonas Aeruginosa* Resistance Phenotypes and Phenotypic Highlighting Methods. *Curr Health Sci J.* 2014 Apr-Jun; 40(2): 85–92. Published online 2014 Mar 29.
126. Westbrook-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warren P, Nguyen LY, Shawar RM, Folger KR, Stover CK. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Dec; 43(12):2975-83.
127. Rodríguez Esparragón F, González Martín M, González Lama Z, Sabatelli FJ, Tejedor Junco MT. Aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the Canary Islands. *Zentralbl Bakteriol.* 2000 Jan; 289(8):817-26.
128. Bryan LE, Haraphongse R, Van den Elzen HM. Gentamicin resistance in clinical-isolates of *Pseudomonas aeruginosa* associated with diminished gentamicin accumulation and no detectable enzymatic modification. *J Antibiot (Tokyo).* 1976 Jul; 29(7):743-53.
129. Vogne C, Aires JR, Bailly C, Hocquet D, Plésiat P. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 May; 48(5):1676-80.
130. Macfarlane EL, Kwasnicka A, Hancock RE. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology.* 2000 Oct; 146 ( Pt 10):2543-54.
131. Smith CA, Baker EN. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2002 Jun; 2(2):143-60.

132. Riccio ML, Docquier JD, Dell'Amico E, Luzzaro F, Amicosante G, Rossolini GM. Novel 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 May; 47(5):1746-8.
133. Yagisawa M, Kondo S, Takeuchi T, Umezawa H. Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of *Pseudomonas aeruginosa*: structural requirements of substrate. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975 Jun; 28(6):486-9.
134. Torres C, Perlin MH, Baquero F, Lerner DL, Lerner SA. High-level amikacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* associated with a 3'-phosphotransferase with high affinity for amikacin. *Int J Antimicrob Agents*. 2000 Aug; 15(4):257-63.
135. Keith Poole. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Feb; 49(2): 479–487.
136. Sabtcheva S, Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P, Lambert T. Aminoglycoside resistance gene *ant(4')-IIb* of *Pseudomonas aeruginosa* BM4492, a clinical isolate from Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 May; 47(5):1584-8.
137. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003;362 (9399):1888-93.
138. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45(1):88-94.
- Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, and Arakawa Y. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(2):491-6.
140. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon *Tn1548*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(7):2949-53.

141. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(3):852-6.
142. Le Thomas I, Couetdic G, Clermont O, Brahim N, Plesiat P, Bingen E. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2001. 48:553-5.
143. Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, Zhang Y, Xu H, Chen X, Zhang F. Specific patterns of gyrA mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC infectious diseases*. 2013;13:8.
144. Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003. 21(5):409-13.
145. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998;351(9105):797-9.
146. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology spectrum*. 2014;2(5).
147. Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. 51:2464-9.
148. Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. 48: 3332-7.
149. Luzzaro F. Fluoroquinolones and Gram-negative bacteria: antimicrobial activity and mechanisms of resistance. *Infez Med*. 2008. 16 Suppl2:5-11.
150. Coban AY, Tanrıverdi Çaycı Y, Yıldırım T, Erturan Z, Durupınar B, Bozdoğan B. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Mikrobiyol Bul*. 2011. 45(4):602-8.

151. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:643.
152. Gunn JS, Ryan SS, Van Velkinburgh JC, Ernst RK, Miller SI. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun*. 2000 Nov; 68(11):6139-46.
153. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):161-8.
154. Poirel, L., Kieffer, N., Liassine, N., Than, D., and Nordmann, P. Plasmid-encoded carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis*. 2016.
155. Nordmann, P., Lienhard, R., Kieffer, N., Clerc, O., and Poirel, L. Plasmid mediated colistin resistance in *Escherichia coli* in bacteremia in Switzerland. *Clin Infect Dis*. 2016.
156. Miriam R. Fernandes, John A. McCulloch, Marco A. Vianello, Quézia Moura, Paula J. Pérez-Chaparro, Fernanda Esposito, Luciana Sartori, Milena Dropa, Maria H. Matté, Débora P. A. Lira, Elsa M. Mamizuka, and Nilton Lincopan. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the mcr-1 Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a Human Infection in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016 Sep 23;60(10):6415-7.
157. Du, H., Chen, L., Tan, T.W., and Kreiswirth, B.N. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Lancet Infect Dis*. 2016.
158. Georgios Meletis and Maria Bagkeri. *Pseudomonas aeruginosa: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options*. Infection Control, book edited by Silpi Basak , ISBN 978-953-51-1145-0, Published: May 29, 2013 under CC BY 3.0 license.

159. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infection control and hospital epidemiology*. 1997;18(6):426-39.
160. Wei G, Pan L, Du H, Chen J, Zhao L. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. *Microbiol Methods*. 2004 Oct;59(1):91-108.
161. Hiatt KL, Seal BS. Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. *Methods Mol Biol*. 2009;551:49-58.
162. Williams JG, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990 Nov 25;18(22):6531-5.
163. P Vos, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, T van de Lee, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Peleman, and M Kuiper. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1995 Nov 11; 23(21): 4407–4414.
164. Poh CL, Yap SC, Yeo M. Pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of hospital infection*. 1993;24(2):123-8.
165. Hansen DS, Skov R, Benedi JV, Sperling V, Kolmos HJ. *Klebsiella* typing: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002;8(7):397-404.
166. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec; 42(12):5644-9.

167. Römling U, Wingender J, Müller H, Tümmler B. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol.* 1994 Jun; 60(6):1734-8.
168. Foght JM, Westlake DW, Johnson WM, Ridgway HF. Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. *Microbiology.* 1996 Sep; 142 ( Pt 9):2333-40.
169. Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science.* 1995 Jun 30; 268(5219):1899-902.
170. Kiewitz C, Tümmler B. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.* 2000 Jun; 182(11):3125-35.
171. Ruimy R, Genauzeau E, Barnabe C, Beaulieu A, Tibayrenc M, Andreumont A. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect Immun.* 2001. 69(1):584-8.
172. Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Vanderkelen A, Zizi M, Ghysels B, Cornelis P. *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol.* 2002 Dec;4(12):898-911.
173. Shen K, Sayeed S, Antalis P, Gladitz J, Ahmed A, Dice B, Janto B, Dopico R, Keefe R, Hayes J, Johnson S, Yu S, Ehrlich N, Jocz J, Kropp L, Wong R, Wadowsky RM, Slifkin M, Preston RA, Erdos G, Post JC, Ehrlich GD, Hu FZ. Extensive genomic plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* revealed by identification and distribution studies of novel genes among clinical isolates. *Infect Immun.* 2006 Sep; 74(9):5272-83.

174. C. K. Stover, X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F.S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory & M. V. Olson: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000. 406, 959-964.
175. Poole, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* 2011. 2,65.
176. Martínez, J.L., Baquero, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. 15 (4), 647–679.
177. Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., Mathee, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 2013. 41, 1–20.
178. Moyà, B., Beceiro, A., Cabot, G., Juan, C., Zamorano, L., Alberti, S., Oliver, A. Pan-lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. 56, 4771–4778.
179. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2012;18(3):268-81.
180. Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011. 35, 736–755.

181. Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Domínguez, M.A., Gago, J.F., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. 56, 6349–6357.
182. Mulet, X., Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Domínguez, M.A., Zamorano, L., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. 57, 5527–5535.
183. Dettman, J.R., Rodrigue, N., Aaron, S.D., Kassen, R., 2013. Evolutionary genomics of epidemic and non-epidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 21065–21070.
184. Jeukens, J., Boyle, B., Kukavica-Ibrulj, I., Ouellet, M.M., Aaron, S.D., Charette, S.J., Fothergill, J.L., Tucker, N.P., Winstanley, C., Levesque, R.C. Comparative genomics of isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain associated with chronic lung infections of cystic fibrosis patients. *PLoS ONE.* 2014. 9, e87611.
185. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015 Jul-Aug;21-22:41-59.
186. Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., Plésiat, P., Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. 58, 221–228.
187. Chen, Y., Sun, M., Wang, M., Lu, Y., Yan, Z. Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014. 33, 1181–1187.

188. Mano, Y., Saga, T., Ishii, Y., Yoshizumi, A., Bonomo, R.A., Yamaguchi, K., Tateda, K. Molecular analysis of the integrons of metallo-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan. BMC Microbiol. 2015. 21 (15), 41.
189. Scott, F.W., Pitt, T.L. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. J. Med. Microbiol. 2004. 53, 609–615.
190. Aaron, S.D., Vandemheen, K.L., Ramotar, K., Giesbrecht-Lewis, T., Tullis, E., Freitag, A., Paterson, N., Jackson, M., Lougheed, M.D., Dowson, C., Kumar, V., Ferris, W., Chan, F., Doucette, S., Fergusson, D. Infection with transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in adults with cystic fibrosis. JAMA. 2010. 304, 2145–2153.
191. McCallum, S.J., Corkill, J., Gallagher, M., Ledson, M.J., Hart, C.A., Walshaw, M.J. Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonised by *P. aeruginosa*. Lancet. 2001. 358, 558–560.
192. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan;54(1):582.
193. Jolley K. *Pseudomonas aeruginosa* MLST website. University of Oxford.
194. DORTET L, POIREL L, NORDMANN P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. Antimicrob Agents Chemother. 2012. n.56, v. 12, p. 6437-6440.
195. MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012. v. 67, p. 906–909.
196. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 2003 Oct;52(4):699-702. Epub 2003 Sep 1.

197. Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M.F., Babini, G.S., Douboyas, J., Livermore, D.M. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol.* 2000. 38(3):1290-2.
198. Shibata, N.; Doi, Y.; Yamane, K.; Yagi, T.; Kurokawa, H.; Shibayama, K.; Kato, H.; Kai, K.; Arakawa, Y. PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by Gram negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* 2003. 41(12): 5407–13.
199. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2008;52(5):1843-5.
200. Castanheira M, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated *spm-1*-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2008;52(4):1587-8; author reply 8.
201. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2007. 60:394-397.
202. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009. 53:1892-1897.
203. Bej, A. K., J. L. DiCesare, L. Haff, and R. M. Atlas. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. 57:1013-1017.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, *et al.* Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne pathogens and disease.* 2006. 3(1):59-67.
- 204.

205. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*. 2015 Jun;47(2):81-97.
206. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Apr;43(4):328-34.
207. Josef Yayan, Beniam Ghebremedhin, and Kurt Rasche. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. *PLoS One*. 2015. 10(10): e0139836.
208. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro AL, Martino MD, Vega S, Zurita J, Cepparulo M, Castanheira M. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Braz J Infect Dis*. 2013 Nov-Dec;17(6):672-81
209. Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CA, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranchesi R, Barata CU, Edmond MB; Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol*. 2011 May;49(5):1866-71.
210. OPAS/OMS e ANVISA. Termo de cooperação 37 (TC 37) entre a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Relatório Anual 2008. Brasília, julho 2009.
211. Xu J, Duan X, Wu H, Zhou Q. Surveillance and correlation of antimicrobial usage and resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: a hospital population-based study. *PLoS One*. 2013 Nov 8;8(11).

212. Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):882-9.
213. Peña, C., Cabot, G., Gómez-Zorrilla, S., Zamorano, L., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Rodríguez-López, F., Tubau, F., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin. Infect. Dis.* 2015. 60, 539–548.
214. Sader, H.S., Farrell, D.J., Flamm, R.K., Jones, R.N. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009–2012. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2014. 43, 328–334.
215. Zhanel, G.G., DeCorby, M., Adam, H., Mulvey, M.R., McCracken, M., Lagacé-Wiens, P., Nichol, K.A., Wierzbowski, A., Baudry, P.J., Taylor, F., Karlowsky, J.A., Walkty, A., Schweizer, F., Johnson, J., Hoban, D.J., Canadian Antimicrobial Resistance Alliance. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. 54, 4684–4693.
216. Zilberberg, M.D., Shorr, A.F. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among specimens from hospitalized patients with pneumonia and bloodstream infections in the United States from 2000 to 2009. *J. Hosp. Med.* 2013. 8, 559–563.
217. Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão, Yaisa Naziozeno de Faria, Luciana Roberto Pereira, Marise Dutra Asensi. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100(5): 541-548, August 2005*

218. Loureiro MM, de Moraes BA, Mendonca VL, Quadra MR, Pinheiro GS, Asensi MD. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Apr;97(3):387-94.
219. V.M. Kokisa, B.M. Moreira, F.L.P.C. Pellegrino, M.G. Silva, J.B. Longb, C.C.R. Bastos, K.R.N. Santos, Identification of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone among patients in a hospital in Rio de Janeiro. J Hosp Infect. 2005 May;60(1):19-26.
220. Pellegrino F.L.P.C., Teixeira L.M., Carvalho M.G.S., *et al.* Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotype in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol 2002;40:2420-24.
221. Cacci LC, Chuster SG, Martins N, Carmo PR, Girão VB, Nouér SA, Freitas WV, Matos JA, Magalhães AC, Ferreira AL, Picão RC, Moreira BM. Mechanisms of carbapenem resistance in endemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates after an SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase producing strain subsided in an intensive care unit of a teaching hospital in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016 Sep;111(9):551-8.
222. D'Angelo RG, Johnson JK, Bork JT, Heil EL. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. Expert Opin Pharmacother. 2016;17(7):953-67.
223. A. Lucena a, L.M. Dalla Costa b,c, K.S. Nogueira b, A.P. Matos d, A.C. Gales d,e, M.C. Paganini f, M.E.S. Castro f, S.M. Raboni a. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. J Hosp Infect. 2014 Aug;87(4):234-40
224. Koutsogiannou M, Drougka E, Liakopoulos A, Jelastopulu E, Petinaki E, Anastassiou ED, Spiliopoulou I, Christofidou M .J. Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. Clin Microbiol. 2013 Feb;51(2):665-8.
225. Pellegrino FLPC, Casali N, Netto-dos-Santos KR, Nouér SA, Scheidegger EMD, Riley LW, Moreira BM. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying blaSPM metallo- $\beta$ -lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. J Chemother. 2006. 18:151–156.

226. Keila de Cassia Ferreira de Almeida Silva, Mariana Alcantara Calomino, Gabriela Deutsch, Selma Rodrigues de Castilho, Geraldo Renato de Paula, Luciana Maria Ramires Esper, Lenise Arneiro Teixeira. Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1192-202.
227. Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA, Teixeira LM, Marques Ede A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. Microb Drug Resist. 2006. 12(2):103-8.
228. Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2009. 53(9):3908-13.
229. Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. Clinics (Sao Paulo). 2010;65(9):825-9.
230. Hu YY, Gu DX, Cai JC, Zhou HW, Zhang R. Emergence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 463 isolates in Hangzhou, China. Antimicrob Agents Chemother. 2015 May;59(5):2914-7. doi: 10.1128/AAC.04903-14. Epub 2015 Feb 17.
231. Lari AR, Azimi L, Rahbar M, Alaghebandan R, Sattarzadeh-Tabrizi M. First report of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Iran: phenotypic and genotypic methods. GMS Hyg Infect Control. 2014 Mar 7;9(1).
232. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Feb;53(2):557-62. doi: 10.1128/AAC.00734-08. Epub 2008 Nov 17.
233. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, Montealegre MC, Quinn JP, Villegas MV. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. J Clin Microbiol. 2009 Aug;47(8):2670-1.

234. García Ramírez D, Nicola F, Zarate S, Relloso S, Smayevsky J, Arduino S. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital: an 8-year study. *J Med Microbiol*. 2013 Oct;62(Pt 10):1565-70.
235. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, del Corral H, Roncancio G, Sierra P, Echeverri-Toro L, Ospina S, Maldonado N, Robledo C, Restrepo A, Jiménez JN. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2014 Nov;52(11):3978-86
236. Rizek C, Fu L, Dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014 Sep 2;13:43.
237. CAVALCANTI, Felipe Lira de Sá et al. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 2015, vol.110, n.8, pp.1003-1009.
238. Santella G, Cittadini R, Papalia M, Vera Ocampo C, Del Castillo M, Vay C, Gutkind G, Radice M. First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina. *Infect Genet Evol*. 2012;12(8):2003–2005.
239. Sánchez-Martínez G, Garza-Ramos UJ, Reyna-Flores FL, Gaytán-Martínez J, Lorenzo-Bautista IG, Silva-Sanchez J. In169, a new class 1 integron that encoded bla (IMP-18) in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Mexico. *Arch Med Res*. 2010. 41:235-9.
240. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec; 56(12):6349-57.

241. Paez J, Levin AS, Fu L, Basso M, Fonseca GH, Dulley FL, Rossi F, Guimarães T, Costa SF: Clusters of infection due to metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in stem cell transplant and haematology units. *J Hosp Infect* 2011, 77(1):76–77.
242. BERNABEU S, POIREL L, NORDMANN P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. n. 74, p.88-90,
243. LEE W, CHUNG HS, LEE Y, YONG D, JEONG SH, LEE K, CHONG Y. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, n.77, p. 227-230.
244. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol*, 2011. n. 70, p. 119-123.
245. Heinrichs A, Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015. 34(7):1467-74.
246. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* 2012. n. 18, p. 1503-1507.
247. Osterblad M., Antti J. Hakanen, J. J. Evaluation of the Carba NP Teste for Carbapenemase Detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014. v. 58, n. 12, p. 7553-7556.
248. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012. n.56, v. 12, p. 6437-6440.
249. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* 2001. 47(3):247–50.

250. Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis. 1998 Aug;27.
251. Cheng-Yen Kao, Shu-Sheng Chen, Kuei-Hsiang Hung, Hsiu-Mei Wu, Po-Ren Hsueh, Jing-Jou Yan, and Jiunn-Jong Wu. Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. BMC Microbiol. 2016; 16: 107.
252. Kim CH, Kang HY, Kim BR, Jeon H, Lee YC, Lee SH, Lee JC. Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals. J Microbiol. 2016.54(1):44-9.
253. Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- $\beta$ -lactamases in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents. 2012. 40: 168-172.
254. Ochs MM, Bains M, Hancock RE. Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2000. 44:1983–5.
255. Guzvynec M, Izdebski R, Butic I, Jelic M, Abram M, Koscak I, et al. Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. Antimicrob Agents Chemother. 2014. 58:6277–83.
256. Fowler RC, Hanson ND. Emergence of carbapenem resistance due to the novel insertion sequence ISPa8 in *Pseudomonas aeruginosa*. PLOS ONE. 2014. ;9:e91299.
257. Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. FEMS Microbiol Lett. 2004. 236:137–43.
258. Wang J, Zhou JY, Qu TT, Shen P, Wei ZQ, Yu YS, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. Int J Antimicrob Agents. 2010. 35:486–91.

259. Wolter DJ, Acquazzino D, Goering RV, Sammut P, Khalaf N, Hanson ND. Emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a patient with cystic fibrosis in the absence of carbapenem therapy. *Clin Infect Dis*. 2008. 46:e137–41
260. Diene SM, L’Homme T, Bellulo S, Stremmer N, Dubus JC, Mely L, et al. ISPa46, a novel insertion sequence in the *oprD* porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *Int J Antimicrob Agents*. 2013. 42:268–71.
261. Al-Bayssari C, Valentini C, Gomez C, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. First detection of insertion sequence element ISPa1328 in the *oprD* porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from an idiopathic pulmonary fibrosis patient in Marseille, France. *New Microbes New Infect*. 2015. 7:26–7.
262. El Amin N, Giske CG, Jalal S, Keijsers B, Kronvall G, Wretling B. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS*. 2005. 113(3):187-96.
263. Felipe Lira de Sá Cavalcanti, Cristina Rodríguez Mirones, Elena Román Paucar, Laura Álvarez Montes, Tereza Cristina Leal-Balbino, Marcia Maria Camargo de Morais, Luis Martínez-Martínez, Alain Antonio Ocampo-Sosa. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2015, Vol. 110(8): 1003-1009.
264. Maseda, H., Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N. Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004, 48:1320–1328.
265. Jin Y, Yang H, Qiao M, Jin S. MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2011. 193(2):399-410

266. Vaziri F, Peerayeh SN, Nejad QB, Farhadian A. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (*aac* (6')-I, *aac* (6')-II, *ant* (2'')-I, *aph* (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011. 66:1519-22.
267. Mendes RE, Castanheira M, Toleman MA, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Characterization of an integron carrying *bla*<sub>IMP-1</sub> and a new aminoglycoside resistance gene, *aac*(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2611-4.
268. Kim JY, Park YJ, Kwon HJ, Han K, Kang MW, Woo GJ. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Sep;62(3):479-83.
269. Vakulenko S, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev*. 2003. 3:430-50.
270. Gad G, Mohamed H, Ashour H. Aminoglycoside resistance rates, phenotypes, and mechanisms of Gram-negative bacteria from infected patients in upper Egypt. *PLoS ONE*. 2011. 6:e17224.
271. Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. 51(9):3388-90.
272. Livia C. Fontes, Patricia R. Neves, Silvane Oliveira, Ketrin C. Silva, Elayse M. Hachich, Maria I. Z. Sato, and Nilton Lincopan. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* Coproducing Metallo-β-Lactamase SPM-1 and 16S rRNA Methylase RmtD1 in an Urban River. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun; 55(6): 3063–3064.
273. Silveira MC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. *Infect Genet Evol*. 2016 Aug;42:60-5.

274. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003 Dec 6;362(9399):1888-93.
275. Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. 48(6):2069-74.
276. M. Nakano, T. Deguchi, T. Kawamura, M. Yasuda, M. Kimura, Y. Okano. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41 (1997), pp. 2289–2291.
277. Nouri R, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Aghazadeh M, Asgharzadeh M. The role of *gyrA* and *parC* mutations in fluoroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Braz J Microbiol*. 2016 Jul 26. pii: S1517-8382(16)30607-4.
278. Cayci YT, Coban AY, Gunaydin M. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Indian J Med Microbiol*. 2014 Jul-Sep;32(3):285-9.
279. Aires CA, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. MgrB mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 12.
280. Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol*. 2014. 5, 643.
281. Levasseur P, Girard AM, Claudon M, et al. In vitro antibacterial activity of the ceftazidime-avibactam (NXL104) combination against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012. 56(3):1606–1608.
282. Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Lagacé-Wiens PR, Denisuk A, Rubinstein E, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP 3rd, Karlowksy JA. Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ $\beta$ -lactamase inhibitor combination. *Drugs*. 2013. 73(2):159-77.

283. Silva FM, Carmo MS, Silbert S, Gales AC. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. *Microb Drug Resist.* 2011 Jun;17(2):215-20.
284. Silveira M, Albano R, Asensi M, Assef AP. The draft genome sequence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain CCBH4851, a nosocomial isolate belonging to clone SP (ST277) that is prevalent in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014. 109(8):1086-7.
285. Cavalcanti FL, Almeida AC, Vilela MA, Morais MM, Morais Junior MA. Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 May;107(3):420-3.
286. Kiewitz C, Tümmler B. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(11):3125-35.
287. Kos, V.N., Déraspe, M., McLaughlin, R.E., Whiteaker, J.D., Roy, P.H., Alm, R.A., Corbeil, J., Gardner, H., 2015. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59. 427–436.
288. Cacci LC, Chuster SG, Martins N, Carmo PR, Girão VB, Nouér SA, Freitas WV, Matos JA, Magalhães AC, Ferreira AL, Picão RC, Moreira BM. Mechanisms of carbapenem resistance in endemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates after an SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase producing strain subsided in an intensive care unit of a teaching hospital in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016 Sep;111(9):551-8.