



LORENA CRISTINA CORRÊA FEHLBERG

**Estudo comparativo dos mecanismos de resistência  
aos  $\beta$ -lactâmicos em amostras clínicas de  
*Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecção de  
corrente sanguínea no Brasil e nos Estados Unidos  
da América**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Medicina da  
Universidade Federal de São  
Paulo/Escola Paulista de Medicina  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências.

**São Paulo**

**2010**

---

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

---

LORENA CRISTINA CORRÊA FEHLBERG

**Estudo comparativo dos mecanismos de resistência  
aos  $\beta$ -lactâmicos em amostras clínicas de  
*Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecção de  
corrente sanguínea no Brasil e nos Estados Unidos da  
América**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Medicina da  
Universidade Federal de São  
Paulo/Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências pelo Programa de Pós-  
graduação em Ciências Básicas do  
Departamento de Doenças Infecciosas e  
Parasitárias.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cristina  
Gales.

**São Paulo  
2010**

---

Fehlberg, Lorena Cristina Corrêa

**Estudo comparativo dos mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecção de corrente sanguínea no Brasil e nos Estados Unidos da América.**/Lorena Cristina Corrêa Fehlberg – São Paulo, 2010.

XV. 128 fls.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Infectologia. Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**Título em inglês:** Comparative study of  $\beta$ -lactam mechanisms of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream clinical isolates collected from Brazil and United States of America.

1.  $\beta$ -lactamases. 2. Sistemas de efluxo. 3. Resistência Bacteriana. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. Infecção de Corrente Sanguínea.

---

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina**  
**Disciplina de Infectologia**

Chefe do Departamento

**Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola**

Chefe do Curso de Pós-graduação

**Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz**

Chefe da Disciplina

**Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Servolo de Medeiros**

---

LORENA CRISTINA CORRÊA FEHLBERG

**Estudo comparativo dos mecanismos de resistência  
aos  $\beta$ -lactâmicos em amostras clínicas de  
*Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecção de  
corrente sanguínea no Brasil e nos Estados Unidos  
da América**

Presidente da banca

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Gales**

Banca examinadora

Titular: **Dr. Carlos Alberto Pires Pereira**

Titular: **Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio**

Titular: **Dr. Nilton Ebert Lincopan Huenuman**

Suplente: **Dr<sup>a</sup> Paola Cappellano**

---

*Dedico este trabalho a José Geraldo da Silva, pessoa que muito estimo e  
admiro, me conduziu aos primeiros passos pelo mundo da  
Microbiologia.  
Seus ensinamentos profissionais e pessoais são uma constante em  
minha vida.  
Obrigada pela dedicação, paciência e grande amizade!*

---

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e professora Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Gales, pela amizade, dedicação e ensinamentos profissionais e pessoais dispensados para comigo. Obrigada pela oportunidade de fazer parte do grupo LEMC/Alerta. Saiba da minha grande admiração, meu respeito e carinho por você.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari, pela dedicação ao grupo LEMC/Alerta.

A minha mãe Sílvia Helena Corrêa, pela vida e por tudo em minha vida, sem distinção!

Ao meu pai Waldevino Fehlberg, que mesmo distante, sempre esteve por perto, sorrindo com as minhas vitórias.

Ao meu amado Rafael Gomes Ferreira pelo companheirismo, amizade e amor dedicados a mim. Sua paciência e seu sorriso são fundamentais em minha vida. Obrigada por acreditar na minha vitória!

Aos meus sogros, Maria da Silva e Raul Ferreira, pela acolhida, atenção e carinho dispensado para comigo.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório Alerta, Adriana Nicoletti, Cecília Carvalhaes, Danilo Xavier, Eloiza Campana, Jéssica Werneck, Paula Ignez, Paula Peraro, Raquel Girardello, Renata Picão, Rodrigo Cayô e Vitor Marguti pela amizade e imenso auxílio na conclusão deste trabalho.

Aos amigos do LEMC, em especial, Jussimara Monteiro, Karen Bauab, Katia Kiyota e Paulo Martins.



---

Aos meus amigos e ex-colegas de trabalho Gabriela Diniz, Luciana Ferreira, Maurício Foz, Mohamad Diniz, Rodolfo Tavares, Teresinha Santos e Vanessa Carmona. A amizade de todos vocês é muito especial para mim.

Às minhas eternas amigas Mariene Scardua, Sheyla Paranhos e Thereza Venturini por todos os momentos que passamos juntas. Apesar da distância física, vocês estão sempre presentes em meu coração.

À secretária Rosana Capecce pela amizade e auxílio em diversos procedimentos burocráticos.

Ao ex-secretário da Pós-Graduação Charlys Costa pela dedicação e apoio em todos os momentos necessários.

Ao Dr. Alexandre Rodrigues Marra por, gentilmente, ter cedido as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* do Medical College of Virginia para esse estudo.

Ao Laboratório de Gastropediatria da UNIFESP, em nome da professora Dr<sup>a</sup> Isabel Cristina Affonso Scaletsky e sua equipe, por ter gentilmente cedido o termociclador em tempo real para a realização desse estudo.

Aos docentes e funcionários da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIPA/UNIFESP/EPM). O meu sucesso profissional é a soma da contribuição de cada um de vocês.

---

Esse trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 06/55937-3.

---

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos	5
1.1.1 Objetivo principal	6
1.1.2 Objetivos específicos	6
<b>2. Revisão da Literatura</b>	<b>7</b>
2.1 $\beta$ -lactamases	8
2.1.1 $\beta$ -lactamases em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.1.2 Cefalosporinas cromossomais ou AmpC	11
2.1.3 $\beta$ -lactamases de espectro limitado	12
2.1.4 $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL)	13
2.1.4.1 TEM	13
2.1.4.2 SHV	14
2.1.4.3 PER	15
2.1.4.4 VEB	16
2.1.4.5 GES	16
2.1.4.6 BEL	17
2.1.4.7 CTX-M	18
2.1.5 Oxacilinas	19
2.1.5.1 Oxacilinas de espectro limitado e ESBL do tipo OXA	19
2.1.5.2 Carbapenemases do tipo OXA	21
2.1.6 Serino-carbapenemases	21
2.1.7 Metallo- $\beta$ -lactamases	24
2.2 Sistemas de efluxo	28
2.2.1 Sistemas de efluxo em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.2.1.1 Sistema ABM	32
2.2.1.2 Sistema CDJ	32
2.2.1.3 Sistema EFN	33
2.2.1.4 Sistema XY	34
2.3 Proteína de membrana externa	36
2.4 Proteínas ligadoras de penicilinas	38
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>40</b>

---

3.1 Amostras bacterianas _____	41
3.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos _____	41
3.3 Caracterização dos mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos _____	43
3.3.1 Teste de hidrólise enzimática _____	43
3.3.2 Detecção dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos _____	45
3.3.3 Sequenciamento e interpretação dos resultados _____	46
3.3.4 Quantificação da transcrição gênica _____	51
3.3.4.1 Extração do RNA bacteriano _____	51
3.3.4.2 Síntese de cDNA _____	53
3.3.4.3 Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qRT-PCR) ____	53
3.3.4.4 Análise da transcrição gênica _____	56
<b>4. Resultados _____</b>	<b>58</b>
4.1 Amostras bacterianas _____	59
4.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos _____	59
4.3 Caracterização dos mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos _____	63
4.3.1 Teste de hidrólise enzimática _____	63
4.3.2 Detecção dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos _____	63
4.3.2.1 Detecção de MBL _____	63
4.3.2.2 Detecção das oxacilinas _____	64
4.3.2.3 Detecção das serino- $\beta$ -lactamases _____	64
4.3.2.4 Transcrição dos genes codificadores dos sistemas de efluxo, da $\beta$ - lactamase cromossomal AmpC e da proteína de membrana externa OprD _____	64
<b>5. Discussão _____</b>	<b>77</b>
<b>6. Conclusão _____</b>	<b>94</b>
<b>7. Referências Bibliográficas _____</b>	<b>97</b>
<b>8. Anexo _____</b>	<b>113</b>
<b>Resumo _____</b>	<b>125</b>
<b>Abstract _____</b>	<b>127</b>

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Organização genética dos dez operons da família RND descritos em *P. aeruginosa*. Cada operon contém os genes que codificam os componentes dos sistemas de efluxo: a proteína de fusão periplasmática (azul escuro); a proteína de membrana interna – bomba (azul claro) e a proteína de membrana externa – canal extrusivo (vermelho claro). À montante (em marrom) está representado o gene regulador proximal de cada operon, que pode exercer a função ativadora (seta para direita) ou repressora (seta para esquerda) de cada gene. Em amarelo, está representado o gene que codifica uma proteína de função desconhecida no sistema mexGHI (Adaptado de: Lister *et al.*, 2009 (73)). \_\_\_\_\_ **36**
- Figura 2.** Porcentagem de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes do HSP e do MCV que apresentaram transcrição basal para os genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*, codificadores dos sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN e XY, respectivamente, e para os genes *ampC* e *oprD*, em comparação com transcrição na cepa referência PA01. \_\_\_\_\_ **66**
- Figura 3.** Porcentagem de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes do HSP e do MCV que apresentaram aumento da transcrição para os genes *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, codificadores dos sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN e XY, respectivamente, para o gene codificador da  $\beta$ -lactamase cromossomal *ampC* e redução da transcrição do gene *oprD*, em comparação com a transcrição na cepa referência PA01. \_\_\_\_\_ **67**

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Características funcionais e moleculares dos principais grupos de $\beta$ -lactamases_____	<b>10</b>
<b>Tabela 2.</b>	$\beta$ -lactamases identificadas em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , de acordo com a respectiva classificação funcional e molecular_____	<b>27</b>
<b>Tabela 3.</b>	Principais substratos utilizados pelos sistemas de efluxo pertencentes à família RND em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> _____	<b>31</b>
<b>Tabela 4.</b>	Sequência de nucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes codificadores de $\beta$ -lactamase_____	<b>48</b>
<b>Tabela 5.</b>	Cepas controle utilizadas neste estudo para a detecção de genes de resistência, por meio da técnica de PCR_____	<b>50</b>
<b>Tabela 6.</b>	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de qRT-PCR para os genes alvos <i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexF</i> , <i>mexY</i> , <i>ampC</i> e <i>oprD</i> e para o gene de referência <i>rpsL</i> _____	<b>55</b>
<b>Tabela 7.</b>	Distribuição da potência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das 145 amostras clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de hemoculturas do Hospital São Paulo e do Medical College of Virginia_____	<b>60</b>
<b>Tabela 8.</b>	Distribuição da potência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados nas amostras clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de hemoculturas do Hospital São Paulo_____	<b>62</b>
<b>Tabela 9.</b>	Número e porcentagem de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> procedentes do Hospital São Paulo e do Medical College of Virginia que apresentaram transcrição basal e alteração da transcrição para os genes codificados dos sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN e XY, para a $\beta$ -lactamase cromossomal AmpC e para a proteína de membrana externa OprD_____	<b>68</b>
<b>Tabela 10.</b>	Distribuição da moda da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e associação de determinantes de resistência identificados nos 84 isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> procedentes do Hospital São Paulo	<b>72</b>

---

<b>Tabela 11.</b> Distribuição da moda da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e associação de determinantes de resistência identificados nos 61 isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> procedentes do Medical College of Virginia_____	<b>76</b>
<b>Tabela Anexo 1.</b> Perfil de sensibilidade e mecanismos de resistência das 84 amostras clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de hemoculturas do Hospital São Paulo_____	<b>114</b>
<b>Tabela Anexo 2.</b> Perfil de sensibilidade e mecanismos de resistência das 61 amostras clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de hemoculturas do Medical College of Virginia_____	<b>117</b>
<b>Tabela Anexo 3.</b> Expressão relativados genes avaliados nas 84 amostras clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de hemoculturas do Hospital São Paulo, em comparação à cepa referência PA01_____	<b>119</b>
<b>Tabela Anexo 4.</b> Expressão relativados genes avaliados nas 61 amostras clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de hemoculturas do Medical College of Virginia, em comparação à cepa referência PA01_____	<b>122</b>

---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ATCC** – American Type Culture Collection

**CDC** - Centers for Disease Control and Prevention

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**CHDL** – Carbapenem-hidrolyzing class D  $\beta$ -lactamases

**CLSI** – Clinical Laboratory Standards Institute

**ESAC** – Extended-spectrum AmpC ou AmpC de espectro estendido

**ESBL** – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases ou  $\beta$ -lactamases de espectro estendido

**EUA** – Estados Unidos da América

**HSP** – Hospital São Paulo

**ICS** – Infecção de corrente sanguínea

**IRAS** – Infecção relacionada à assistência à saúde

**MBL** – Metallo- $\beta$ -lactamases

**MCV** – Medical College of Virginia

**NNIS** – National Nosocomial Infections Surveillance System

**OMP** – Outer membrane protein ou proteína de membrana externa

**OXA** – Oxacilinases

**PBP** – Proteínas ligadoras de penicilinas

**PCR** – Reação da cadeia da polimerase

**qRT-PCR** – Reação da cadeia de polimerase em tempo real

**UFC** – Unidades formadoras de colônia

**UTI** – Unidade de Terapia Intensiva

**UV** – Ultravioleta



---

## *1.Introdução*

---

## Introdução

---

*Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose, ligeiramente curvados, não esporulados, que medem aproximadamente 0,5 a 1 µm de largura por 1,5 a 5 µm de comprimento. Essa espécie é usualmente móvel, possuindo um ou vários flagelos polares. Utiliza glicose e outros carboidratos oxidativamente como fonte de energia e, em geral, são citocromo oxidase positiva. *P. aeruginosa* possui um metabolismo respiratório estritamente aeróbio, utilizando oxigênio como acceptor final de elétrons (11). Espécies de *Pseudomonas* podem ser isoladas de diversas fontes, tais como solo, água, plantas e animais, incluindo os seres humanos. Os requerimentos nutricionais mínimos, sua ampla tolerância a uma variedade de condições físicas e sua resistência aos agentes antimicrobianos contribuem para o seu sucesso ecológico e para seu papel como um importante patógeno relacionado à etiologia das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (11, 151).

*P. aeruginosa* é considerado o patógeno mais frequentemente associado a infecções por pacientes hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Dados do “National Nosocomial Infections Surveillance System” (NNIS) (95) reportam esse patógeno como o terceiro agente mais frequentemente associado a infecções pulmonares ou do sítio cirúrgico, o quarto patógeno mais frequente em infecção do trato urinário e o quinto mais comum em hemoculturas de pacientes com sepse (139). Esses dados estão de acordo com aqueles publicados pelo programa SENTRY de vigilância de resistência aos antimicrobianos (33). Segundo dados desse programa coletados na América Latina, *P. aeruginosa* é o patógeno mais frequentemente isolado em infecções do trato respiratório inferior, o terceiro patógeno mais frequente em infecções do trato urinário e do sítio cirúrgico e o quinto mais comumente isolado em infecções de corrente sanguínea (145). Um outro

---

## Introdução

---

estudo de vigilância, conduzido na Europa, identificou *P. aeruginosa* como o segundo patógeno mais frequentemente relacionado a infecções em pacientes hospitalizados em UTIs, sendo responsável por 30% das pneumonias, 19% das infecções de trato urinário e 10% das infecções de corrente sanguínea (152).

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, netilmicina e amicacina); as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e as polimixinas. Entre os antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos que apresentam atividade contra *P. aeruginosa* e podem ser utilizados clinicamente, estão as penicilinas (ticarcilina e piperacilina), incluindo suas respectivas associações com inibidores de  $\beta$ -lactamase (ácido clavulânico e tazobactam); as cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima, cefepima e cefoperazona); os carbapenens (imipenem, meropenem e doripenem) e o monobactam aztreonam (190).

Apesar das amplas opções de tratamento, *P. aeruginosa* pode desenvolver resistência aos  $\beta$ -lactâmicos durante a terapia antimicrobiana (73, 76). Um estudo publicado por Gales e colaboradores (45), no qual foram avaliadas amostras de *P. aeruginosa* isoladas de cinco regiões geográficas (Ásia-Pacífico, Canadá, Europa, América Latina e Estados Unidos da América), mostrou que as taxas de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos entre os isolados de *P. aeruginosa*, provenientes da América Latina, eram mais elevadas em comparação àquelas apresentadas por isolados provenientes das outras regiões.

São três os principais mecanismos envolvidos na resistência adquirida aos  $\beta$ -lactâmicos: **(i)** redução da acumulação intracelular dessas drogas, pela perda e/ou expressão reduzida das proteínas de membrana externa ou hiperexpressão dos

---

## Introdução

---

sistemas de efluxo; **(ii)** modificações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), sítio-alvo desses agentes; **(iii)** e alteração enzimática dos antimicrobianos, pela produção de  $\beta$ -lactamases (151).

Entre esses mecanismos, a produção de  $\beta$ -lactamases representa a maior ameaça à utilização terapêutica dos  $\beta$ -lactâmicos, pois essas enzimas apresentam crescente diversidade, tanto em termos de estrutura, como de espectro de atividade (151). Outro mecanismo complexo que contribui para o fenótipo de resistência observado em amostras de *P. aeruginosa* são os sistemas de efluxo. Esses sistemas possuem grande importância microbiológica por serem codificados por genes cromossomais e por possuírem uma ampla variedade de substratos, podendo exportar do interior da célula compostos estruturalmente distintos, promovendo resistência a classes não relacionadas de antimicrobianos (71).

Diante da diversidade de mecanismos de resistência encontrados em amostras clínicas de *P. aeruginosa*, é importante conhecer epidemiologicamente a frequência desses mecanismos em nosso meio e em outras regiões do mundo. Desta maneira, neste estudo, pretendemos avaliar e comparar a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* de infecção de corrente sanguínea, obtidos em um hospital brasileiro e outro americano.

---

---

## *1.1 Objetivos*

---

**1.1.1 Objetivo principal**

Comparar os mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos identificados em isolados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de dois hospitais terciários universitários, localizados, respectivamente, no Brasil e nos Estados Unidos da América.

**1.1.2 Objetivos específicos**

- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperadas de infecção da corrente sanguínea de pacientes hospitalizados no Hospital São Paulo (Brasil) e do Medical College of Virginia (Estados Unidos da América);

- Investigar a presença de  $\beta$ -lactamases adquiridas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos;

- Avaliar a transcrição gênica dos sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN e XY entre os isolados de *P. aeruginosa*;

- Avaliar a transcrição gênica da  $\beta$ -lactamase cromossomal AmpC e a sua relação com a resistência antimicrobiana entre os isolados de *P. aeruginosa*;

- Avaliar a transcrição gênica da proteína de membrana externa OprD e a sua possível contribuição para a resistência em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

---

---

## *2. Revisão da Literatura*

---

## 2.1 $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que conferem proteção às bactérias contra a ação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. São produzidas por numerosas espécies bacterianas, porém com diversidades estruturais e localizações diferentes. Nas bactérias Gram positivas, as  $\beta$ -lactamases são, em sua maioria, induzíveis e excretadas para o meio extracelular, aonde acontece a hidrólise do composto  $\beta$ -lactâmico antes que esse se ligue às PBPs na membrana celular. Porém, em bactérias Gram negativas, as  $\beta$ -lactamases são, particularmente, mais eficazes, apresentando uma atividade maior comparada à das bactérias Gram positivas. Em Gram negativos, essas enzimas estão localizadas no espaço periplasmático, podendo alcançar altas concentrações e agir de modo mais eficiente contra os  $\beta$ -lactâmicos que estão atravessando esse espaço para atingir as PBPs (15, 76).

A resistência mediada pelas  $\beta$ -lactamases é resultante da quebra da ligação amida no anel  $\beta$ -lactâmico. Primeiramente, a enzima associa-se de forma não-covalente ao anel  $\beta$ -lactâmico e, então, o radical hidroxila livre do resíduo da serina, presente no sítio ativo da enzima, ataca o anel  $\beta$ -lactâmico, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima, que ainda possui atividade hidrolítica, e o antimicrobiano hidrolisado, conseqüentemente inativo (75).

No caso das metalo- $\beta$ -lactamases, o mecanismo hidrolítico exato é desconhecido. Entretanto, é sabido que o zinco, presente no sítio ativo da enzima, se associa a uma molécula de água e interage com o oxigênio do grupamento carboxila do anel  $\beta$ -lactâmico. Essa interação orienta e polariza a ligação com o antimicrobiano, facilitando, assim, o ataque nucleofílico ao anel  $\beta$ -lactâmico pela ligação do zinco a uma molécula de água (166).

---



## Revisão da Literatura

---

No entanto, alguns fatores podem interferir na capacidade da  $\beta$ -lactamase em conferir resistência, entre os quais destacam-se: **(i)** a quantidade de enzima produzida, **(ii)** a habilidade da enzima em hidrolisar o antimicrobiano e **(iii)** a velocidade com que o  $\beta$ -lactâmico penetra na membrana celular externa. A síntese das  $\beta$ -lactamases pode ter diferentes origens, podendo ser cromossômica ou mediada por plasmídeos e transposons e, além disso, pode ser induzida tanto pela presença de  $\beta$ -lactâmicos, como de precursores da parede celular presentes no meio extracelular (75).

Vários esquemas de classificação foram propostos ao longo dos anos em virtude da diversidade de características bioquímicas e moleculares e em decorrência do número de  $\beta$ -lactamases identificadas (14). Todavia, as  $\beta$ -lactamases são comumente classificadas de acordo com dois esquemas: o proposto por Ambler, no qual se baseia em características moleculares, e o de Bush-Jacoby-Medeiros, no qual combina características estruturais e funcionais das  $\beta$ -lactamases (3, 15). Com base na sequência dos aminoácidos que codificam as  $\beta$ -lactamases, Ambler propôs classificá-las em quatro classes moleculares principais: A) serino  $\beta$  lactamases, incluindo as  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs), penicilinasas e carbenicilinasas; B) metalo- $\beta$ -lactamases; C) cefalosporinasas cromossomais e D) oxacilinasas (3) (Tabela 1).

---

## Revisão da Literatura

**Tabela 1.** Características funcionais e moleculares dos principais grupos de  $\beta$ -lactamases.

Classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (15)		Classificação de Ambler (3)	Características funcionais
Grupo Funcional	Subgrupos	Classe Molecular	
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais dos Gram negativos. Isoladamente conferem resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenens. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
2		A, D	A maioria das enzimas é inibida pelo ácido clavulânico.
	2a	A	Penicilinasas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem alto grau de resistência às penicilinas.
	2b	A	$\beta$ -lactamases de espectro limitado de bactérias Gram negativas. Inclui TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11, SHV-77 e SHV-85.
	2be	A	$\beta$ -lactamases de espectro ampliado. Conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
	2bf	A	$\beta$ -lactamases derivadas de TEM. Resistentes ao inibidor de $\beta$ -lactamases.
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina com maior eficiência.
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina) e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico.
	2e	A	Cefalosporinasas inibidas pelo ácido clavulânico.
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina e são inibidas pelo ácido clavulânico.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- $\beta$ -lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
4		ND	Enzimas não sequenciadas e que não são classificadas nos outros grupos.

ND: não determinada. (Adaptado de Bush *et al.*, 1995 (15)).

### 2.1.1 $\beta$ -lactamases em *Pseudomonas aeruginosa*

Uma das características da *P. aeruginosa* é a sua capacidade de apresentar resistência a diversos antimicrobianos não relacionados e, a presença de  $\beta$ -lactamases, é considerada a principal causa de resistência bacteriana contra os agentes  $\beta$ -lactâmicos. Esse fato pode estar relacionado ao uso frequente e, algumas vezes, indiscriminado dos agentes  $\beta$ -lactâmicos na clínica médica. A resistência a esses antimicrobianos dificulta o tratamento, aumenta a morbi-mortalidade e os custos com o paciente (137).

As  $\beta$ -lactamases identificadas até o momento em isolados clínicos de *P. aeruginosa* estão descritas abaixo, organizadas de acordo com as respectivas classificações por grupo funcional e por classe molecular. Os dados apresentados a seguir estão resumidos na Tabela 2.

### 2.1.2 Cefalosporinases cromossomais ou AmpC

A  $\beta$ -lactamase AmpC é codificada por genes cromossomais de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e em algumas espécies de enterobactérias, como *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* e *Yersinia enterocolítica* (151).

Essas enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas e cefamicinas com grande eficácia, enquanto o aztreonam e as cefalosporinas de terceira geração são hidrolisadas com menor eficácia. Normalmente, as cefalosporinas de quarta geração e os carbapenens são fracamente hidrolisados pelas enzimas AmpC (58).

Na ausência de  $\beta$ -lactâmicos, a  $\beta$ -lactamase AmpC é, normalmente, produzida em baixos níveis. Porém, na presença de  $\beta$ -lactâmicos indutores, como a

---

cefexitina e, especialmente, o imipenem, passam a ser produzidas em grande quantidade. O mecanismo de indução de AmpC é controlado pela atividade de três proteínas – AmpG, AmpD e AmpR. O grau de indução é dependente do  $\beta$ -lactâmico indutor. Quando esses antimicrobianos indutores são retirados do meio, a produção volta aos níveis basais (58, 190). No entanto, mutações nos genes *ampR* e *ampD* podem causar hiperexpressão constitutiva de *ampC*, ou seja, a produção dessas  $\beta$ -lactamases não diminui com a retirada do agente indutor. Esses mutantes apresentam o fenótipo desreprimido e mostram-se, também, resistentes à cefepima e cefpiroma (190).

Recentemente, foram descritas mutações no gene que codificava a enzima AmpC que, por ocasionar substituições de aminoácidos específicos no sítio ativo, resultavam no aumento do espectro hidrolítico da enzima, que passaram a ser denominadas AmpC de espectro estendido ou ampliado (ESAC, por “Extended-Spectrum AmpC”), também capazes de hidrolisar o imipenem (141).

### **2.1.3 $\beta$ -lactamases de espectro limitado**

As enzimas classificadas nos grupos 2b e 2c incluem  $\beta$ -lactamases, cuja atividade hidrolítica é perdida frente à ação dos inibidores de serino- $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. Essas enzimas apresentam potente atividade contra as penicilinas e as cefalosporinas de primeira e segunda geração, com a particularidade de que as enzimas do grupo 2c hidrolisam carbenicilina com igual eficiência com a qual hidrolisam benzilpenicilina. Entre as enzimas pertencentes ao subgrupo 2b, TEM-1, TEM-2, TEM-90, TEM-110 e SHV-1 já foram identificadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, enquanto que, entre as

---

$\beta$ -lactamases pertencentes ao grupo 2c, as variantes PSE-1, PSE-4, CARB-3, CARB-4, CARB *like* e AER-1 foram identificadas nessa espécie (151, 190).

#### **2.1.4 $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL)**

Apesar de não existir um consenso sobre a sua definição, inicialmente, o termo ESBL foi utilizado para se referir àquelas enzimas derivadas de TEM-1/TEM-2 e SHV-1, que apresentavam atividade hidrolítica contra as cefalosporinas de amplo espectro, além de hidrolisarem as penicilinas e os monobactams. Atualmente, esse termo é utilizado de maneira mais abrangente, incluindo outras enzimas da classe A ou D de Ambler, que apresentam atividade hidrolítica contra as penicilinas, as cefalosporinas e o aztreonam. A maioria das enzimas do tipo ESBL é sensível à ação dos inibidores de serino- $\beta$ -lactamase (106).

No início da década de 90, a produção das enzimas do tipo ESBL passou a ser observada entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* (170). Até o momento, foram relatadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, as ESBL dos tipos TEM, SHV, PER, VEB, GES, BEL e CTX-M. Essas enzimas são remotamente relacionadas do ponto de vista genético; entretanto, compartilham o mesmo perfil bioquímico de hidrólise e inibição pelos diferentes compostos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. As ESBL representam o maior grupo de  $\beta$ -lactamases estudadas atualmente (14, 15, 190).

##### **2.1.4.1 TEM**

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. TEM-1 foi reportada pela primeira vez em um isolado clínico de *Escherichia coli* na Grécia. A origem da sigla TEM é decorrente do nome da paciente na qual a enzima foi isolada,

---

Temoniera. Esta enzima é codificada por genes localizados, usualmente, em elementos genéticos móveis, plasmídios e transposons, que por meio de uma série de eventos de transposição e rearranjos, migram para diferentes plasmídeos entre microrganismos da mesma espécie ou entre espécies diferentes. Devido à grande facilidade de disseminação, essa enzima tem sido descrita em diversas espécies de enterobactérias, e em outras espécies bacterianas, como, *P. aeruginosa* (106).

O espectro hidrolítico dessa enzima em isolados de *P. aeruginosa* é similar àquele encontrado em ESBLs de enterobactérias: penicilinas de espectro limitado, cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam (170).

Dezenas de enzimas do tipo TEM já foram descritas mundialmente, sendo algumas resistentes aos inibidores de  $\beta$ -lactamase e, a maioria, apresenta o fenótipo ESBL (14; <http://www.lahey.org/studies>). Em *P. aeruginosa*, apenas cinco dessas enzimas foram reportadas: TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42 e TEM-116 (32, 38, 82, 93, 117).

#### **2.1.4.2 SHV**

A denominação da sigla SHV se refere a uma propriedade bioquímica da enzima variável sulfidrílica (“sulphhydryl variable”). Nesse gene, o fenótipo ESBL é caracterizado a partir de substituições de sequências proteicas que ocorrem no gene *bla*<sub>SHV-1</sub>, e, essas alterações assemelham-se às que acontecem com as ESBL do tipo TEM (106).

A enzima SHV já foi relatada em vários membros da família Enterobacteriaceae e em alguns casos de infecções por *Acinetobacter* spp. (123, 190). Em *P. aeruginosa*, poucos isolados foram descritos como produtores dessa

---

enzima. A variante SHV-2 foi originalmente detectada na França (96) e, posteriormente, na Tailândia, na Polônia e na Tunísia (23, 81). SHV-5 foi descrita na Grécia e Tailândia (23, 98, 123), enquanto SHV-12 foi identificada, até o momento, somente na Tailândia (23).

A análise das sequências de DNA adjacentes ao gene que codifica a enzima SHV-2a, encontrada em isolados de *P. aeruginosa*, revelou sequências idênticas às aquelas encontradas em um plasmídeo de *Klebsiella pneumoniae*, que também continha o gene *bla*<sub>SHV-12</sub> (181). Essa evidência sugere que os genes que codificam essas enzimas podem ser transferidos geneticamente de membros da família Enterobacteriaceae para isolados de *P. aeruginosa*. Entretanto, esse evento ocorre com baixa frequência devido a possíveis incompatibilidades para a conjugação e replicação plasmidial entre os diferentes gêneros (96).

#### **2.1.4.3 PER**

A primeira descrição de PER-1 foi relatada em 1993, a partir de um isolado de *P. aeruginosa* proveniente da Turquia (99). Desde então, essa enzima foi descrita em isolados de *P. aeruginosa* coletados de diversos países, geograficamente distantes, como, Bélgica, Espanha, França, Irã, Iraque, Itália, Japão, Síria e países do Leste Europeu (26, 34, 42, 43, 78, 80, 103, 154, 157, 180). A variante PER-2 foi descrita a partir de um isolado de *Salmonella* Typhimurium proveniente da Argentina (7). Posteriormente, essa enzima foi identificada em isolados da família Enterobacteriaceae, *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* de diferentes países latino-americanos (22, 105, 162). Ainda não há relatos da presença dessa enzima no Brasil.

---

#### 2.1.4.4 VEB

O primeiro relato de VEB-1 foi de um isolado de *E. coli* na França (97). Em 2007, houve uma grande disseminação dessa enzima entre isolados de *P. aeruginosa* que apresentavam resistência à ceftazidima na Bulgária (150). Posteriormente, essa enzima foi identificada em isolados de *P. aeruginosa* na Tailândia, Kuwait, Índia, Reino Unido e Irã. Uma nova variante, VEB-3, foi identificada em isolados de *P. aeruginosa* na China, em 2006 (4, 50, 60, 89, 119, 177).

#### 2.1.4.5 GES

A enzima GES-1 (Guiana extended spectrum) foi inicialmente identificada em um isolado de *K. pneumoniae* de um paciente que havia sido transferido de um hospital da Guiana Francesa para a França, em 1998 (118). Após o primeiro relato, variantes de GES foram identificadas em todos os continentes, tanto em isolados clínicos de enterobactérias, como em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Até o momento, 16 variantes de enzimas do tipo GES já foram identificadas (67, 92, 167, 171), sendo que, no Brasil, já foram relatadas GES-1 e GES-5 em *P. aeruginosa* e *K. ozaenae*, GES-7 em *K. pneumoniae* (19, 29, 37, 110, 116) e GES-16 em *S. marcescens* (dados ainda não publicados) (<http://www.lahey.org/studies>).

As  $\beta$ -lactamases do tipo GES foram inicialmente classificadas como ESBL por possuírem amplo espectro de ação, que incluíam penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, e por apresentarem atividade carbapenemase praticamente nula (49). Entretanto, em 2001, uma variante de GES-1 foi reportada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada na África do Sul (120). Essa variante, GES-2, apresentava

---



uma única alteração de aminoácido quando comparada à GES-1, um resíduo de asparagina, ao invés de glicina na posição 170 de Ambler e seu espectro de ação passou a incluir também os carbapenems. A análise da cinética de GES-2 mostrou uma eficiência catalítica contra imipenem 100 vezes maior que GES-1. A partir de então, outras variantes de enzimas do tipo GES com atividade carbapenemase foram descritas: GES-4, GES-5, GES-6 e GES-11 (92, 171).

A variante GES-5, por sua vez, foi inicialmente caracterizada a partir de um isolado de *E. coli*, na Grécia, em 2004 (164). Essa nova variante apresentava, em comparação com a enzima GES-1, a substituição de um resíduo glicina por serina, também na posição 170 de Ambler. Essa substituição rendeu a GES-5 a capacidade de hidrolisar imipenem; porém, com eficiência ainda maior que aquela apresentada pela variante GES-2 (5). Entre as enzimas do tipo GES com atividade imipenemase, somente a variante GES-5 foi identificada em *P. aeruginosa*, em isolados provenientes da China, Espanha e do Brasil (29, 160, 169).

#### **2.1.4.6 BEL**

A enzima BEL-1 foi identificada em um isolado clínico de *P. aeruginosa*, procedente da Bélgica, em 2004. Esta enzima apresenta resistência à ticarcilina e à ceftazidima, mas possui sensibilidade reduzida à piperacilina, à cefepima, à cefpiroma e ao aztreonam. Essa enzima constitui o segundo exemplar de ESBLs que, assim como BES-1, possui resistência seletiva ao tazobactam. Adicionalmente, o moxalactam parece ser um bom inibidor da atividade de BEL-1, devido à alta afinidade dessa enzima por esse substrato, assim como observado na enzima TEM-52 (125).

---

O gene *bla*<sub>BEL-1</sub> encontra-se inserido em um cassete cromossômico de um integron de classe 1, o *In120*, e, parece estar restrito à Bélgica, sendo descrito em diferentes cidades desse país em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (12). Uma nova variante dessa enzima, BEL-2, foi descrita em 2007, também na Bélgica, em um isolado de *P. aeruginosa*. BEL-1 difere de BEL-2 pela substituição de um único aminoácido na posição 162 de Ambler (128).

#### **2.1.4.7 CTX-M**

As ESBL do tipo cefotaximase (CTX-M) apresentam apenas 40% de similaridade com as  $\beta$ -lactamases TEM e SHV (106). Essas  $\beta$ -lactamases são codificadas por genes localizados em plasmídios, os quais normalmente abrigam outros genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, ao cloranfenicol, às sulfonamidas, ao trimetoprim e à tetraciclina. Acredita-se que a  $\beta$ -lactamase tipo CTX-M foi originada a partir da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata*, devido ao seu alto grau de similaridade (13).

O primeiro relato da produção de CTX-M ocorreu em 1990, a partir de um isolado clínico de *E. coli* recuperado na Alemanha (6). Posteriormente, essas enzimas se disseminaram por todos os continentes e, em algumas regiões, superaram a incidência das clássicas ESBL dos tipos TEM e SHV (182). Durante muitos anos, a identificação da enzima CTX-M esteve restrita aos membros da família Enterobacteriaceae. Em 2006, as enzimas CTX-M-1 e CTX-M-43 foram identificadas em isolados clínicos *P. aeruginosa* provenientes da Holanda e da Bolívia, respectivamente (2, 22). A variante CTX-M-2 foi recentemente descrita em isolados de *P. aeruginosa* procedentes de São Paulo e de Porto Alegre, sendo também

---

identificada em amostras clínicas, desse mesmo patógeno, que apresentavam resistência à ceftazidima, isoladas de um hospital universitário localizado em São Paulo (113, 115).

### **2.1.5 Oxacilinases**

As oxacilinases (OXA) receberam esta designação por apresentarem atividade hidrolítica potente contra as penicilinas resistentes às penicilinas (a oxacilina, a cloxacilina e a metilicina). Uma característica marcante desse grupo de enzimas é o fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas fortemente inibidas pelo cloreto de sódio. Embora a maioria dos genes que codificam enzimas do tipo OXA esteja localizada em plasmídeos, alguns podem ocorrer naturalmente no genoma de certas bactérias Gram negativas (129).

Dentre as dezenas de enzimas do tipo OXA descritas até o momento, existe uma divergência em termos de suas propriedades bioquímicas. Algumas enzimas do tipo OXA possuem espectro hidrolítico restrito às penicilinas e às cefalosporinas de primeira e segunda gerações (oxacilinases de espectro limitado); outras são capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta gerações (ESBL do tipo OXA). Certas variantes de OXA apresentam também atividade hidrolítica contra o imipenem (carbapenemases do tipo OXA) (88).

#### **2.1.5.1 Oxacilinases de espectro limitado e ESBLs do tipo OXA**

A evolução das ESBLs do tipo OXA é semelhante à das enzimas TEM e SHV, as quais se originaram a partir de enzimas estruturalmente semelhantes,

---

porém, de espectro mais restrito (106). A ESBL do tipo OXA foi originalmente descoberta em isolados de *P. aeruginosa* na Turquia (121).

No primeiro subgrupo, além de OXA-1 e OXA-30, estão incluídas as enzimas OXA-31 e OXA-47. Essas oxacilinases ocorrem com frequência entre amostras de enterobactérias, embora OXA-1 e OXA-31 tenham sido também identificadas em *P. aeruginosa*. Enquanto OXA-47 apresenta espectro hidrolítico limitado, OXA-31 é capaz de hidrolisar cefalosporinas de quarta geração e, portanto, é considerada uma ESBL do tipo OXA. Posteriormente à caracterização inicial de OXA-1, pesquisadores evidenciaram que, assim como OXA-31, essa enzima apresentava atividade hidrolítica contra cefepima, porém, curiosamente, OXA-1 não é considerada uma ESBL do tipo OXA (190).

Pertencentes ao subgrupo OXA-2, as enzimas OXA-2, OXA-3, OXA-15, OXA-21 e OXA-32 já foram identificadas em *P. aeruginosa*, sendo OXA-2, OXA-3 e OXA-21 oxacilinases de espectro limitado. As enzimas OXA-15, OXA-32 e OXA-161, por sua vez, apresentam substituição de um único aminoácido, quando comparada à OXA-2, o que ocasionou ampliação de seu espectro hidrolítico contra ceftazidima, sendo, portanto, consideradas ESBL do tipo OXA (31, 62, 122).

OXA-10 constitui a enzima do tipo OXA mais prevalente entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Enzimas pertencentes ao subgrupo OXA 10 incluem OXA-7, OXA-11, OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-35, OXA-56 e OXA-74, das quais somente OXA-7, OXA-10 e OXA-56 apresentam espectro hidrolítico limitado (129).

Dentre as oxacilinases de espectro limitado que não são relacionadas às enzimas OXA-1, OXA-2 e OXA-10, os exemplares LCR-1, NPS-1, OXA-5, OXA-20,

---

OXA-46 foram identificados em isolados de *P. aeruginosa* de diferentes regiões geográficas. As ESBL do tipo OXA classificadas neste subgrupo e que já foram identificadas nessa espécie bacteriana incluem as variantes OXA-18 e OXA-45 (129).

#### **2.1.5.2 Carbapenemases do tipo OXA**

As carbapenemases do tipo OXA podem ocorrer naturalmente em alguns organismos Gram negativos, assim como podem ser adquiridas pela transferência de material genético. Nesse último caso, as carbapenemases do tipo OXA são designadas com a sigla CHDLs, por “Carbapenem-Hidrolising class D  $\beta$ -Lactamases” (129).

As CHDLs apresentam capacidade de hidrolisar carbapenens, mas não apresentam atividade sobre aztreonam e cefalosporinas de terceira e quarta geração. Baseado na identidade de suas sequências de aminoácidos, essas enzimas podem ser divididas em quatro subgrupos: OXA-23; OXA-24, cuja sequência é idêntica à OXA-40; OXA-58 e OXA-143 (53, 129). Até recentemente, a produção de CHDL era restrita a amostras de *Acinetobacter* spp. Entretanto, em 2008, a produção de OXA-40 foi identificada em um isolado clínico de *P. aeruginosa* recuperado na Espanha. No referido estudo, plasmídeos idênticos continham o gene *bla*<sub>OXA-40</sub> em *P. aeruginosa* e em *A. baumannii*, evidenciando o potencial de disseminação interespecíes desse determinante de resistência (148).

#### **2.1.6 Serino-carbapenemases**

---

A primeira  $\beta$ -lactamase do tipo carbapenemase pertencente à classe molecular A descrita foi a enzima SME-1 (“*Serratia marcescens* enzyme”), a partir de um isolado clínico de *S. marcescens* recuperado em Londres, no ano de 1982. Relatos da produção de SME estão restritos, até o momento, aos EUA, Canadá, Suíça e Reino Unido (17, 126, 135).

As enzimas IMI-1 (“*imipenem*-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase”) e NMC-A (“*not metalloenzyme carbapenemase*”) foram descritas, até o momento, unicamente em isolados clínicos de *Enterobacter cloacae*. A  $\beta$ -lactamase IMI possui duas variantes, sendo que a sua primeira descrição ocorreu em 1984, nos EUA e, posteriormente, na China (135, 137). A primeira descrição de NMC-A foi em Paris, em 1990, sendo relatada a presença desta enzima também na Argentina e nos EUA (135). Até o momento, não existem relatos de bactérias produtoras destas enzimas no Brasil.

Isolados produtores de SME, IMI ou NMC apresentam sensibilidade diminuída ou resistência às penicilinas, às cefalosporinas de primeira e segunda geração, ao aztreonam e ao imipenem, mantendo a sensibilidade às cefalosporinas de terceira e quarta geração. Além disso, são inibidos pelos inibidores de serino- $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico e o tazobactam (135). Os genes que codificam as enzimas SME, IMI e NMC estão localizados no cromossomo bacteriano e, até o momento, descritas unicamente entre membros da família Enterobacteriaceae.

Enquanto as enzimas SME, IMI e NMC são raramente relatadas em isolados clínicos, as  $\beta$ -lactamases do tipo KPC têm sido descritas com maior frequência tanto em isolados clínicos de enterobactérias, como em *P. aeruginosa* e também em *Acinetobacter* spp (135, 140).

---

## Revisão da Literatura

---

A primeira descrição da enzima KPC-1 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ocorreu no ano de 2001, na Carolina do Norte (EUA), a partir de um isolado de *K. pneumoniae*, coletado em 1996, durante um estudo de vigilância denominado ICARE (“Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology”). Desde então, onze variantes foram descritas (<http://www.lahey.org/studies>). No entanto, uma recente correção na sequência de nucleotídeos do gene *bla*<sub>KPC-1</sub> indicou que as enzimas KPC-1 e KPC-2 são idênticas (184).

Essas carbapenemases são normalmente codificadas por genes localizados em plasmídeos e hidrolisam todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens (135). Até recentemente, acreditava-se que a disseminação das enzimas do tipo KPC estivesse restrita aos membros da família Enterobacteriaceae. Entretanto, isolados de *P. aeruginosa* produtores de KPC já foram identificados em alguns países da América Latina, como Colômbia, Trinidad e Tobago e Porto Rico (1, 163, 175). A variante KPC-2 foi descrita também em um isolado de *P. putida* no estado do Texas, nos EUA (9). Recentemente, KPC-2, KPC-3, KPC-4 e KPC-10 foram descritas em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., em Porto Rico (140).

No Brasil, a primeira detecção de isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 ocorreu no Recife (90). Apesar da descrição dessa enzima ter ocorrido no ano de 2009, esses isolados haviam sido coletados anteriormente, em 2006. Posteriormente, a produção desta enzima foi identificada em isolados clínicos de *K. pneumoniae* procedentes do Rio de Janeiro e São Paulo (107, 108) e, mais recentemente, em isolados clínicos de *E. cloacae* em Porto Alegre (189).

---

### 2.1.7 Metallo- $\beta$ -lactamases

As metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) são enzimas que apresentam potente atividade contra carbapenems, mas diferem de outras carbapenemases em três principais aspectos: **(i)** requerem íons  $Zn^{+2}$  ou outros cátions divalentes como cofator no sítio ativo; **(ii)** são resistentes à ação dos inibidores das serino- $\beta$ -lactamases, embora sofram inibição por agentes quelantes (EDTA, derivados de tiol e do ácido dipicolínico); **(iii)** não hidrolisam o aztreonam (166).

As MBLs intrínsecas são normalmente mediadas por cromossomos e podem ser encontradas em um número limitado de espécies, como *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Myroides odoratum*, *Legionella gormannii*, *Bacteroides fragilis* e *Stenotrophomonas maltophilia* (54, 165). As MBLs adquiridas encontram-se em estruturas genéticas móveis, facilitando a disseminação dessas enzimas entre diferentes espécies bacterianas. Até o momento, foram descritas 10 subclasses de MBL adquiridas.

A primeira descrição de MBL foi a enzima IMP (imipenemase), isolada de *S. marcescens* no Japão, em 1991 (102). Diversas variantes dessa enzima foram então descritas em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e enterobactérias de praticamente todos os continentes (166, 167). As variantes IMP-1, IMP-16 e IMP-18 já foram reportadas em isolados clínicos brasileiros de *P. aeruginosa* (85, 87, 178).

Em 1999, a segunda subclasse descrita de MBL adquirida foi denominada VIM (Verona impenemase). Essa enzima foi observada em uma amostra de *P. aeruginosa* originária de Verona, Itália (69). Muitas variantes de VIM já foram descritas, tanto em microrganismos fermentadores da glicose, quanto em não fermentadores. Embora a maioria das descrições tenha ocorrido na Europa, algumas

---



## Revisão da Literatura

---

variantes já foram identificadas nos continentes americano e asiático (135, 166, 167).

A terceira subclasse de MBL adquirida, SPM-1 (São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase), foi encontrada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em 2001, recuperada do trato urinário de uma criança hospitalizada no Complexo do Hospital São Paulo (158). Essa enzima parece ocorrer de forma endêmica no Brasil e, especificamente, em isolados de *P. aeruginosa*, pois, até o momento, não foi encontrada em outras espécies bacterianas. Desde a sua primeira descrição, amostras produtoras desta enzima foram isoladas em diversas cidades brasileiras, tais como: São Paulo, Brasília, Salvador, Fortaleza, Santo André (SP), Londrina, Maringá, Curitiba, Recife, Rio de Janeiro, Porto Alegre e São Luiz, sendo que na maioria destas descrições foi encontrado um perfil clonal predominante, denominado SP (18, 25, 46, 100, 109, 124, 161, 188).

A quarta subclasse de MBL adquirida, denominada GIM-1 (German imipenemase), foi descrita em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Dusseldorf, Alemanha, em 2002 (20). Em 2005, foi descrita uma nova MBL adquirida em isolados clínicos de *A. baumannii* na Coreia, denominada SIM-1 (Seul imipenemase) (70).

Mais recentemente, foram descritas novas subclasses de MBLs adquiridas: AIM-1 (Australian imipenemase), recuperada de um isolado clínico de *P. aeruginosa*, em 2007, na Austrália (185); KHM-1 (Kyorin Health Science metalo- $\beta$ -lactamase), descrita em 2008, no Japão, em um isolado clínico de *C. freundii* (147); NDM-1 (MIM-1) (New Delhi metalo- $\beta$ -lactamase), descrita em 2008, na Índia, em um isolado clínico de *K. pneumoniae*, e, posteriormente, sua ocorrência foi relatada em enterobactérias na Inglaterra (MIM-1) (36, 186); DIM-1 (Dutch Imipenemase), enzima

## Revisão da Literatura

---

descrita em um isolado de *P. stutzeri*, em 2009 (127) e TMB-1 (Tripoli MBL), recuperada de um isolado clínico de *P. aeruginosa* detectado da Líbia (África), em 2008 (40).

---

## Revisão da Literatura

**Tabela 2.**  $\beta$ -lactamases identificadas em *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com a respectiva classificação funcional e molecular.

Grupo funcional de Bush-Jacoby-Medeiros	Classe molecular de Ambler	Enzimas	Referências
1	C	AmpC (PDC-1, PDC-2 <sup>a</sup> , PDC-3 <sup>a</sup> , PDC-4, PDC-5 <sup>a</sup> , PDC-6, PDC-7, PDC-8, PDC-9, PDC-10)	141
2b	A	TEM-1, TEM-2, TEM-90 (TLE-1), TEM-110, SHV-1 PER-1, PER-2 VEB-1, -2, -3 TEM-4, -21, -24, -42, -116	151, 190 22, 151 60, 151 151
2be	A	SHV-2a, -5, -12 GES-1, -2 <sup>b</sup> , -5 <sup>b</sup> , -8 (IBC-2), -9 BEL-1, BEL-2 CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-43	151 151 128, 151 2, 22, 113
2c	A	PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3, CARB-4, CARB-like, AER-1 Espectro restrito: LCR-1, NPS-1, OXA-1, -2, -3, -4, -5, -7, -9, -10, -12, -20, -21, -30, -31, -46	151, 190 151, 190
2d	D	ESBL: OXA-4, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -19, -18, -28, -31, -32, -35, -45 e -143. Carbapenemase cromossomal: OXA-50 adquirida: OXA-24/40	106 190 148
2f	A	KPC-2, KPC-5.	9, 163, 175
3	B	IMP-1, -4, -6, -7, -9, -10, -12, -13, -15, -16, -18, -22. VIM-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -11, -13, -15, -16, -17, -18. SPM-1 GIM-1 AIM-1 TMB-1	10, 35, 39, 48, 57, 85, 143, 151 21, 64, 149 158 20 185 40

<sup>a</sup> Variantes que apresentam maior atividade contra cefepime e imipenem, consideradas ESAC (cefalosporinas de espectro ampliado).

<sup>b</sup> Variantes que apresentam atividade hidrolítica contra imipenem.

## 2.2 Sistemas de efluxo

O primeiro sistema de efluxo descrito em procariotos foi o sistema Tet de *E. coli* responsável pela diminuição da sua sensibilidade à tetraciclina. Posteriormente, o sistema de efluxo QacA foi identificado em *Staphylococcus aureus* como determinante de resistência a compostos quartenário de amônio. Desde então, os sistemas de efluxo, de codificação plasmidial e cromossomal, vem sendo identificados, com maior frequência, em bactérias dos mais variados gêneros e espécies. Além disso, esses sistemas vêm sendo implicados tanto na resistência intrínseca quanto na adquirida desses microrganismos a agentes antimicrobianos (73, 133). O efluxo ativo de drogas foi o último mecanismo de resistência antimicrobiana a ser identificado e descrito.

Os sistemas de efluxo são classificados levando em consideração três critérios básicos: **(i)** a fonte de energia utilizada pelo sistema, **(ii)** a relação filogenética com outros sistemas de efluxo e **(iii)** a especificidade de substratos, isto é, capacidade de transportar diferentes compostos pela membrana. São, dessa forma, agrupados em cinco famílias: ABC ("ATP binding cassette"), MFS ("major facilitator superfamily"), SMR ("small multidrug resistance"), MATE ("multidrug and toxic compound extrusion") e RND ("resistance-nodulation division"), distribuídos tanto em bactérias Gram negativas, como também em Gram positivas (73).

A família RND de sistemas de efluxo é a que possui especificidade a um maior número de substratos que englobam antimicrobianos de relevância clínica e desempenha um importante papel na resistência intrínseca e adquirida em diversas bactérias Gram negativas. Geralmente, os genes que codificam os sistemas de efluxo pertencentes a essa família estão localizados no cromossomo bacteriano. Porém, a expressão de genes desse sistema em plasmídeos já foi relatada (73).

---

Diferentemente das outras famílias de efluxo, que são constituídas por um componente simples, o funcionamento dos sistemas da família RND é baseado na abertura de um canal que atravessa as membranas interna e externa da bactéria, permitindo que o substrato seja eliminado para o meio extracelular. Esse canal é composto por três proteínas: **(i)** uma, que é a bomba propriamente dita, dependente de energia, localizada na membrana citoplasmática e funciona como elemento transportador (MexB, MexD, MexF, MexY); **(ii)** uma proteína que facilita a passagem do substrato pela membrana externa, denominada de porina (OprM, OprJ, OprN, OpmB, OmpG, OmpL) e **(iii)** uma terceira, localizada no espaço periplasmático e que une os outros dois componentes (MexA, MexC, MexE, MexY). Os genes que codificam esses sistemas estão organizados em operons, nos quais o primeiro codifica a proteína periplasmática, o segundo a proteína transportadora e o terceiro gene codifica a proteína de membrana externa (Figura 1) (73).

### **2.1 Sistemas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa***

Por muito tempo, acreditou-se que uma das razões da resistência natural e adquirida de *P. aeruginosa* era devido à impermeabilidade da membrana citoplasmática, causada pela presença de proteínas de alto peso molecular. No entanto, após a descrição dos sistemas de efluxo, descobriu-se que a resistência de *P. aeruginosa* é determinada pela interação entre a impermeabilidade da membrana e o efluxo ativo dos agentes antimicrobianos (151).

O sequenciamento do genoma de *P. aeruginosa* permitiu a identificação de 12 sistemas de efluxo da família RND denominados Mex (“multidrug efflux pump”), de expressão constitutiva e codificada por operons, sempre regulados pelo produto

---

## Revisão da Literatura

---

de um gene regulador proximal. Dez desses sistemas foram caracterizados até o momento: 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 (73, 151). Os substratos preferenciais de cada sistema de efluxo estão apresentados na Tabela 3.

De todos os sistemas de efluxo da família RND caracterizados em *P. aeruginosa*, somente ABM, CDJ, EFN e XY tem sido relacionados, até o momento, a resistência intrínseca e adquirida a uma ampla variedade de drogas antimicrobianas de importância clínica. Os outros sistemas Mex de *P. aeruginosa* provavelmente possuem limitada significância clínica, uma vez que, são capazes de ejetar um número menor de antimicrobianos e, até o momento, sua expressão não foi relatada entre isolados clínicos (73).

## Revisão da Literatura

**Tabela 3.** Principais substratos utilizados pelos sistemas de efluxo pertencentes à família RND em *Pseudomonas aeruginosa*.

Substratos	Operons									
	<i>mexAB- oprM</i>	<i>mexCD- oprJ</i>	<i>mexEF- oprN</i>	<i>mexXY- oprM</i>	<i>mexJK- oprM</i>	<i>mexGHI- ompD</i>	<i>mexVW- oprM</i>	<i>mexPQ- ompE</i>	<i>mexMN- oprM</i>	<i>triABC- ompH</i>
<b>Antimicrobianos</b>										
Cloranfenicol	✱	✱	✱	✱			✱	✱	✱	
Fluoroquinolonas	✱	✱	✱	✱		✱	✱	✱		
Tetraciclina	✱	✱		✱	✱		✱	✱		
Macrolídeos	✱	✱		✱				✱		
β-lactâmicos	✱	✱		✱						
Novobiocina	✱	✱								
Trimetropim	✱	✱	✱							
Eritromicina					✱		✱			
Sulfonamidas	✱									
Aminoglicosídeos				✱						
<b>Outros compostos</b>										
Biocidas (triclosan)	✱	✱	✱		✱					✱
Compostos aromáticos	✱	✱	✱							
Detergentes	✱	✱								
Corantes	✱	✱								
Brometo de etídeo		✱								
Vanadium						✱				

Adaptado de Lister *et al.*, 2009 (73).

### 2.2.1.1 Sistema ABM

O sistema ABM foi o primeiro sistema de efluxo da família RND caracterizado em *P. aeruginosa* (130). Esse sistema é expresso constitutivamente e desempenha um importante papel na resistência intrínseca e adquirida a múltiplos antimicrobianos em cepas selvagens de *P. aeruginosa* (84).

Os substratos preferenciais de ABM são variados e incluem a extrusão dos agentes  $\beta$ -lactâmicos. Entre os  $\beta$ -lactâmicos utilizados como substrato estão inclusos os carbapenens, exceto o imipenem. Essa menor afinidade desse sistema pelo imipenem, como substrato, ocorre devido à diferença molecular na estrutura dos carbapenens (151).

A regulação do sistema ABM é feita pelo gene *mexR*, localizado à montante do operon *mexAB-oprM*, que codifica uma proteína repressora da sua transcrição (Figura 1). A hiperexpressão desse sistema ocorre em mutantes *nalB*, que carregam alterações no gene repressor e, conseqüentemente, exibem diminuição da sensibilidade aos seus substratos. Contudo, outros estudos demonstraram que os genes *nalC* e *nalD* também podem modular a expressão do sistema ABM, independentemente do regulador proximal *mexR* (73, 133, 191).

### 2.2.1.2 Sistema CDJ

O sistema CDJ é capaz de utilizar como substrato vários agentes antimicrobianos; porém, mesmo esse sistema não possuindo como substrato preferencial os agentes  $\beta$ -lactâmicos, ele é capaz de extrair cefalosporinas, especialmente, as de quarta geração (151).

---



Normalmente, esse sistema não é expresso em cepas selvagens de *P. aeruginosa*. Porém, mesmo que pouco frequente, a hiperexpressão de CDJ pode ser observada entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*, com mutações no gene *nfxB*. Esse gene é responsável pela regulação da transcrição desse sistema de efluxo, cujo produto reprime fortemente a expressão do operon *mexCD-oprJ* (84, 131).

A resistência cruzada a vários antimicrobianos, como fluoroquinolonas, meropenem, tetraciclina, trimetropim, macrolídeos, novobiocina e cloranfenicol, pode ser observada em consequência da hiperexpressão do sistema CDJ. Porém, esses mutantes podem apresentar sensibilidade à carbenicilina, à ceftazidima, ao aztreonam e aos aminoglicosídeos, um fenótipo característico de mutantes *nfxB*, provavelmente pela diminuição da expressão de ABM, decorrente do mecanismo de correção da expressão desses sistemas (73, 84, 131).

### **2.2.1.3 Sistema EFN**

A expressão de EFN foi originalmente descrita como diminuída em cepas selvagens de *P. aeruginosa*; porém, estudos posteriores relataram a expressão desse sistema em baixos níveis nessas cepas (65, 72).

A transcrição de EFN é dependente da presença de MexT, uma proteína ativadora da sua transcrição, codificada por um gene localizado à montante do operon de *mexEF-oprN* (Figura 1) e que parece está suprimido em cepas selvagens de *P. aeruginosa*. O sistema EFN é expresso em cepas denominadas *nfxC*, que apresentam resistência a múltiplas drogas. Variações em *mexT* são observadas entre cepas mutantes que hiperexpressam EFN, porém, a atividade regulatória de *mexT* parece estar relacionada ao produto de um gene localizado à montante,

---

recentemente caracterizado e denominado *mexS*. Contudo, os mecanismos de regulação da expressão de EFN não foram totalmente caracterizados até o momento (65, 66, 133).

A seleção de mutantes *nfxC* pode ser observada *in vitro* após a exposição às fluoroquinolonas e acredita-se que esses mutantes também possam ser selecionados clinicamente (68). Os mutantes *nfxC*, que hiperexpressam o sistema EFN, apresentam aumento da sensibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos e aos aminoglicosídeos como resultado da diminuição da expressão dos sistemas ABM e XY, os quais possuem a sua expressão corregulada por esse sistema (101, 173).

Além de possuir propriedade ativadora da expressão gênica, acredita-se que MexT possua uma função regulatória repressora, implicada da inibição pós-transcricional da expressão de OprD. Assim, a resistência ao imipenem exibida pelos mutantes *nfxC* é explicada pela redução da expressão de OprD e não como consequência direta da extrusão do imipenem pelo sistema de efluxo EFN (174).

#### **2.2.1.4 Sistema XY**

Diferentemente dos outros operons que codificam sistemas de efluxo em *P. aeruginosa*, o operon XY não possui o gene que codifica a proteína de membrana externa. Para essa função, o sistema XY utiliza a proteína OprN, que também exerce a função de canal extrusivo para vários outros sistemas de efluxo identificados em *P. aeruginosa* (132).

A deleção de *mexXY* em cepas selvagens de *P. aeruginosa* aumenta a sensibilidade à tetraciclina, à eritromicina, assim como aos aminoglicosídeos, sugerindo que esse sistema de efluxo contribui para a resistência intrínseca a estes

---

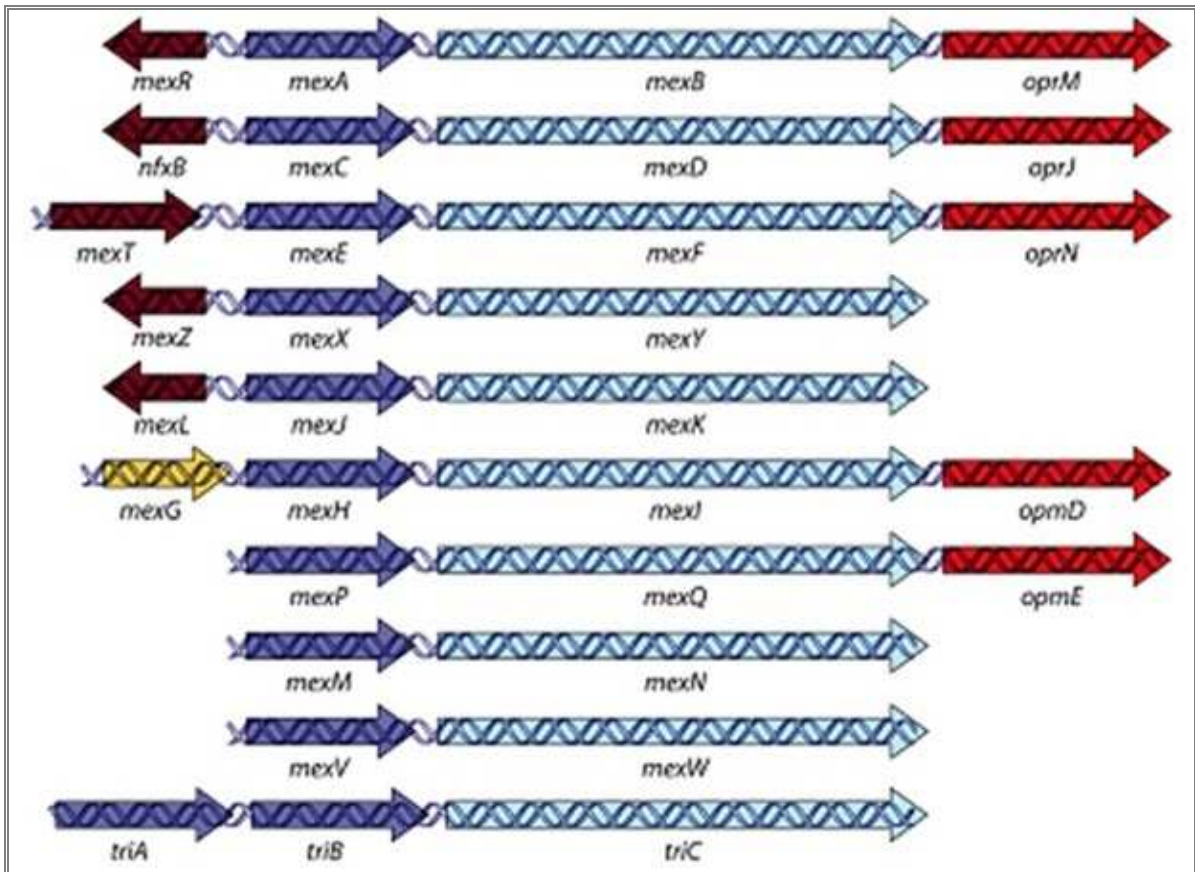
## Revisão da Literatura

---

antimicrobianos. Adicionalmente, a expressão de XY também pode ser induzida na presença desses antimicrobianos (73, 84, 91).

O sistema XY é regulado negativamente pelo produto do gene *mexZ*, localizado à montante do operon (Figura 1). Mutações inativadoras em *mexZ* levam a hiperexpressão de XY, em decorrência da perda de sua atividade repressora. Cepas mutantes de *mexZ* também apresentam resistência às fluoroquinolonas, apesar de não contribuir para a resistência intrínseca à esses antimicrobianos em *P. aeruginosa* (73, 133). Resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, como a cefepima e a cefpiroma, também foi associada à hiperexpressão desse sistema de efluxo. A hiperexpressão do sistema XY foi o principal mecanismo responsável pelo fenótipo de resistência à cefepima e sensibilidade à ceftazidima em isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos de um hospital francês (55, 84).

---



**Figura 1.** Organização genética dos dez operons da família RND descritos em *P. aeruginosa*. Cada operon contém os genes que codificam os componentes dos sistemas de efluxo: a proteína de fusão periplasmática (azul escuro); a proteína de membrana interna – bomba (azul claro) e a proteína de membrana externa – canal extrusivo (vermelho). À montante (em marrom) está representado o gene regulador proximal de cada operon, que pode exercer a função ativadora (seta para direita) ou repressora (seta para esquerda) de cada gene. Em amarelo, está representado o gene que codifica uma proteína de função desconhecida no sistema mexGHI (Adaptado de: Lister *et al.*, 2009 (73)).

### 2.3 Proteínas de membrana externa

A membrana externa das bactérias Gram negativas é composta por fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e por proteínas de membrana externa (OMP, por “outer membrane protein”). A membrana externa constitui uma barreira semipermeável, que permite a passagem seletiva de vários compostos, incluindo os agentes antimicrobianos. No entanto, para sobreviver, as bactérias devem permitir,

também, a passagem de nutrientes para o interior celular. Esse evento ocorre por intermédio das porinas (52).

A perda ou a diminuição da expressão dos genes codificadores das porinas pode reduzir a entrada do antimicrobiano na célula, diminuindo a concentração interna desse agente, e, conseqüentemente, contribui para o mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. Ocasionalmente, a perda e/ou a diminuição das porinas pode estar associada, também, à produção de  $\beta$ -lactamases (52).

Diferentes porinas podem ser encontradas na membrana externa de *P. aeruginosa*, tais como, OprF, OprC, OprD e OprE. Dentre essas, a mais abundante é a OprF que, provavelmente, permite a entrada da maioria dos  $\beta$ -lactâmicos no interior da célula (52).

Em *P. aeruginosa*, OprD é uma porina substrato-específica que facilita a difusão de aminoácidos e antimicrobianos para dentro da célula. Como OprD parece ser a principal porina utilizada para a entrada de carbapenems, mas não de outros  $\beta$ -lactâmicos, a perda da mesma pela célula bacteriana, associada à expressão de sistemas de efluxo, acarreta na diminuição significativa da sensibilidade de *P. aeruginosa* a essa classe de antimicrobianos, afetando mais o imipenem que o meropenem (73). Entretanto, a perda de outras porinas menos específicas, pode afetar o transporte de pequenos agentes hidrofílicos, tais como os aminoglicosídeos, as tetraciclina e o cloranfenicol (190).

A resistência antimicrobiana mediada por OprD pode envolver mecanismos que diminuem a transcrição do gene *oprD* e/ou mutações que podem interromper o funcionamento da porina na membrana externa (73). Alguns desses mecanismos já caracterizados, que diminuem a expressão de OprD incluem: **(i)** interrupção da

---

transcrição da porina, por meio de inserções e deleções na região à montante do gene promotor *oprD*; **(ii)** transcrição imatura do gene *oprD*; **(iii)** correção com mecanismos que conferem resistência a metais, como o zinco e o cobre; **(iv)** diminuição da transcrição por meio de mecanismos de correção com o sistema de efluxo EFN (16, 73, 112).

Mecanismos que causam deficiência na função da porina OprD incluem **(i)** mutações, inserções e/ou deleções do gene e a presença de “stop codons”; **(ii)** e disruptura estrutural do gene *oprD* pela adição de elementos de inserção (44, 73, 174).

## **2.4 Proteínas ligadoras de penicilinas**

As PBPs constituem um importante alvo para a atividade dos  $\beta$ -lactâmicos que se ligam, covalentemente, a essas estruturas, impedindo a formação da parede celular e causando a lise osmótica da célula. Essas proteínas receberam uma denominação numérica, de acordo com o peso molecular; quanto maior o peso molecular, menor a numeração que recebem. Diferentes espécies e gêneros podem apresentar PBPs com a mesma denominação, porém, essas enzimas não são, necessariamente, relacionadas. Até o momento, sete diferentes PBPs foram descritas em *P. aeruginosa*: 1a, 1b, 2, 3, 4, 6 e 7. As PBP-1a, -1b, -2 e -3 desempenham funções essenciais e não essenciais para a viabilidade da célula. Entretanto, os carbapenens possuem afinidade para se ligarem à PBP-2, enquanto as cefalosporinas, à PBP-3 (132, 151, 190).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, em consequência de alterações nas PBPs, é um mecanismo raro, sendo mais comum em bactérias Gram positivas que em Gram

---

## Revisão da Literatura

---

negativas. Entretanto, apesar de pouco frequentes, alterações no sítio-alvo dessas enzimas foram descritas em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Alterações na PBP-4 foram relatadas em dois estudos, os quais avaliaram isolados clínicos de *P. aeruginosa*, após tratamento com o imipenem e com a piperacilina/tazobactam, respectivamente. Um outro estudo sugeriu que a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos poderia estar associada a um aumento na produção da PBP-3. Entretanto, em uma recente avaliação da contribuição de alguns mecanismos que causam resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *P. aeruginosa*, não foram encontradas alterações significantes nas PBPs que estivessem associadas à resistência para esses antimicrobianos (151, 190).

---

---

### *3. Material e Métodos*

---



### **3.1 Amostras bacterianas**

Foram avaliadas amostras de *P. aeruginosa* isoladas de infecção de corrente sanguínea procedentes de dois hospitais localizados em diferentes países: Hospital São Paulo (HSP) e “Medical College of Virginia” (MCV).

O complexo do HSP é o hospital universitário da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), localizado em São Paulo, capital. É um hospital de caráter geral, direcionado ao tratamento de doenças de alta complexidade, atendendo pacientes locais e oriundos de outros municípios e estados (<http://www.unifesp.br/spdm/hsp/descricao.php>). O MCV pertence à “Virginia Commonwealth University” e está localizado em Richmond, Estados Unidos da América. Constitui um renomado centro médico da Virgínia, sendo o pioneiro em programas de transplantes de órgãos (<http://www.vcu.edu>).

Somente a primeira amostra de *P. aeruginosa* isolada por paciente foi incluída no estudo. As amostras procedentes do HSP encontravam-se bancadas em TSB (Tryptic Soy Broth; Oxoid®; Basingstoke; Inglaterra) com 15% de glicerol a -70°C, no banco de microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) e as amostras de procedência do MCV encontravam-se bancadas em ágar nutriente (Oxoid®; Basingstoke; Inglaterra), em temperatura ambiente, no Laboratório Alerta, ambos os laboratórios pertencentes à Disciplina de Infectologia do Departamento de Medicina da UNIFESP/EPM.

### **3.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

As amostras foram retiradas do banco de microrganismos e subcultivadas por duas vezes em ágar columbia base (Oxoid®; Basingstoke; Inglaterra),

---

## Material e Métodos

---

suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, e incubadas por um período de 18 a 20 horas em estufa a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o isolamento, essas amostras foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) por meio da técnica de diluição em ágar, seguindo as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (27).

As soluções estoque dos antimicrobianos testados foram preparadas e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento (27). Foram realizadas diluições seriadas dos antimicrobianos em placas de petri, as quais continham ágar Mueller-Hinton (Oxoid<sup>®</sup>; Basingstoke; Inglaterra).

O volume de 1 mL de cada concentração do antimicrobiano foi adicionado a tubos contendo 19 mL de ágar Muller-Hinton, previamente fundidos e estabilizados em banho-maria a  $56^{\circ}\text{C}$  (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). Os tubos foram homogeneizados e o conteúdo vertido em placas de petri descartáveis, previamente identificadas.

O inóculo foi preparado ressuspendendo de três a cinco colônias bacterianas previamente isoladas (24 horas de incubação) de cada amostra em 3,0 mL da solução de cloreto de sódio a 0,85% (Merck<sup>®</sup> KGaA, Darmstadt, Germany), ajustado à escala 0,5 de McFarland em turbidímetro digital (MicroScan Turbidity Meter; Dade Behring, West Sacramento, CA), que representa, aproximadamente,  $1,5$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro). Adicionalmente, foi realizada uma diluição da ordem de 1:10, sendo pipetado 270  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril e 30  $\mu\text{L}$  do inóculo inicial na base do multinoculador Steers. A partir dessa diluição, o inóculo bacteriano foi dispensado simultaneamente sobre a superfície do ágar, com o auxílio do multinoculador Steers, o qual dispensa de 1 a 3

---

## Material e Métodos

---

µl da solução bacteriana, para obter um inóculo final de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. Depois de inoculadas, as placas foram secas a temperatura ambiente em fluxo laminar e incubadas em estufa a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , por um período de 18 a 20 horas. A leitura das placas foi procedida manualmente e as amostras classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) de acordo com as recomendações do CLSI (28).

Os antimicrobianos utilizados foram: amicacina (Eurofarma, São Paulo, Brasil); aztreonam (Bristol-Myers Squibb, Nova York, EUA); cefepima (Bristol-Myers Squibb, Nova York, EUA); ceftazidima (Strides Arcolab, Bangalore, Índia); ciprofloxacina (Fresenius Robi, Alemanha); gentamicina (Sigma, Steinheim Alemanha); imipenem (Merck Sharp, Nova Jersey, EUA); meropenem (Astra Zeneca, Londres, Inglaterra) e piperacilina/tazobactam (Novafarma, Goiás, Brasil). Para o controle de qualidade do teste de sensibilidade, as amostras da “American Type Culture Collection” (ATCC<sup>®</sup>) *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853 foram utilizadas.

Os dados do perfil de sensibilidade das amostras foram analisados com o auxílio do programa SPSS<sup>®</sup> for Windows versão 17.0.

### 3.3 Caracterização dos mecanismos de resistência aos β-lactâmicos

#### 3.3.1 Teste de Hidrólise Enzimática

O teste de hidrólise foi utilizado para a detecção da atividade enzimática contra os carbapenens (imipenem e meropenem) nas amostras bacterianas testadas.

As amostras foram inoculadas em 15 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth; Oxoid<sup>®</sup>; Basingstoke; Inglaterra) e incubadas por aproximadamente 12 horas em

---

## Material e Métodos

---

estufa, sob agitação, a  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 3.000 rpm (Sanyo/MSE; Inglaterra) em temperatura ambiente para obtenção de um sedimento. Depois de centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1mL de tampão de amostra (TRIS HCl 1mM e  $\text{ZnSO}_4$  1mM) para, então, serem sonicados durante 30 segundos por quatro vezes (Sonics Vibra Cell<sup>TM</sup>; Newtown, EUA). O material sonificado foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugado durante 3 minutos a 13.000 rpm a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e mantido no gelo. Uma solução do antimicrobiano foi preparada com, aproximadamente, 1,5 unidades de absorvância a 299 nm. Em cubetas de quartzo foi adicionado 900  $\mu\text{L}$  da solução do antimicrobiano com 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico. As absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro digital (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), sendo medida a diferença entre as absorvâncias final e inicial a 299 nm. A diminuição gradativa e valores negativos da variação da absorvância ( $\Delta\text{abs}/\text{min}$ , calculado pela diferença entre o valor da absorvância final e o valor da absorvância inicial pelo tempo monitorado) foram considerados resultados positivos para a hidrólise enzimática aos carbapenens.

As amostras que apresentaram hidrólise foram submetidas ao teste de inibição da atividade enzimática contra os carbapenens pelo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético; Sigma, Steinheim Alemanha). Em um tubo de microcentrífuga, foi adicionado 15  $\mu\text{L}$  de uma solução de EDTA a 0,5 mM em 235  $\mu\text{L}$  do extrato protéico, incubado à temperatura ambiente, por cerca de 20 minutos, e, posteriormente, a absorvância foi medida conforme descrito acima. A inibição da atividade hidrolítica da enzima foi considerada pela ausência da variação da

---

## Material e Métodos

---

absorbância do extrato protéico incubado com EDTA na presença do carbapenem. Foram utilizadas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* 1088 produtora de SPM-1, como controle positivo e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 como controle negativo.

### 3.3.2 Detecção dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos

A detecção dos genes de resistência foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou multiplex, de acordo com os genes pesquisados (Tabela 4).

O DNA bacteriano das amostras foi extraído por meio da técnica de fervura. Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foi adicionado 350  $\mu$ L de água Milli-Q® estéril (Billerica, MA, EUA) e 3 a 5 colônias bacterianas previamente isoladas (24 horas de incubação) em placas de ágar nutriente com concentrações subinibitórias de ceftazidima. Essa suspensão foi homogeneizada em vórtex (Phoenix, São Paulo, Brasil), levada à fervura durante 15 minutos e depois centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm em temperatura ambiente (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e utilizado como o DNA alvo de cada amostra para as reações de PCR.

As reações de PCR foram preparadas em fluxo laminar, contendo *master-mix* (GoTaq® Green Master Mix, Promega, Madison, EUA), água estéril (Water, Molecular Biology Grade, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e oligonucleotídeos (Integrate DNA Technologies, IDT, USA). As condições de termociclagem do DNA (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e os oligonucleotídeos iniciadores, que foram selecionados de acordo com os genes pesquisados, são apresentados na Tabela 4.

---

## Material e Métodos

---

A revelação dos produtos da PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen®, Carlsbad, EUA) a 110V por 40 minutos em tampão TBE 0,5x (89 nM Tris-Borato e 2 mM EDTA pH 8.0). Como marcador de peso molecular, foi utilizado DNA *ladder* 100 pares de base (Invitrogen®, Carlsbad, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio e a diferenciação das bandas visualizada sob a luz ultravioleta - 320nm (GelDoc Quantity One; Bio-Rad Laboratories, EUA).

Foram pesquisados os genes codificadores de: **(a)** metalo- $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>); **(b)** oxacilinases (*bla*<sub>OXA23</sub>, *bla*<sub>OXA24</sub>, *bla*<sub>OXA48</sub>, *bla*<sub>OXA51</sub>, *bla*<sub>OXA58</sub>) e **(c)** serino- $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>). Na Tabela 5 estão listadas as cepas controle utilizadas neste estudo.

### 3.3.3 Sequenciamento e interpretação dos resultados

As reações de sequenciamento foram realizadas a partir da purificação dos produtos obtidos nas reações da PCR, utilizando o QIAquick Gel Extraction (Qiagen®, Hilden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi determinada por densidade óptica, em espectrofotômetro digital NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), utilizando 2  $\mu$ L do DNA total purificado. Após a quantificação, aproximadamente 70 ng de DNA foram submetidos à reação preparatória de sequenciamento, utilizando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA).

As reações de sequenciamento foram realizadas no equipamento ABI Prism 3130, Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Perkin Elmer, CA). As sequências de

---

**Material e Métodos**

---

DNA obtidas e as sequências proteicas derivadas foram analisadas utilizando o programa Lasergene Software Package (DNASStar, Madison, EUA) e, então, submetidas à comparação com a base de dados genéticos disponíveis na internet (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

---

## Material e Métodos

**Tabela 4.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes codificadores de β-lactamases.

Tipo de reação de PCR	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' – 3')	Gene alvo	Amplicom (pb)	Condições de termociclagem	Referência
PCR Multiplex Metalo β lactamases	IMP-F1	GAATAGRRTGGCTTAAAYTCTC	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	188	Denaturação: 94°C – 5 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 53°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 30 segundos; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos.	86
	IMP-R1	CCAAACYACTASGTTATC				
	VIM-F2	GTTTGGTTCGCATACGCAAC	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	382		
	VIM-R2	AATGCGCAGCACCAGGATAG				
	SPM-F1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	<i>bla<sub>SPM</sub></i>	798		
	SPM-R1	CCTTTTCCGCGACCTTGATC				
	SIM-F1	GTACAAGGGATTTCGGCATCG	<i>bla<sub>SIM</sub></i>	569		
	SIM-R1	TGGCCTGTTCCCATGTGAG				
	GIM-F1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	<i>bla<sub>GIM</sub></i>	72		
	GIM-R1	CGGAACGACCATTTGAATGG				
	16S-8 F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Controle interno	1000		
	16S-1493 R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT				
PCR Multiplex Oxacilinas	OXA 23-F	GATCGCATTGGAGAACCAGA	<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	501	Denaturação: 94°C – 5 min; Denaturação: 94°C – 25 seg; Anelamento: 52°C – 40 seg; Extensão: 72°C – 50 seg; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 6 min.	176
	OXA 23-R	ATTTCTGACCGCATTTCAT				
	OXA 24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	<i>bla<sub>OXA-24</sub></i>	246		
	OXA 24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT				
	OXA 51-F	TAAAGCTTTGATCGCCCTTG	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	353		
	OXA 51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG				
	OXA 58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	599		
OXA 58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC					



## Material e Métodos

continuação da tabela 4

Tipo de reação de PCR	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' – 3')	Gene alvo	Amplicom (pb)	Condições de termociclagem	Referência
PCR Convencional Oxacilinas	OXA 48-F	TGGGTGGCATCGATTATCGG	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	744	Denaturação: 94°C – 10 min; Denaturação: 94°C – 30 seg; Anelamento: 53°C – 1 min; Extensão: 72°C – 1 min; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 min.	Este estudo
	OXA 48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC				
PCR Convencional Serino β lactamases	SHV-F1	ATGCGTTATTAGTTTCGCTGTGTATTATC	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	1018	Denaturação: 94°C – 5 min; Denaturação: 94°C – 1 min; Anelamento: 61°C – 1 min; Extensão: 72°C – 2 min; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 min.	Este estudo
	SHV-R1	TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC				
	CTX-M-F	CGCTTTGCGATGTGCAG	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	544	Denaturação: 94°C – 10 min; Denaturação: 94°C – 30 seg; Anelamento: 53°C – 1 min; Extensão: 72°C – 1 min; 35 ciclos; Extensão final: 72°C – 10 min.	Este estudo
	CTX-M-R	ACCGCGATATCGTTGGT				
	KPC-F	TCGCTAAACTCGAACAGG	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	893		
	KPC-R	TTACTGCCCCGTTGACGCCCAATCC				
	GES-F	TCACGCACTATTACTGGC	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	900		
	GES-R	TATTTGTCCGTGCTCAGG				
PER-F	CGCTTCTGCTCTGCTGAT	<i>bla</i> <sub>PER</sub>	500			
PER-R	GGCAGCTTCTTTAACGCC					

## Material e Métodos

**Tabela 5.** Cepas controle utilizadas neste estudo para a detecção de genes de resistência, por meio da técnica de PCR.

Cepa e número do banco <sup>a</sup>	Tipo de $\beta$ -lactamase	Classe molecular de Ambler (1980)
<i>P.aeruginosa</i> 234	GES-5	A
<i>P.aeruginosa</i> 285	PER-1	A
<i>K. pneumoniae</i> 6278	CTX-M 2	A
<i>K. pneumoniae</i> HEL2	KPC-2	A
<i>E. coli</i> 282	SHV-5	A
<i>K. pneumoniae</i> 283	OXA-48	A
<i>P.aeruginosa</i> 131	IMP-1	B
<i>P.aeruginosa</i> 225	VIM-2	B
<i>P.aeruginosa</i> 1088	SPM-1	B
<i>A. baumannii</i> 216	OXA-23	D
<i>A. baumannii</i> 245	OXA-25	D
<i>A. baumannii</i> 246	OXA-26	D
<i>A. baumannii</i> 247	OXA-27	D
<i>A. baumannii</i> 172	OXA-51	D
<i>A. baumannii</i> 293	OXA-58	D

<sup>a</sup> Número da amostra referente ao banco de microrganismos do Laboratório Alerta.

### **3.3.4 Quantificação da transcrição gênica**

#### **3.3.4.1 Extração do RNA bacteriano**

As amostras bacterianas foram previamente semeadas em ágar McConkey (Oxoid®; Basingstoke; Inglaterra) e incubadas durante 18 a 20 horas à 35°C ±2°C. No dia seguinte, 3 a 5 colônias foram suspensas em 25 mL de caldo TSB em tubos de polipropileno estéreis, incubadas sob agitação a 36°C, sendo o crescimento monitorado em espectrofotômetro digital (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), até atingir o estágio médio da fase logarítmica de crescimento correspondente a 1,5 a 2,0 unidades de absorbância a um comprimento de onda de 600 nm ( $DO_{600nm} = 0,5 - 0,6$ ). Quando essa absorbância foi atingida, 1 mL do extrato protéico foi ressuspenso em 1 mL de RNA Protect™ Bacteria Reagent (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Depois da centrifugação, o sobrenadante foi aspirado em bomba a vácuo e o sedimento ressuspenso em 100 µL de lisozima (Lysozyme from Chicken Egg White; Sigma, Steinheim Alemanha), sob agitação moderada durante 5 minutos. O substrato obtido foi, então, mantido a -20°C até o seu processamento. A extração do RNA bacteriano foi realizada com auxílio do Kit Rneasy® Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante.

Durante o processo de extração de RNA total as amostras foram tratadas com desoxiribonuclease (DNase) com o objetivo de eliminar a possível contaminação residual com DNA bacteriano. Para essa finalidade, foi utilizado o kit RNase-Free DNase Set, seguindo as recomendações do fabricante (Qiagen®, Hilden, Alemanha).

---

## Material e Métodos

---

O RNA total isolado foi eluído em 30  $\mu\text{L}$  de água DEPC (Diethylpyrocarbonate Treated Water; Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, EUA) e sua concentração determinada em espectrofotômetro digital NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), em contraste com água DEPC, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A quantificação de RNA de cada amostra foi estimada utilizando a correlação de uma unidade de densidade óptica a 260 nm equivalente a 40  $\mu\text{g}$  de RNA por mililitro de solução. A relação entre as unidades de absorbância a 260 e 280 nm ( $A_{260/280}$ ) foi calculada para determinação da pureza da amostra de RNA, considerando valores em torno de 2,0 como aceitáveis.

Adicionalmente, foi realizada, para cada amostra de RNA total, uma PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam uma sequência do DNA ribossomal de eubactérias, com o intuito de confirmar a ausência de resíduos de DNA bacteriano contaminante na solução de RNA. Em fluxo laminar, uma solução-mãe foi preparada contendo *master-mix* (GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix, Promega, Madison, EUA), água estéril (Water, Molecular Biology Grade, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e o par de oligonucleotídeos iniciadores (Integrate DNA Technologies, IDT, USA) que amplificava a sequência do DNA ribossomal 16S-8-F e 16S-1943-R na concentração final de 2 mM de cada oligonucleotídeo. A solução-mãe foi mantida a, aproximadamente, 4°C durante seu preparo e, após leve agitação, 19  $\mu\text{L}$  foi transferido para cada tubo de amplificação, que continha 1  $\mu\text{L}$  da solução de RNA a ser testada. As condições para a amplificação foram: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 53°C por 45 segundos; 72°C por 30 segundos. A etapa de extensão final foi realizada por 10 minutos a 72°C. Após ciclagem, a revelação do produto da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (Ultrapure<sup>™</sup> Agarose, Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, EUA), seguida por visualização sob luz ultravioleta

---

– 320nm (GelDoc Quantity One; Bio-Rad Laboratories, EUA). A ausência de amplificação confirmava a ausência de DNA residual contaminante.

#### **3.3.4.2 Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada por meio da reação de transcriptase reversa utilizando o High-Capacity cDNA Archive Kit, seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Uma reação contendo 5 µg de RNA total da amostra e os reagentes fornecidos pelo kit utilizado que correspondiam a 10 µL de tampão, 4 µL de dNTPs, 10 µL de oligonucleotídeos randômicos, 250 U da enzima transcriptase reversa e água destilada livre de nucleases q.s.p. 50 µL foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguido imediatamente por uma segunda etapa de incubação a 37°C durante 120 minutos. O cDNA, produto da reação de transcriptase reversa, foi armazenado a -20°C até o momento do seu processamento em uma etapa posterior.

#### **3.3.4.3 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)**

A quantificação da transcrição dos genes que codificam componentes dos sistemas de efluxo de *P. aeruginosa* avaliados, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, do gene que codifica a proteína de membrana externa *oprD* e da β-lactamase cromossomal *ampC*, foi realizada pela técnica da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e comparada às respectivas transcrições desses genes na cepa selvagem PA01.

O princípio do método baseia-se na detecção da fluorescência na placa de reação à medida que a dupla fita de DNA é gerada. As sequências de oligonucleotídeos são apresentadas na Tabela 6. As reações de PCR em tempo real

---

## **Material e Métodos**

---

para cada gene avaliado foram feitas em triplicada utilizando a mistura para PCR em tempo real qRT-PCR Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, EUA). Para amplificação dos respectivos genes, foram adicionados 2 µL da solução de cDNA da amostra teste a 12,5 µL da mistura para qRT-PCR, 1 µL de cada par de oligonucleotídeos iniciadores a uma concentração de 10 µM (Integrate DNA Technologies, IDT, USA) e água DEPC q.s.p 25 µL. A qRT-PCR das amostras foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> Realplex4 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As condições de termociclagem foram: 50°C por 2 minutos, seguidos de mais 2 minutos a 95°C; 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C por 30 segundos, de acordo com as recomendações técnicas do fabricante. A curva de desnaturação (“melting curve”) foi determinada no final da termociclagem para certificar a presença de uma única sequência de DNA, resultado da reação de amplificação.

---

**Material e Métodos**


---

**Tabela 6.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de qRT-PCR para os genes alvos *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *oprD* e *ampC* e para o gene de referência *rpsL*.

<b>Genes</b>	<b>Oligonucleotídeos iniciadores</b>	<b>Sequência 5' – 3' <sup>(a)</sup></b>
<i>mexB</i>	mexB-F	GTGTTTCGGCTCGCAGTACTC
	mexB-R	AACCGTCGGGATTGACCTTG
<i>mexD</i>	mexD-F	CGAGCGCTATTCGCTGC
	mexD-R	GGCAGTTGCACGTCGA
<i>mexF</i>	mexF-F	CGCCTGGTCACCGAGGAAGAGT
	mexF-R	TAGTCCATGGCTTGCGGGAAGC
<i>mexY</i>	mexY-F	CCGCTACAACGGCTATCCCT
	mexY-R	AGCGGGATCGACCAGCTTTC
<i>oprD</i>	oprD-F	TCCGCAGGTAGCACTCAGTTC
	oprD-R	AAGCCGGATTCATAGGTGGTG
<i>ampC</i>	ampC-F	CTGTTTCGAGATCGGCTC
	ampC-R	CGGTATAGGTTCGCGAG
<i>rpsL</i>	rpsL-F	GCAAGCGCATGGTCGACAAGA
	rpsL-R	CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA

<sup>(a)</sup>Xavier, 2006 (179)

---

#### 3.3.4.4 Análise da transcrição gênica

O gene ribossomal *rpsL* foi utilizado como gene de referência para normalização da transcrição dos genes alvos. A análise da transcrição foi feita utilizando a planilha qGene e o modelo matemático proposto por Muller e colaboradores (94), onde a expressão normalizada (EN) é calculada de acordo com a fórmula:  $EN = (E_{\text{gene alvo}})^{Ct_{\text{gene alvo}}} / (E_{rpsL})^{Ct_{rpsL}}$ ; onde, E é a eficiência da reação de amplificação para os genes testados; Ct é ciclo em que foi detectado fluorescência durante a amplificação na reação de qRT-PCR, acima do limite basal de fluorescência observada no início na reação.

A eficiência das reações de amplificação dos genes estudados foi determinada de acordo com a fórmula:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ , onde o “slope” representa a inclinação da reta no gráfico da regressão linear das médias dos valores de Ct, observadas nas três reações de qRT-PCR para as diluições seriadas da solução de cDNA da amostra de *P. aeruginosa* PA01. A EN dos genes pelas amostras foi calculada de acordo com os valores de Ct observados nas reações de qRT-PCR, realizadas em triplicata. A média da expressão normalizada (MEN) dos genes foi calculada a partir dos valores de EN dos genes pelas amostras estudadas.

A transcrição relativa dos genes em cada isolado clínico de *P. aeruginosa* foi calculada em relação à cepa selvagem PA01, dividindo a MEN de cada gene, pela MEN dos respectivos genes da amostra referência. Assim, o resultado da transcrição relativa indica quantas vezes um gene é transcrito em uma amostra em relação a transcrição desses mesmos genes na cepa de referência utilizada.

Nas amostras clínicas avaliadas, foram consideradas significativas alterações na transcrição gênica relativa de, no mínimo, duas e quatro vezes para os

---



## Material e Métodos

---

os genes *mexB* e *mexY* e mínimo de 100 vezes para *mexD* e *mexF*, quando comparadas com a transcrição da cepa referência PA01. Para o gene que codifica a  $\beta$ -lactamase cromossomal *ampC*, foram consideradas significativas alterações na transcrição gênica relativa de, no mínimo, dez vezes quando comparadas com a transcrição da cepa referência PA01. Para o gene da proteína de membrana externa *oprD*, foram consideradas significativas a redução de 30% da transcrição dos genes dessa proteína, também quando comparados à transcrição da cepa referência PA01 (134, 142).

---

---

## *4. Resultados*

---

#### **4.1 Amostras bacterianas**

Foram avaliadas 145 amostras de *P. aeruginosa* neste estudo, sendo 84 isolados obtidos no período de janeiro de 2000 a maio de 2002 de pacientes hospitalizados no HSP, e 61 isolados obtidos no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2003, provenientes do MCV. Todos os isolados foram recuperados de hemoculturas de pacientes diagnosticados com infecção de corrente sanguínea (ICS) por esse patógeno, de acordo com os critérios do “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) (47).

#### **4.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) capazes de inibir o crescimento bacteriano em 50% (CIM<sub>50</sub>) e 90% (CIM<sub>90</sub>) e o perfil de sensibilidade das 145 amostras de *P. aeruginosa* estudadas frente aos antimicrobianos testados estão apresentados na Tabela 7.

Apesar da ceftazidima e da cefepima exibirem a mesma potência antimicrobiana (CIM<sub>50</sub>, 8 µg/mL), a cefepima apresentou maior taxa de sensibilidade (66,9%) que a ceftazidima (54,5%) contra os isolados de *P. aeruginosa* avaliados. Entre os carbapenens, imipenem foi duas vezes mais potente (CIM<sub>50</sub>, 2 µg/mL) que o meropenem (CIM<sub>50</sub>, 4 µg/mL), sendo a taxa de sensibilidade igual para os dois antimicrobianos (61,4%).

A gentamicina foi oito vezes mais potente (CIM<sub>50</sub>, 2 µg/mL) que a amicacina (CIM<sub>50</sub>, 16 µg/mL); porém, as taxas de sensibilidade foram semelhantes para os dois antimicrobianos (58,6% e 57,2%, respectivamente). Aztreonam (CIM<sub>50</sub>, 16 µg/mL) e piperacilina/tazobactam (CIM<sub>50</sub>, 16/4 µg/mL) apresentaram a mesma potência *in*

---

## Resultados

*vitro*, mas as taxas de sensibilidade foram maiores para a piperacilina/tazobactam (68,3%) que para o aztreonam (44,1%). A ciprofloxacina apresentou baixa potência antimicrobiana (CIM<sub>50</sub>, 4 µg/mL), sendo também o antimicrobiano que apresentou a menor taxa de sensibilidade (28,3%).

**Tabela 7.** Distribuição da potência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das 145 amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hemoculturas do Hospital São Paulo e do Medical College of Virginia.

Antimicrobiano	CIM <sup>a</sup> (µg/mL)			% por categoria <sup>b</sup>	
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	Sensível	Resistente
Ciprofloxacina	4	>4	0,12 – 4	28,3	60,7
Aztreonam	16	>32	2 – 32	44,1	33,1
Ceftazidima	8	>32	1 – 32	54,5	32,4
Cefepima	8	32	1 – 32	66,9	18,6
Amicacina	16	>64	8 – 64	57,2	34,5
Gentamicina	2	>16	2 – 16	58,6	37,2
Piperacilina/Tazobactam	16/4	256/4	8/4 – 256/4	68,3	31,7
Meropenem	4	32	0,25 – 32	61,4	26,9
Imipenem	2	16	0,25 – 32	61,4	24,1

<sup>a</sup>CIM determinada pela técnica de diluição em ágar, de acordo com as recomendações do CLSI (27).

<sup>b</sup>As porcentagens de sensibilidade e resistência foram determinadas seguindo os parâmetros estabelecidos pelo documento do CLSI, M100-S19 (28).

Analisando os dados separadamente, por procedência das amostras, podemos observar que os isolados do HSP apresentam taxas de sensibilidade

## Resultados

---

menores do que os isolados do MCV, exceto para o antimicrobiano ciprofloxacina. Apesar da potência antimicrobiana desse agente ter sido igual entre os isolados do HSP e do MCV (CIM<sub>50</sub>, 4 µg/mL), 46,6% e 3,3% dos isolados foram sensíveis à ciprofloxacina, respectivamente (Tabela 8).

As cefalosporinas testadas, ceftazidima e cefepima, foram duas vezes mais potentes contra os isolados de *P. aeruginosa* do MCV (CIM<sub>50</sub>, 8 µg/mL e CIM<sub>50</sub>, 4 µg/mL, respectivamente), do que contra os isolados do HSP (CIM<sub>50</sub>, 16 µg/mL e CIM<sub>50</sub>, 8 µg/mL, respectivamente). Os carbapenens, imipenem e meropenem, foram quatro vezes mais potentes (CIM<sub>50</sub>, 1 µg/mL) contra os isolados do MCV, do que contra os isolados do HSP (CIM<sub>50</sub>, 4 µg/mL). As porcentagens de sensibilidade ao meropenem (77,0%) e ao imipenem (75,4%) também foram maiores entre os isolados coletados no MCV que aquelas coletadas no HSP (50,0% e 51,2%, respectivamente).

Aztreonam e piperacilina/tazobactam foram duas vezes mais potentes entre os isolados do MCV (CIM<sub>50</sub>, 8 µg/mL; CIM<sub>50</sub>, 16/4 µg/mL, respectivamente), em relação aos isolados do HSP (CIM<sub>50</sub>, 16 µg/mL; CIM<sub>50</sub>, 32/4 µg/mL, respectivamente).

O único antimicrobiano que apresentou potência *in vitro* maior para os isolados do HSP foi a amicacina (CIM<sub>50</sub>, 8 µg/mL), sendo duas vezes menos potente para os isolados do MCV (CIM<sub>50</sub>, 16 µg/mL). Porém, as taxas de sensibilidade a esse antimicrobiano para os dois grupos de isolados analisados foram semelhantes: 57,1% e 57,4% para os isolados do HSP e do MCV, respectivamente.

---

## Resultados

**Tabela 8.** Distribuição da potência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados nas amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hemoculturas do Hospital São Paulo e do Medical College of Virginia.

Antimicrobiano	Hospital São Paulo (n=84)					Medical College of Virginia (n=61)				
	CIM <sup>a</sup> (µg/mL)			% por categoria <sup>b</sup>		CIM <sup>a</sup> (µg/mL)			% por categoria <sup>b</sup>	
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	S <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	S <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>
Ciprofloxacina	4	>4	0,12 – 4	46,4	51,2	4	>4	0,12 - 4	3,3	73,8
Aztreonam	16	>32	2 – 32	36,9	45,2	8	32	2 - 32	54,1	16,4
Ceftazidima	16	>32	1 – 32	48,8	40,5	8	>32	1 - 32	62,3	21,3
Cefepima	8	32	1 – 32	58,3	21,4	4	32	1 - 32	78,7	14,8
Amicacina	8	>64	8 – 64	57,1	41,7	16	>64	8 - 64	57,4	24,6
Gentamicina	8	16	2 – 16	47,6	50,0	2	16	2 - 16	73,8	19,7
Piperacilina/Tazobactam	32/4	256/4	8/4 – 256/4	60,7	39,3	16/4	256/4	8 /4- 256/4	78,7	21,3
Meropenem	4	32	0,25 – 32	50,0	39,9	1	8	0,25 - 32	77,0	9,8
Imipenem	4	32	0,25 – 32	51,2	27,4	1	16	0,25 - 32	75,4	19,7

<sup>a</sup> CIM determinada pela técnica de diluição em ágar, de acordo com as recomendações do CLSI, M11-A7 (27).

<sup>b</sup> As porcentagens de sensibilidade e resistência foram determinadas seguindo os parâmetros estabelecidos pelo documento do CLSI, M100-S19 (28).

<sup>c</sup> S, porcentagem de sensibilidade; R, porcentagem de resistência.

### **4.3 Caracterização dos mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos**

#### **4.3.1 Teste de hidrólise enzimática**

Entre as 145 amostras de *P. aeruginosa* estudadas, sete (4,82%) apresentaram hidrólise enzimática frente aos carbapenens testados. O EDTA foi capaz de inibir a atividade enzimática do extrato protéico bruto dessas sete amostras contra o imipenem e o meropenem, sugerindo, assim, a produção de MBL.

Todos os isolados que apresentaram hidrólise enzimática para os carbapenens foram procedentes do HSP. Nenhum isolado do MCV apresentou hidrólise enzimática frente a esses antimicrobianos.

#### **4.3.2 Detecção dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos**

##### **4.3.2.1 Detecção de MBL**

A detecção de genes codificadores de MBL foi observada em sete (4,82%) das 145 amostras estudadas. Os isolados produtores dessas enzimas foram os mesmos que apresentaram hidrólise enzimática para os carbapenens, sendo todos procedentes do HSP.

Entre os sete isolados detectados como produtores de MBL, cinco eram produtores da enzima SPM-1 e dois eram produtores da enzima do tipo IMP, IMP-1 e IMP-16. De acordo com os parâmetros estabelecidos pelo CLSI (28), os isolados produtores de SPM-1 eram resistentes a todos os antimicrobianos testados (Tabela Anexo I).

Os dois isolados produtores de IMP-1 e IMP-16 apresentaram perfis de sensibilidade distintos entre si e entre os isolados produtores de SPM-1. O isolado

---

## Resultados

---

produtor de IMP-1 apresentou sensibilidade à amicacina (CIM,  $\leq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ), à gentamicina (CIM, 2  $\mu\text{g/mL}$ ), à ceftazidima (CIM, 8  $\mu\text{g/mL}$ ), e à piperacilina/tazobactam (CIM, 32/4  $\mu\text{g/mL}$ ); sensibilidade reduzida ao aztreonam (CIM, 16  $\mu\text{g/mL}$ ) e à cefepima (CIM, 16  $\mu\text{g/mL}$ ); resistência ao meropenem (CIM, 32  $\mu\text{g/mL}$ ), ao imipenem (CIM, 16  $\mu\text{g/mL}$ ) e à ciprofloxacina (CIM,  $>4$   $\mu\text{g/mL}$ ). O isolado produtor de IMP-16 era sensível somente à piperacilina/tazobactam (CIM, 32/4  $\mu\text{g/mL}$ ) e à amicacina (CIM, 16  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo resistente a todos os outros antimicrobianos testados (Tabela Anexo I).

### 4.3.2.2 Detecção das oxacilinas

Não houve detecção de nenhum gene codificador das oxacilinases *bla*<sub>oxa23</sub>, *bla*<sub>oxa24</sub>, *bla*<sub>oxa48</sub>, *bla*<sub>oxa51</sub>, *bla*<sub>oxa58</sub> nas amostras procedentes do HSP e do MCV.

### 4.3.2.3 Detecção das serino- $\beta$ -lactamases

Não houve detecção dos genes *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>PER</sub> e *bla*<sub>KPC</sub> para os isolados de *P. aeruginosa* procedentes do HSP e do MCV.

O gene da carbapenemase GES-5 foi detectado em apenas um isolado do HSP, correspondendo a 0,69%. Esse isolado apresentou sensibilidade reduzida à ceftazidima (CIM, 16  $\mu\text{g/mL}$ ) e resistência a todos os outros antimicrobianos testados. Entre os isolados do MCV, essa enzima não foi identificada.

### 4.3.2.4 Transcrição dos genes codificadores dos sistemas de efluxo, da $\beta$ -lactamase cromossomal AmpC e da proteína de membrana externa OprD

---



## Resultados

---

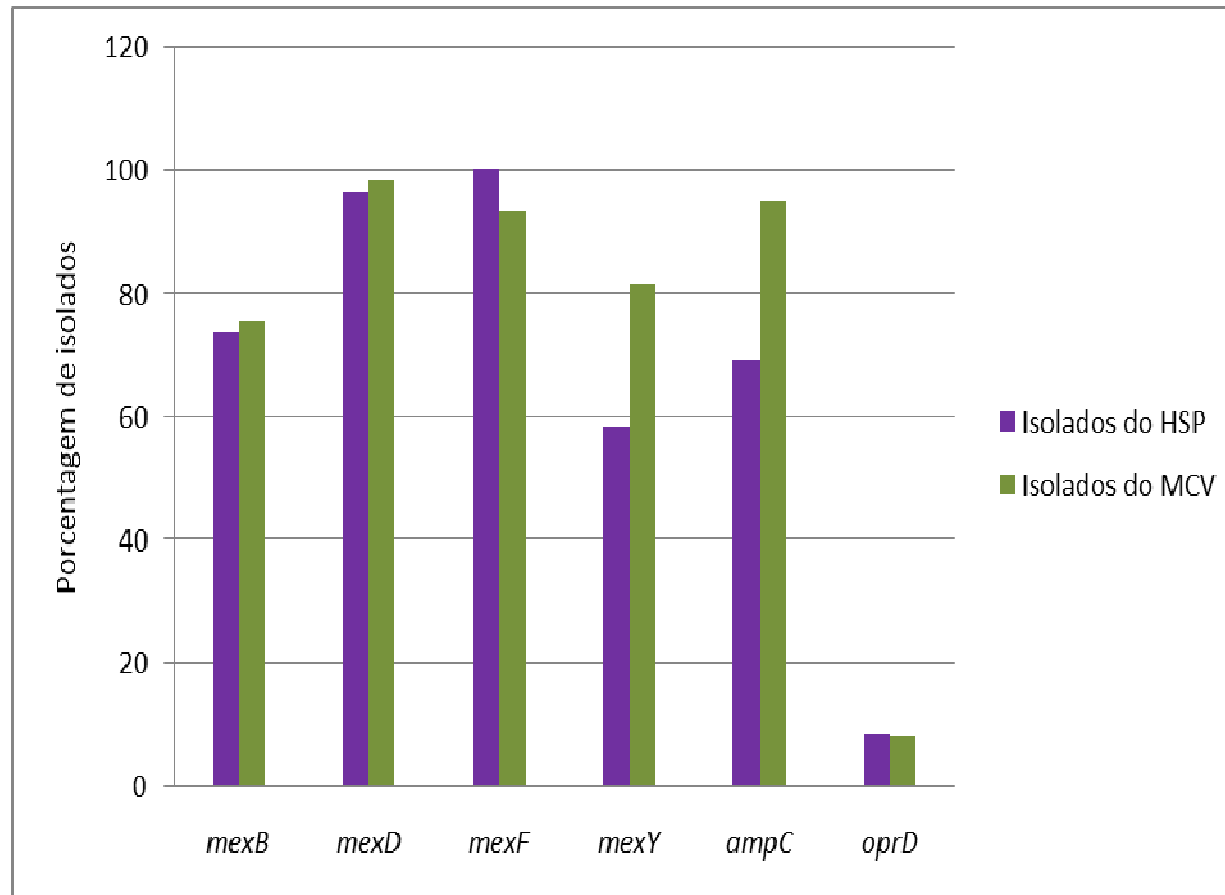
Considerando os parâmetros estabelecidos para identificar a transcrição dos genes codificadores dos sistemas de efluxo avaliados neste estudo (mínimo de duas vezes para *mexB*, mínimo de 100 vezes para *mexD* e *mexF* e mínimo de quatro vezes para *mexY*, em comparação à cepa referência PA01), 62 (73,8%), 81 (96,4%), 84 (100%) e 49 (58,3%) amostras clínicas de *P. aeruginosa* procedentes do HSP, apresentaram transcrição basal para os genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*, codificadores dos sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN e XY, respectivamente. Os genes que codificam a proteína de membrana externa *oprD* e a  $\beta$ -lactamase cromossomal *ampC* apresentaram transcrição basal em sete (8,3%) e em 58 (69,0%) amostras clínicas, respectivamente (Tabela 9).

Os genes codificadores dos sistemas ABM, CDJ, EFN e XY apresentaram transcrição basal em 46 (75,4%), 60 (98,3%), 57 (93,4%) e 50 (81,6%) isolados clínicos procedentes do MCV, respectivamente. O gene *ampC* apresentou transcrição basal em 58 (95,0%) isolados e *oprD* apresentou transcrição basal em cinco (8,1%) isolados (Figura 2).

O aumento da transcrição de, pelo menos, um dos quatro genes que codificam os sistemas de efluxo avaliados foi observada em 60 (71,4%) e 31 (50,8%) isolados de *P. aeruginosa* procedentes de hemoculturas do HSP e do MCV, respectivamente, quando comparados com a transcrição da cepa referência PA01. O aumento da transcrição do gene *ampC* foi observado em 26 (30,9%) e três (5,0%) isolados, e a redução da transcrição de *oprD* em 77 (91,6%) e 56 (91,8%) amostras do HSP e do MCV, respectivamente (Figura 3 e Tabela 9).

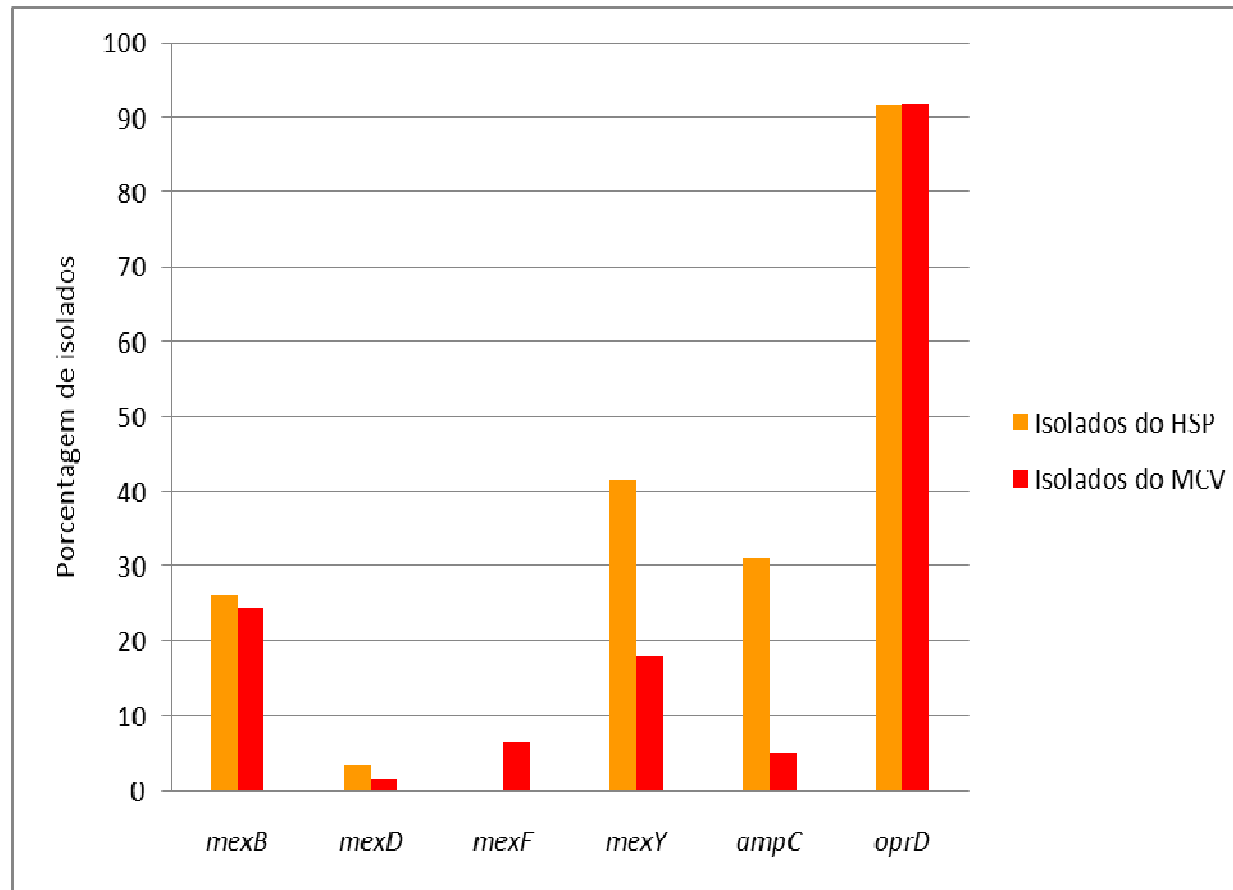
---

## Resultados



**Figura 2.** Porcentagem de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes do HSP e do MCV que apresentaram transcrição basal para os genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*, codificadores dos sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN e XY, respectivamente, e para os genes *ampC* e *oprD*, em comparação com a transcrição na cepa referência PA01.

## Resultados



**Figura 3.** Porcentagem de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes do HSP e do MCV que apresentaram aumento da transcrição dos genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*, codificadores dos sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN e XY, respectivamente, para o gene codificador da  $\beta$ -lactamase cromossomal *ampC* e redução da transcrição do gene *oprD*, em comparação com a transcrição na cepa referência PA01.

## Resultados

**Tabela 9.** Número e porcentagem de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes do Hospital São Paulo e do Medical College of Virginia que apresentaram transcrição basal e alteração da transcrição para os genes codificadores dos sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN e XY, para a  $\beta$ -lactamase cromossomal AmpC e para a proteína de membrana externa OprD.

Gene	Transcrição basal (n / %)		Alteração da transcrição <sup>(a)</sup> (n / %)	
	HSP (n=84)	MCV (n=61)	HSP (n=84)	MCV (n=61)
<i>mexB</i>	62 / 73,8	46 / 75,4	22 / 26,2	15 / 24,6
<i>mexD</i>	81 / 96,4	60 / 98,3	3 / 3,5	1 / 1,6
<i>mexF</i>	84 / 100	57 / 93,4	0 / 0,0	4 / 6,5
<i>mexY</i>	49 / 58,3	50 / 81,6	35 / 41,6	11 / 18,0
<i>ampC</i>	58 / 69,0	58 / 95,0	26 / 30,9	3 / 5,0
<i>oprD</i>	7 / 8,3	5 / 8,1	77 / 91,6	56 / 91,8

<sup>(a)</sup> ABM+: aumento da transcrição do gene *mexB* de, no mínimo, duas vezes, em relação à cepa referência PA01; CDJ+: aumento da transcrição do gene *mexD* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; EFN+: aumento da transcrição do gene *mexF* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; XY+: aumento da transcrição do gene *mexY* de, no mínimo, quatro vezes, em relação à cepa referência PA01; AmpC: aumento da transcrição do gene *ampC* de, no mínimo, dez vezes, em relação à cepa referência PA01; OprD-: redução da transcrição do gene *oprD* de, no mínimo, 30% em relação à cepa referência PA01.

## Resultados

---

A associação de diferentes determinantes de resistência avaliadas neste estudo está apresentada nas Tabelas 10 e 11 para os isolados procedentes do HSP e MCV, respectivamente. Adicionalmente, foi calculada a MODA estatística da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada associação encontrada.

A transcrição do gene *mexY* foi a mais frequente entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* do HSP, sendo o aumento da sua transcrição detectado em 35 amostras (41,6%). Além disso, houve associação do aumento da transcrição de *mexY* com o de outros genes codificadores de sistemas de efluxo, (exceto para o gene *mexF*), com o aumento da transcrição de *ampC* e com a produção de MBLs, sendo observado, também, que o sistema XY foi o mais frequente quando avaliado o número de associações de determinantes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos encontrados (11/12) (Tabela 10).

Entre os sete isolados identificados como produtores de MBLs, cinco apresentaram as seguintes associações com determinantes de resistência: XY+, AmpC+, IMP-1 (isolado 1191); ABM+, XY+, AmpC+, IMP-16 (isolado 1260); XY+, AmpC+, SPM-1 (isolado 1808); XY+, SPM-1 (isolado 2312) e ABM+, XY+, AmpC+, SPM-1 (isolado 2561). Esses isolados apresentaram, também, redução da expressão do gene *oprD*.

O segundo sistema de efluxo mais frequente entre os isolados clínicos do HSP foi ABM, apresentando aumento da transcrição do seu gene, *mexB*, em 22 amostras (26,2%). O aumento da transcrição do gene *mexB* estava associado com o aumento da transcrição dos genes *mexD*, *mexY*, *ampC* e com a produção de MBLs, sendo identificadas sete associações de determinantes de resistência (Tabela 10). Entre os 22 isolados que apresentaram a transcrição de *mexB* aumentada, 18 (81,2%) apresentaram, também, redução da transcrição de *oprD*.

---

## Resultados

---

Somente três isolados (3,5%) do HSP apresentaram aumento da transcrição do gene *mexD*, sendo identificadas três tipos de associações com outros determinantes de resistência e, entre essas amostras, apenas um isolado não apresentou redução da transcrição de *oprD*.

Não foi observado aumento dos níveis transcricionais para *mexF* nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes do HSP.

O gene *ampC*, codificador da  $\beta$ -lactamase cromossomal AmpC, apresentou aumento da sua transcrição em 26 (30,9%) isolados do HSP, de acordo com o parâmetro adotado de transcrição de, no mínimo, 10 vezes, em relação à cepa referência. Nos isolados em que foram detectados os genes de resistência para MBL (SPM-1, IMP-1 e IMP-16), houve também o aumento dos níveis transcricionais do gene *ampC*.

Seis isolados (7,1%) apresentaram aumento da transcrição de *ampC* e redução da transcrição de *oprD*, concomitantemente, não apresentando associação com nenhum outro determinante de resistência. Esses isolados apresentaram aumento da CIM de duas e quatro vezes, em relação à PA01, para cefepima (MODA CIM, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e ceftazidima (MODA CIM, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), respectivamente. Para o imipenem (MODA CIM, 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a MODA da CIM foi menor que a CIM encontrada na cepa referência (CIM, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

A redução da transcrição de *oprD* em pelo menos 30%, em relação à PA01, não associada a nenhum outro determinante de resistência, foi identificada em 31 isolados (37,0%) de *P. aeruginosa* do HSP. A variação da transcrição relativa do gene *oprD* entre esses isolados foi de 0,01 a 0,56 vezes, em relação à cepa referência. De acordo com o cálculo da MODA estatística da CIM, houve aumento de

---

## Resultados

---

duas vezes na CIM para o imipenem (MODA CIM, 2 µg/mL) e de uma vez para o meropenem (MODA CIM, 1 µg/mL) em relação à PA01. Os dois isolados produtores de SPM-1 e o único isolado produtor da enzima GES-5, que não estavam associados ao aumento da transcrição de genes codificadores de efluxo e/ou de AmpC, também apresentaram redução da transcrição de *oprD*. A única associação de determinantes de resistência que não apresentou redução da transcrição de *oprD* foi CDJ+; XY+.

Apenas dois (2,3%) isolados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes do HSP não apresentaram nenhum determinante de resistência entre aqueles avaliados nesse estudo.

## Resultados

**Tabela 10.** Distribuição da moda da CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) e associação de determinantes de resistência identificados nos 84 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes do Hospital São Paulo.

Determinantes de resistência	Número de isolados (redução de oprD)	Moda CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )								
		CIP	AZT	CAZ	CEP	AMI	GEN	PTZ	MER	IMI
PA01 cepa selvagem	0	0,12	4	2	2	4	4	2/4	0,5	1
Isolados sem determinantes de resistência	2 (0)	0,5; >4 <sup>a</sup>	8	2	4	$\leq 8$ ; 32 <sup>a</sup>	$\leq 2$ ; >16 <sup>a</sup>	$\leq 8/4$	2; 4 <sup>a</sup>	1; 4 <sup>a</sup>
XY+	8 (8)	>4	32	32	16	$\leq 8$ ; >64 <sup>a</sup>	>16	128/4	16	8
XY+, AmpC+	8 (8)	>4	32; >32 <sup>a</sup>	32; >32 <sup>a</sup>	16	>64	>16	256/4	16	16
ABM+, XY+	6 (3)	>4	2 - >32 <sup>b</sup>	$\leq 1$	$\leq 1$ ; 8 <sup>a</sup>	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8/4$	1 - 32 <sup>b</sup>	8
AmpC+	6 (6)	0,12; >4 <sup>a</sup>	4; >32 <sup>a</sup>	8	4	$\leq 8$	$\leq 2$	32/4; 256/4 <sup>a</sup>	$\leq 0,25 - 32^b$	0,5
ABM+, XY+, AmpC+	5 (4)	>4	32	32	16	>64	>16	256/4	16	8
ABM+	5 (5)	0,05 - 4 <sup>b</sup>	16	2; 16 <sup>a</sup>	8	$\leq 8$	$\leq 2$	64/4	1	2; 8 <sup>a</sup>
ABM+, AmpC+	2 (2)	0,05; 1 <sup>a</sup>	8	2	2	$\leq 8$	$\leq 2$ ; >16 <sup>a</sup>	$\leq 8/4$	$\leq 0,25$ ; 8 <sup>a</sup>	2; 8 <sup>a</sup>
SPM-1	2 (2)	>4	16; >32 <sup>a</sup>	>32	>32	>64	>16	256/4	>32	32; >32 <sup>a</sup>



## Resultados

continuação da tabela 10

Determinantes de resistência	Número de isolados (redução de oprD)	Moda CIM (µg/mL)								
		CIP	AZT	CAZ	CEP	AMI	GEN	PTZ	MER	IMI
ABM+, XY+, AmpC+, IMP-16	1 (1)	>4	32	>32	>32	16	>16	32/4	>32	16
ABM+; XY+; AmpC+; SPM-1	1(1)	>4	>32	>32	>32	>64	>16	>256	>32	>32
ABM+, CDJ+, XY+, AmpC	1 (1)	0,25	8	4	4	≤8	≤2	≤8/4	0,5	2
ABM+, CDJ+, XY+	1 (1)	1	32	4	8	64	16	16/4	0,25	1
CDJ+, XY+	1 (0)	>4	32	32	16	>64	>16	256/4	8	8
XY+, AmpC+, SPM-1	1 (1)	>4	>32	>32	32	>64	>16	256/4	16	32
XY+, AmpC+, IMP-1	1 (1)	>4	16	8	16	≤8	≤2	32/4	32	16
XY+, SPM-1	1 (1)	>4	8	>32	>32	>64	>16	256/4	>32	>32
GES-5	1 (1)	>4	32	>32	>32	>64	>16	128/4	>32	>32
OprD -	31 (31)	>4	32	2	2; 4	≤8	≤2	≤8/4	1	2

<sup>a</sup> Duas modas observadas.

<sup>b</sup> Não foi observada MODA estatística. Os valores são referentes ao intervalo da CIM.

CIP (ciprofloxacina); AZT (aztreonam); CAZ (ceftazidima); CEP (cefepima); AMI (amicacina); GEN (gentamicina); PPT (piperacilina/tazobactam); MER (meropenem); IMI (imipenem).

ABM+: aumento da transcrição do gene *mexB* de, no mínimo, duas vezes, em relação à cepa referência PA01; CDJ+: aumento da transcrição do gene *mexD* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; EFN+: aumento da transcrição do gene *mexF* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; XY+: aumento da transcrição do gene *mexY* de, no mínimo, quatro vezes, em relação à cepa referência PA01; AmpC: aumento da transcrição do gene *ampC* de, no mínimo, dez vezes, em relação à cepa referência PA01; OprD-: redução da transcrição do gene *oprD* de, no mínimo, 30% em relação à cepa referência PA01.

## Resultados

---

Para as amostras clínicas de *P. aeruginosa* procedentes do MCV, foi observado menor número de isolados que apresentaram aumento dos níveis transcricionais dos genes codificadores dos sistemas de efluxo avaliados. A transcrição aumentada do gene *mexB* foi a mais frequente, sendo identificada em 15 isolados (24,6%) estudados. O aumento da transcrição do gene *mexB* estava associado com o dos genes *mexD*, *mexF*, *mexY* e *ampC*, sendo formada três associações com esses determinantes de resistência (Tabela 11).

O aumento da transcrição de *mexB* e a redução da transcrição de *oprD* foram identificadas concomitantemente em seis isolados. Para estas amostras, cefepima (MODA CIM, 32 µg/mL) e ceftazidima (MODA CIM, 128 µg/mL) apresentaram um aumento de 16 e 64 vezes, respectivamente, em relação à CIM da cepa referência.

A hiperexpressão do sistema XY foi a segunda mais frequente, sendo encontrada em 11 isolados (18,0%). Entre as duas amostras que apresentaram aumento da transcrição de *mexY* isoladamente, somente uma apresentou, também, redução da transcrição de *oprD*.

Os dois sistemas que apresentaram transcrição dos seus genes em menor número de isolados foi EFN (n=4; 6,5%) e CDJ (n=1; 1,6%). A transcrição dos genes *mexF* e *mexD* não foi identificada isoladamente, mas em associação com a de outros mecanismos de resistência aos β-lactâmicos.

A transcrição aumentada do gene *ampC* foi identificada em três isolados (5,0%) e, adicionalmente, esses isolados apresentaram associação somente com a redução da transcrição de *oprD*. Para estes isolados, as cefalosporinas testadas, cefepima (MODA CIM, 8 µg/mL) e ceftazidima (MODA CIM, 32 µg/mL),

---

## Resultados

---

apresentaram um aumento da CIM de quatro e 16 vezes, e o meropenem de oito vezes (MODA CIM, 4 µg/mL), em relação à PA01, respectivamente.

A redução da transcrição de *oprD*, não associada a nenhum outro determinante de resistência pesquisado, foi identificada em 40 isolados (65,5%) de *P. aeruginosa* procedentes do MCV. A variação da transcrição relativa para esse gene foi de 0,00 a 0,66 vezes, em relação à PA01, entre esses isolados. Não foi observada variação da CIM para a cefepima, a ceftazidima e para o imipenem, em relação à CIM da cepa referência. Aztreonam e amicacina apresentaram aumento da CIM de quatro vezes e ciprofloxacina apresentou aumento da CIM de 33 vezes, em relação à PA01.

Apenas um isolado de *P. aeruginosa* do MCV (1,6%) não apresentou nenhum dos determinantes de resistência avaliados nesse estudo.

---

## Resultados

**Tabela 11.** Distribuição da moda da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e associação de determinantes de resistência identificados nos 61 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes do Medical College of Virginia.

Determinantes de resistência	Número de isolados (redução de oprD)	Moda CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )								
		CIP	AZT	CAZ	CEP	AMI	GEN	PTZ	MER	IMI
PA01 cepa selvagem	0	0,12	4	2	2	4	4	2/4	0,5	1
Isolados sem determinantes de resistência	1 (0)	>4	$\leq 2$	8	2	16	$\leq 2$	8	8	16
ABM+	6 (6)	>4	32; 64 <sup>a</sup>	128	32	$\leq 8$	16	$\leq 8/4$	2; 4 <sup>a</sup>	$\leq 0,25$
ABM+, XY+	5 (4)	4; >4 <sup>a</sup>	$\leq 2$	8	8; 32 <sup>a</sup>	32	$\leq 2$	$\leq 8/4 - 256/4^b$	8	16
ABM+, XY+, EFN+	3 (2)	0,25 - 4 <sup>b</sup>	$\leq 2$	2	$\leq 1 - 4^b$	$\leq 8 - >64^b$	$\leq 2$	16/4	$\leq 0,25$	1
ABM+, CDJ+, EFN+, XY+	1 (0)	4	16	2	2	16	$\leq 2$	32/4	$\leq 0,25$	1
XY+	2 (1)	2; >4 <sup>a</sup>	$\leq 2$ ; 16 <sup>a</sup>	8; 128 <sup>a</sup>	8; 16 <sup>a</sup>	64	2; 4 <sup>a</sup>	16/4; 256/4 <sup>a</sup>	16; 32 <sup>a</sup>	16; 32 <sup>a</sup>
AmpC+	3 (3)	2- >4 <sup>b</sup>	16	32	8	32	$\leq 2$	8/4-64/4 <sup>b</sup>	4	2 - 16 <sup>b</sup>
OprD -	40 (40)	4	16	2	2	16	$\leq 2$	$\leq 8/4$	$\leq 0,25$	1

<sup>a</sup> Duas modas observadas.

<sup>b</sup> Não foi observada MODA estatística. Os valores são referentes ao intervalo da CIM.

CIP (ciprofloxacina); AZT (aztreonam); CAZ (ceftazidima); CEP (cefepima); AMI (amicacina); GEN (gentamicina); PPT (piperacilina/tazobactam); MER (meropenem); IMI (imipenem).

ABM+: aumento da transcrição do gene *mexB* de, no mínimo, duas vezes, em relação à cepa referência PA01; CDJ+: aumento da transcrição do gene *mexD* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; EFN+: aumento da transcrição do gene *mexF* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; XY+: aumento da transcrição do gene *mexY* de, no mínimo, quatro vezes, em relação à cepa referência PA01; AmpC: aumento da transcrição do gene *ampC* de, no mínimo, dez vezes, em relação à cepa referência PA01; OprD-: redução da transcrição do gene *oprD* de, no mínimo, 30% em relação à cepa referência PA01.

---

## *5. Discussão*

---

## Discussão

---

As IRAS têm se tornado cada vez mais frequentes em todo o mundo. Estima-se que mais de 250.000 episódios dessas infecções ocorram anualmente nos EUA. Neste contexto, *P. aeruginosa* é um importante agente etiológico, sendo responsável por cerca de 10% de todas as IRAS que ocorrem no ambiente hospitalar (153).

As ICS hospitalares estão diretamente relacionadas ao aumento da mortalidade, especialmente em pacientes gravemente enfermos. As taxas de mortalidade atribuídas às infecções causadas por *P. aeruginosa* são relativamente altas, podendo variar de 18% a 39% (153). Em um estudo multicêntrico realizado recentemente, a mortalidade atribuída às ICS causadas por este patógeno foi de 39% entre todos os isolados avaliados, chegando a 48% quando somente os pacientes hospitalizados em UTIs foram analisados (172). Estas altas taxas podem ser justificadas por vários fatores, como: a sua habilidade em adquirir vários mecanismos de resistência, além daqueles naturalmente expressos, e a vulnerabilidade do hospedeiro comprometido (136, 153). Apesar da multirresistência apresentada por esse patógeno, é difícil mensurar o impacto da resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento das ICS sobre a mortalidade causada por *P. aeruginosa*, pois a relação entre a infecção e o desfecho final do tratamento clínico é complexa (63, 153). Entre os diversos fatores que podem influenciar essa relação estão a idade do paciente, as comorbidades que acometem esses pacientes, a gravidade da doença, o uso prévio de antimicrobianos, a terapia empírica e o tratamento clínico com dispositivos invasivos (63).

Em nosso estudo, foram detectadas taxas de resistência relativamente elevadas para os antimicrobianos usualmente prescritos para o tratamento das infecções causadas por *P. aeruginosa*, especialmente nos isolados procedentes do

---

## Discussão

---

HSP. Esses achados reforçam a dificuldade para a seleção de agentes antimicrobianos efetivos para o tratamento das ICS causadas por esse patógeno.

Foi observada diferenças de uma diluição entre a potência antimicrobiana *in vitro* para alguns dos antimicrobianos testados. Porém, a técnica utilizada para esta determinação permite variações em até uma diluição entre antimicrobianos de mesma classe, pois podem representar uma variação interteste e, não necessariamente, refletem uma diferença da potência *in vitro* entre os agentes testados.

As taxas de sensibilidade encontradas para os isolados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes do MCV são semelhantes àquelas reportadas pelo programa de vigilância MYSTIC ("The Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection"), com exceção da ciprofloxacina (138). Neste estudo, os isolados do MCV apresentaram alta taxa de resistência à ciprofloxacina (73,8%), sendo essa taxa maior quando comparada aos isolados do HSP (51,2%).

As quinolonas são clinicamente utilizadas como agentes terapêuticos e/ou profiláticos contra infecções do trato urinário adquiridas na comunidade. Estes agentes também são importantes no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis causadas por *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*. A ciprofloxacina é frequentemente recomendada para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, principalmente em pacientes com fibrose cística. No entanto, estudos demonstram que cerca de um terço deste patógeno é resistente a este antimicrobiano (183). O aumento do uso das quinolonas talvez possa justificar, em parte, o aumento da resistência à ciprofloxacina entre isolados bacterianos hospitalares e comunitários (51).

---

## Discussão

---

O antimicrobiano piperacilina combinado com o inibidor de  $\beta$ -lactamase tazobactam foi aprovado pela “US Food and Drug Administration” em 1993, sendo utilizado clinicamente contra infecções graves causadas por *P. aeruginosa* (61). Boas taxas de sensibilidade a esse antimicrobiano foram encontradas para os isolados clínicos de *P. aeruginosa* do HSP (60,7%) e do MCV (78,7%). Uma análise recente realizada pelo Programa SENTRY com mais de 25 mil isolados clínicos de *P. aeruginosa*, procedentes dos cinco continentes, demonstrou que as maiores taxas de sensibilidade encontradas para esse antimicrobiano foram observadas na América do Norte (83,0%), especificamente nos EUA, enquanto, na América Latina (74,8%), foi encontrada a menor porcentagem de sensibilidade para esse mesmo antimicrobiano (61). Esses resultados sugerem que piperacilina/tazobactam poderia constituir uma boa opção terapêutica contra infecções causadas por *P. aeruginosa* na maioria das regiões geográficas.

Os agentes  $\beta$ -lactâmicos têm sido utilizados amplamente na prática médica desde a introdução da penicilina na década de 40. As cefalosporinas estão agrupadas em quatro gerações, com base na sua capacidade de ação antibacteriana. Somente as cefalosporinas de terceira e quarta gerações possuem atividade contra *P. aeruginosa* (183). As taxas de sensibilidade da ceftazidima e da cefepima para os isolados de *P. aeruginosa* do HSP (48,8% e 58,3%, respectivamente) e do MCV (62,3% e 78,7%, respectivamente) foram menores em comparação às taxas de sensibilidade para esses mesmos antimicrobianos relatadas pelo Programa SENTRY. Segundo os dados descritos nesse programa, em dez anos, as taxas de sensibilidade para cefepima foram de 82,4% e 62,8% e de ceftazidima foram de 84,8% e 64,6% para os isolados da América do Norte e da América Latina, respectivamente (61).

---



## Discussão

---

Os carbapenens são utilizados para o tratamento de várias infecções causadas por bactérias Gram negativas resistentes às cefalosporinas e a outros agentes  $\beta$ -lactâmicos, devido à estabilidade que esses antimicrobianos apresentam frente a algumas enzimas, como AmpC e ESBLs (190).

As taxas de resistência encontradas para os dois carbapenens testados, entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* do HSP, estão próximas daquelas observadas pelo Programa SENTRY no Brasil (30,2%) (144). Dados desse mesmo programa, publicados recentemente, revelaram que as taxas de resistência na América Latina e na América do Norte são semelhantes às encontradas neste estudo para os isolados brasileiros e americanos, respectivamente (61). Um estudo multicêntrico realizado nos EUA com isolados clínicos de pacientes hospitalizados em UTIs, demonstrou que aproximadamente 80% das amostras avaliadas eram sensíveis ao imipenem (79). Esses achados são semelhantes aos resultados encontrados para os isolados clínicos do MCV, onde a taxa de sensibilidade ao imipenem foi de 75,4%.

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos apresentado pelos isolados estudados demonstrou que existe uma variação, de acordo com a epidemiologia local, quanto ao uso de antimicrobianos. Embora estudos de vigilância globais sejam úteis para delinear padrões de tendência da resistência e, muitas vezes, tenham seus resultados utilizados na ausência de dados locais, o ideal seria a realização de estudos locais para avaliar e orientar quais seriam as melhores opções terapêuticas que poderiam ser utilizadas empiricamente no tratamento de infecções causadas por este patógeno.

Não foi objetivo deste estudo a avaliação da similaridade genética das amostras de *P. aeruginosa* pela técnica de “Pulsed Field Gel Electrophoresis”

---

## Discussão

---

(PFGE). Porém, de acordo com o perfil de sensibilidade, nossos resultados sugerem a existência da disseminação de um clone resistente e que, possivelmente, este seja o responsável pelas elevadas taxas encontradas para os antimicrobianos testados para os dois grupos amostrais (114, 179).

A produção de  $\beta$ -lactamases adquiridas em microrganismos Gram negativos causa um impacto clínico significativo nos serviços de assistência à saúde em todo o mundo. A crescente incidência dessas enzimas e o fato de estarem relacionadas com falhas terapêuticas elevam ainda mais o tempo de hospitalização, os custos e as taxas de mortalidade. Infelizmente, houve um avanço muito pequeno em relação ao desenvolvimento de novos agentes antipseudomonas nas duas últimas décadas, o que agrava ainda mais esse quadro (62, 151).

A produção de MBLs representa um importante mecanismo de resistência aos carbapenens e também a outros agentes  $\beta$ -lactâmicos entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*. A resistência aos carbapenens, meropenem (39,9%) e imipenem (27,4%), observada nas amostras clínicas de *P. aeruginosa* procedentes do HSP pode ser explicada, em parte, pela produção de MBLs, visto que sete isolados foram produtores dessas enzimas (39,9% e 27,4% dos isolados resistentes ao meropenem e imipenem, respectivamente). O teste da hidrólise enzimática aos carbapenens com inibição por EDTA foi capaz de detectar todas as amostras produtoras de MBL, confirmando que essa técnica representa um bom método fenotípico para a triagem de amostras produtoras deste tipo de enzima (166).

A enzima SPM-1 foi a mais prevalente entre as MBLs pesquisadas, sendo encontrada em cinco isolados de *P. aeruginosa*, seguida da enzima IMP-1 (n=1) e IMP-16 (n=1). Os isolados produtores de SPM-1 foram resistentes à todos os antimicrobianos testados e, apesar de apresentar perfis de sensibilidade diferentes

---

## Discussão

---

entre si, os isolados produtores das enzimas IMP-1 e IMP-16 foram resistentes à maioria dos antimicrobianos testados, incluindo os carbapenens (Tabela Anexo I). O aumento do número de isolados de *P. aeruginosa* que apresentam resistência aos carbapenens, especificamente ao imipenem, atribuída à presença de MBL, já foi relatado em 43,9% e 39,1% dos isolados no Brasil e na Itália, respectivamente (159). Em um outro estudo realizado com 183 amostras clínicas de *P. aeruginosa* isoladas no HSP, entre 2000 e 2001, a maior prevalência, entre as MBLs pesquisadas, foi de SPM-1, seguido de VIM-2 e IMP-1 (144). Embora a produção de MBLs esteja sendo descrita com maior frequência em vários países do mundo e entre diferentes bactérias Gram negativas, a enzima SPM-1 permanece disseminada somente no Brasil, com um único clone identificado, até o momento, em *P. aeruginosa*, em diferentes cidades brasileiras (46). Entretanto, esse clone também foi descrito recentemente em um isolado de *P. aeruginosa* recuperado de um paciente que recebeu os primeiros atendimentos em um hospital em Recife, no Brasil, e foi transferido para um hospital suíço (41). As enzimas do tipo IMP são menos frequentes no território brasileiro, sendo identificadas, até o momento, somente em Brasília, São Paulo e Porto Alegre (83, 85, 114, 146).

A identificação de diferentes carbapenemases entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* tem sido cada vez mais frequente. No Brasil, a ocorrência da enzima GES-5 entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* foi relatada em São Luís (MA) e São Paulo (SP) (29, 114). Além de GES-5, também foi descrita, em amostras brasileiras desse mesmo microrganismo, a ESBL do tipo GES-1 em São Paulo e São Luís (19, 29, 114). Neste estudo, a produção da carbapenemase GES-5 foi identificada em apenas um isolado, proveniente do HSP.

---

## Discussão

---

No estudo conduzido por Picão e colaboradores (114) com isolados de *P. aeruginosa* do HSP, produtores da enzima GES-5, esses isolados eram resistentes à todos os  $\beta$ -lactâmicos testados, com exceção do aztreonam. Esses dados são similares aos encontrados no presente estudo, pois o único isolado produtor de GES-5 apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados (Tabela Anexo I). Além disso, a análise da sequência de aminoácidos dos isolados estudados por esse grupo de pesquisadores sugere que, no HSP, o gene *bla*<sub>GES</sub> poderia ter evoluído de forma a aumentar o espectro hidrolítico dessa enzima como resposta à pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar (114).

Várias enzimas do tipo ESBLs e oxacilinasas têm sido descritas em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. No entanto, essas enzimas estão restritas, geralmente, aos seus locais de origem ou a poucos países de outros continentes (170). Esse fato pode explicar das ESBLs do tipo KPC, SHV, PER, CTX-M e oxacilinasas do tipo OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51 e OXA-58 nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes tanto do HSP, quanto do MCV. Além disso, os genes de resistência pesquisados nestas amostras foram aqueles mais frequentemente reportados em *P. aeruginosa*, não sendo excluída a possibilidade da existência de outros genes nestes isolados. Adicionalmente, a aquisição de genes codificadores dessas enzimas é multifatorial e leva em consideração, principalmente, a epidemiologia local, conforme discutido anteriormente. No entanto, as informações sobre a frequência dessas enzimas, principalmente no território brasileiro, podem não ser significativas, pois são disponibilizados somente alguns estudos que envolvem relatos da frequência destes patógenos em um único centro médico ou disseminação de algumas dessas enzimas em centros ou cidades específicas, o que pode não refletir a real distribuição das  $\beta$ -lactamases no território nacional.

---

## Discussão

---

A multirresistência, frequentemente encontrada em isolados clínicos hospitalares de *P. aeruginosa*, pode ser especialmente atribuída à associação de diferentes mecanismos de resistência, como, por exemplo, o efluxo ativo e a redução da permeabilidade da membrana externa. Os sistemas de efluxo expõem uma variedade de antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno, reduzindo a concentração dos mesmos no interior celular. No entanto, pouco se conhece sobre o impacto clínico que esses sistemas podem causar (187).

Até o momento, não existe um critério amplamente aceito que correlacione o aumento dos níveis transcricionais dos genes codificadores dos sistemas de efluxo com a elevação da CIM para os substratos destes sistemas. Desta maneira, nesse estudo, utilizamos os mesmos critérios estabelecidos por grupos de pesquisadores, a saber: aumento da transcrição de no mínimo duas e quatro vezes para os genes *mexB* e *mexY*, mínimo de 100 vezes para *mexD* e *mexF*, em comparação com a cepa referência PA01 (134, 142).

O aumento da transcrição dos genes que codificam os sistemas de efluxo avaliados neste estudo foi mais frequente entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes do HSP (71,4%) em comparação aos isolados do MCV (52,4%), sendo a transcrição de *mexY* (41,6%) e *mexB* (24,6%) as mais frequentemente observadas entre os isolados do HSP e MCV, respectivamente.

O sistema XY é um dos principais responsáveis pela resistência intrínseca, em cepas selvagens de *P. aeruginosa*, em consequência da exposição aos aminoglicosídeos, à eritromicina e à tetraciclina. Além disso, as fluoroquinolonas e a cefepima também são consideradas substratos para esse sistema (151). Entretanto, pouco se conhece sobre a prevalência do sistema XY em isolados clínicos de *P.*

---

## Discussão

---

*aeruginosa* e, adicionalmente, ainda não há publicações relatando a hiperexpressão dos sistemas de efluxo em isolados clínicos brasileiros. No entanto, dados de dois trabalhos os quais avaliaram a transcrição gênica dos principais sistemas de efluxo em São Paulo e no Maranhão, sugerem que os isolados clínicos de *P. aeruginosa* brasileiros comumente hiperexpressam o sistema XY. O estudo realizado no complexo do HSP revelou que o sistema XY foi o mais prevalente entre 60 isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de hemoculturas, enquanto os genes dos sistemas de efluxo mais frequentemente transcritos em 16 isolados clínicos de *P. aeruginosa* avaliados no Maranhão foram *mexB* e *mexY* (30, 179).

Assim como relatado por Xavier (179), a hiperexpressão do sistema ABM (26,2%) foi a segunda mais frequentemente observada entre os isolados do HSP, seguida da hiperexpressão de CDJ (3,5%). Em nosso estudo, nenhum isolado de *P. aeruginosa* do HSP apresentou aumento da transcrição para *mexF* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01. No estudo conduzido por Xavier (179), em apenas um isolado houve a hiperexpressão desse sistema, apresentando, também, sensibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos testados. Isso sugere que o sistema EFN parece não ter relação com o fenótipo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos entre os isolados de *P. aeruginosa* no HSP.

O sistema de efluxo ABM é expresso constitutivamente em cepas selvagens de *P. aeruginosa*. Sua hiperexpressão, porém, em decorrência de mutações no gene repressor *mexR*, pode comprometer a sensibilidade às fluoroquinolonas, às penicilinas, às cefalosporinas, aos inibidores de  $\beta$ -lactamases e ao meropenem, mas não ao imipenem (73). O aumento dos níveis transcricionais de *mexB* foi o mais frequente entre os isolados do MCV (24,6%). Este achado tem sido relatado com frequência em várias localidades do mundo. Em um estudo conduzido na França,

---

## Discussão

---

46% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* que apresentaram redução da sensibilidade à ticarcilina, hiperexpressavam o sistema ABM (191). Em hospitais britânicos, isolados clínicos resistentes às carbenicilinas e que hiperexpressavam o sistema ABM representaram, aproximadamente, 74% dos isolados com resistência aos agentes  $\beta$ -lactâmicos (24). Hocquet e colaboradores (56) observaram que isolados clínicos de *P. aeruginosa* com baixos níveis de sensibilidade à ciprofloxacina, apresentavam a hiperexpressão do sistema ABM. Esses achados podem explicar, parcialmente, as elevadas taxas de resistência (73,8%) encontradas para esse antimicrobiano entre os isolados clínicos procedentes do MCV. O fato da maioria dessas amostras apresentarem elevado grau de resistência à ciprofloxacina, sugere, também, a presença de mutações nas regiões de determinantes de resistência às quinolonas dos genes *gyrA* e *parC*. A avaliação da resistência às fluoroquinolonas em isolados de *P. aeruginosa* recuperados de diferentes sítios corpóreos de pacientes com fibrose cística em um hospital dinamarquês, demonstrou que a coexpressão dos sistemas CDJ e EFN estava associada a isolados recuperados de infecções pulmonares, enquanto as mutações nos genes *gyrA* e *parC* foram mais frequentemente encontradas em isolados clínicos dessa mesma bactéria recuperados do trato urinário e de feridas (59). No entanto, é muito provável que no Brasil não haja relação entre os mecanismos de resistência e o sítio corpóreo onde esses determinantes foram recuperados, devido à existência da disseminação de clones carreadores de genes de resistência entre pacientes dentro de uma mesma unidade hospitalar.

Em condições hospitalares, onde a pressão seletiva é alta devido ao elevado uso de antimicrobianos de amplo espectro, os sistemas de efluxo podem agir sinergicamente com outros mecanismos de resistência. Nesse estudo, também foi

---

## Discussão

---

avaliada a expressão de diferentes determinantes de resistência simultaneamente em uma mesma amostra. Esses determinantes de resistência são, em sua maioria, intrínsecos, reforçando o fato de que, pela pressão seletiva ao uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar, *P. aeruginosa* pode se adaptar facilmente à essas condições adversas por meio de mutações cromossômicas e não, necessariamente, pela aquisição de elementos genéticos móveis (56).

O aumento dos níveis transcricionais de diferentes genes codificadores dos sistemas de efluxo com outros mecanismos de resistência também tem sido descrita na literatura. Essa coexpressão amplia os substratos utilizados pelas bombas, em comparação com a hiperexpressão de um sistema isolado (73). Um estudo francês identificou isolados que hiperexpressavam concomitantemente os sistemas ABM e XY, sendo essa expressão 2 a 34 vezes e 22 a 312 vezes, respectivamente, maior que a expressão observada em PA01. Os isolados que coexpressavam esses dois sistemas apresentaram CIMs mais elevadas para cefepima que os mutantes que hiperexpressaram somente os sistemas ABM ou XY (77).

Nossos resultados demonstram, também, a associação de sistemas de efluxo com MBLs. Essa associação pode explicar as elevadas taxas de resistência encontrada para as cefalosporinas e os carbapenens testados, entre os isolados de *P. aeruginosa* recuperados do HSP. Até o momento, não há descrições na literatura sobre a associação de sistemas de efluxo com enzimas do tipo MBLs. Porém, dados de um trabalho realizado com amostras de *P. aeruginosa* isoladas no HSP, em 2005, demonstram associação entre o aumento dos níveis transcricionais de genes que codificam sistemas de efluxo com a produção de SPM-1, IMP-1, GES-1, GES-5 e CTX-M-2 (179). Amostras clínicas de *P. aeruginosa* isoladas em um hospital francês, apresentaram, além da hiperexpressão de efluxo, a hiperexpressão de *ampC* e a

---



## Discussão

---

presença das penicilinas PSE-1 e TEM-2 (56). Em um estudo espanhol, isolados de *P. aeruginosa* com fenótipo de sensibilidade à ceftazidima e resistência à cefepima, apresentaram hiperexpressão de XY, associada à produção de PSE-1 (111).

A redução da transcrição de *oprD* e o aumento da transcrição de *ampC* representam importantes mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. A contribuição de AmpC para a resistência aos carbapenens parece ser mínima, provavelmente em decorrência da estabilidade desses antimicrobianos à maioria das  $\beta$ -lactamases (131). No entanto, já foram identificadas variantes de AmpC em *P. aeruginosa* cujo espectro hidrolítico inclui o imipenem (141).

Tem sido descrito na literatura que o aumento da transcrição de *ampC* associada à redução da transcrição de *oprD* parece afetar, principalmente, o imipenem, apresentando pouco efeito contra o meropenem (74). A redução da transcrição de *oprD* entre os isolados do HSP e do MCV foi alta, com porcentagens de 91,6% e 91,8%, respectivamente. Alguns estudos indicam que a regulação do gene *oprD* por si só seria o suficiente para elevar as CIMs do imipenem. No entanto, foi observado a redução da transcrição de *oprD* em isolados clínicos de *P. aeruginosa* que apresentavam diferentes níveis de resistência tanto ao imipenem, quanto ao meropenem (74). Outros estudos mostram que os níveis de transcrição do gene *oprD*, às vezes, não estão correlacionados à resistência ao imipenem. Por outro lado, a perda ou redução da transcrição do gene *oprD*, associado, também, à hiperexpressão de diferentes sistemas de efluxo, contribui significativamente para o aumento das CIMs dos carbapenens, especialmente do imipenem (134, 190). Em contrapartida, estudos demonstram que a perda da porina OprD em isolados clínicos com exposição prévia às fluoroquinolonas pode estar associada com o aumento da

---

## Discussão

---

CIM para a ciprofloxacina, a carbenicilina e a ceftazidima, mas não para o imipenem (190). Esta discordância entre os diferentes estudos pode ser consequência da associação de diferentes níveis de expressão dos diferentes sistemas de efluxo com a redução da expressão ou mesmo da perda da porina OprD, o que reflete a complexidade dos mecanismos de regulação e dificulta a compreensão do papel destes mecanismos cromossomais de resistência em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

O gene *ampC* apresenta expressão basal em cepas selvagens de *P. aeruginosa*, podendo a sua expressão ser induzida a altos níveis na presença de  $\beta$ -lactâmicos. Nos isolados estudados, o aumento da transcrição desse gene foi mais frequente para as amostras do HSP (30,9%), que as amostras do MCV (5,0%). Esses achados podem explicar, parcialmente, as altas taxas de resistência encontradas para a ceftazidima entre os isolados do HSP, em comparação ao outro grupo de isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Mutantes resistentes de *P. aeruginosa* que produzem altos níveis de AmpC estão, frequentemente, associados à falha terapêutica, quando cefalosporinas de amplo espectro são utilizadas (155). Em um estudo conduzido em um hospital americano, foi observado que 18,4% dos isolados de *P. aeruginosa* recuperados de hemoculturas apresentavam aumento dos níveis transcricionais desse gene. Além disso, os resultados desse estudo evidenciaram que a resistência à ceftazidima estava frequentemente associada ao aumento da transcrição de *ampC* (156).

No presente estudo, objetivamos avaliar os diferentes mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em amostras clínicas de *P. aeruginosa* coletadas de dois hospitais, um localizado no Brasil e o outro nos EUA. A coleta desses isolados foi realizada em diferentes períodos, pois, essas duas coleções fizeram parte de um

---

## Discussão

---

estudo anterior (dados ainda não publicados), o qual tinha como objetivo a avaliação clínico-epidemiológica das ICS causadas por esse microrganismo. Embora a coleta desses isolados seja datada de, no mínimo, dez anos, foi possível observar que o perfil e os mecanismos os quais podem levar a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos estavam presentes no passado e ainda constituem importantes mecanismos na atualidade (114, 179). Entretanto, não foi possível correlacionar o aumento da CIM, representada pela MODA estatística, com os determinantes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos encontrados nas amostras estudadas. A MODA estatística é o valor que detém o maior número de observações, ou seja, o valor ou os valores mais frequentemente encontrados em um conjunto avaliado. No entanto, a MODA estatística não é, necessariamente, única, podendo ocorrer mais de uma MODA para uma mesma variável analisada. O fato das amostras terem sido coletadas em períodos diferentes e possuir um número amostral diferente entre os dois hospitais avaliados também pode ter sido um fator limitante deste estudo.

Até o momento, foram descritos 12 sistemas de efluxo da família RND em *P. aeruginosa*; porém, nos detemos somente à pesquisa dos quatro sistemas que se encontram caracterizados na literatura e que, possivelmente, teriam importância clínica. Porém, não é possível afirmar que não exista a hiperexpressão de outros sistemas de efluxo, os quais não foram pesquisados nos isolados avaliados. Adicionalmente, os critérios adotados para a interpretação dos resultados da qRT-PCR avaliam os níveis transcricionais dos genes que codificam os sistemas de efluxo, a  $\beta$ -lactamase cromossomal AmpC e a porina de membrana externa OprD, e não necessariamente estão relacionados aos níveis de expressão da proteína em questão, comprometendo o estudo do significado clínico desses mecanismos de resistência. Fica evidente, então, a necessidade de uma revisão das metodologias

---

## Discussão

---

atualmente aplicadas a esses estudos e, também, o estabelecimento de critérios que sejam aceitos universalmente para a detecção do aumento dos níveis transcricionais gênicos que codificam de sistemas de efluxo em isolados clínicos. Isso auxiliará tanto na compreensão desses mecanismos, na determinação da epidemiologia desses patógenos no ambiente hospitalar e na adequação da terapia antimicrobiana.

A existência de múltiplos mecanismos de resistência em um único isolado bacteriano, como observado na maioria das amostras estudadas, restringe as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento e dificulta a implantação de medidas eficazes que possam diminuir o aparecimento e a disseminação de clones resistentes no ambiente hospitalar. Adicionalmente, não existem relatos do desenvolvimento de novos antimicrobianos que possam agir contra isolados clínicos de *P. aeruginosa*, principalmente aqueles produtores de MBLs. No entanto, o desenvolvimento de um composto que atue como um inibidor de MBLs (IMBLs), assim como um outro que atue como inibidor de bombas de efluxo (EPI, por “efflux pump inhibitor”) e que possa ser utilizado clinicamente, tem sido de grande interesse da indústria farmacêutica nos últimos anos, sendo uma alternativa para o tratamento de bactérias Gram negativas multirresistentes (8, 104). A dificuldade em desenvolver um composto que atue como um IMBLs se deve a vários fatores, descritos a seguir: **(i)** essas enzimas possuem uma variação sutil, porém significativa, na arquitetura do seu sítio alvo, dificultando o desenho de um único inibidor eficaz contra todas as MBLs adquiridas; **(ii)** diferentemente do ácido clavulânico, que forma ligações covalentes estáveis com as serino- $\beta$ -lactamases, as MBLs e seus inibidores formam ligações muito instáveis e, **(iii)** o sucesso clínico do ácido clavulânico se deve ao fato desse composto não possuir nenhum alvo homólogo em células mamíferas. Em contrapartida, as MBLs possuem o sítio ativo similar ao das enzimas essenciais para

---

## Discussão

---

o funcionamento celular em mamíferos, tornando os IMBLs compostos tóxicos para as células humanas (8, 168). O desenvolvimento de um EPI, por sua vez, poderia agir de forma mais ampla, restaurando a ação antibacteriana das fluoroquinolonas e, possivelmente, de outros agentes, como os carbapenens e os aminoglicosídeos. Entretanto, esses compostos não são disponíveis para o uso clínico devido a fatores semelhantes aos dos IMBLs, como a elevada toxicidade e a sua baixa estabilidade molecular (104).

O aumento dos níveis transcricionais dos genes que codificam sistemas de efluxo e/ou a redução da transcrição de *oprD* contribuem para o aumento das CIMs dos  $\beta$ -lactâmicos, embora a associação desses mecanismos com a produção de  $\beta$ -lactamases seja mais significativa para o aumento das CIMs. É provável que a hiperexpressão de sistemas de efluxo e a perda da porina OprD possam favorecer a sobrevivência da *P. aeruginosa* sob pressão seletiva, aumentando, assim, a chance de adquirir outros determinantes de resistência aos agentes  $\beta$ -lactâmicos no ambiente hospitalar e contribuindo para o surgimento de cepas altamente resistentes a esta classe de antimicrobianos.

---

---

## *6. Conclusão*

---

## Conclusão

---

- Os isolados de *P. aeruginosa* procedentes do HSP apresentaram taxas de resistência aos antimicrobianos testados superiores àquelas dos isolados procedentes do MCV, exceto para a ciprofloxacina.

- A redução da transcrição do gene *oprD* foi um mecanismo frequente entre os isolados dos dois hospitais avaliados. A associação da redução da transcrição deste gene com outros determinantes de resistência pesquisados neste estudo, poderia explicar, parcialmente, as taxas de resistência relativamente elevadas encontradas para os carbapenens, principalmente para o imipenem, em ambos hospitais.

- A hiperexpressão do gene *ampC* foi maior entre os isolados do HSP. Isso poderia justificar, parcialmente, a elevada taxa de resistência encontrada para a ceftazidima entre os isolados deste hospital.

- A produção de enzimas do tipo MBLs foi um mecanismo frequente entre os isolados brasileiros, sendo identificadas as enzimas SPM-1, IMP-1 e IMP-16. Adicionalmente, a carbapenemase GES-5 também foi identificada em apenas um isolado do HSP.

- Entre os isolados do MCV, não foi observada a produção de metalo- $\beta$ -lactamases ou outras carbapenemases, entre aquelas pesquisadas neste estudo.

- O aumento da transcrição dos genes codificadores dos sistemas de efluxo pesquisados foi mais frequente entre os isolados do HSP. O gene *mexY* foi mais frequentemente transcrito nos isolados do HSP, enquanto o gene *mexB* foi mais frequentemente transcrito entre os isolados do MCV.

- A associação dos diferentes determinantes de resistência pesquisados neste estudo foi maior entre os isolados do HSP.

---

**Conclusão**

---

- A diferença entre o perfil de sensibilidade e os mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos detectados entre os isolados de *P. aeruginosa* estudados provavelmente reflete a epidemiologia local, quanto ao uso de antimicrobianos, e as políticas de controle das IRAS.

---



---

## *7. Referências Bibliográficas*

---

- 
1. Akpaka PE, WH Swanston, HN Ihemere, A Correa, JA Torres, JD Tafur, MC Montealegre, JP Quinn, MV Villegas. 2009. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol.* **47**(8): 2670-2671.
  2. al Naiemi N, B Duim, A Bart. 2006. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol.* **55**(Pt11): 1607-1608.
  3. Ambler RP. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **289**(1036): 321-331.
  4. Aubert D, D Girlich, T Naas, S Nagarajan, P Nordmann. 2004. Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum beta-lactamase *bla*<sub>VEB</sub> gene from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained in India. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(9): 3284-3290.
  5. Bae IK, YN Lee, SH Jeong, SG Hong, JH Lee, SH Lee, HJ Kim, H Youn. 2007. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **58**(4): 465-468.
  6. Bauernfeind A, H Grimm, S Schweighart. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* **18**(5): 294-298.
  7. Bauernfeind A, I Stemplinger, R Jungwirth, P Mangold, S Amann, E Akalin, O Ang, C Bal, JM Casellas. 1996. Characterization of beta-lactamase gene *bla*<sub>PER-2</sub>, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**(3): 616-620.
  8. Bebrone C. 2007. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochim Pharmacol.* **74**(12): 1686-1701.
  9. Bennett JW, ML Herrera, JS Lewis, BW Wickes, JH Jorgensen. 2009. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(1): 292-294.
  10. Bert F, D Vanjak, V Leflon-Guibout, S Mrejen, S Delpierre, A Redondo, MH Nicolas-Chanoine. 2007. IMP-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a French patient repatriated from Malaysia: impact of early detection and control measures. *Clin Infect Dis.* **44**(5): 764-765.
  11. Blondel-Hill E, DA Henry, DP Speert. *Pseudomonas*. In: Murray PR, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Tenover, MA Tenover. 2007 *Manual of Clinical Microbiology*. vol 1. Washington: ASM Press. **9**:734-748.
  12. Bogaerts P, C Bauraiug, A Deplano, Y Glupczynsk. 2007. Emergence and dissemination of BEL-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(4): 1584-1585.
  13. Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(1): 1-14.
  14. Bradford PA. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* **14**(4): 933-951.
-

- 
- 15. Bush K, GA Jacoby, AA Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**(6): 1211-1233.
- 16. Caille O, C Rossier, K Perron.** 2007. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **189**(13): 4561–4568.
- 17. Carrer A, L Poirel, JD Pitout, D Church, P Nordmann.** 2008. Occurrence of an SME-2-producing *Serratia marcescens* isolates in Canada. *Int J Antimicrob Agents.* **31**(2): 181-182.
- 18. Carvalho AP, RM Albano, DN Oliveira, DA Cidade, LM Teixeira, EA Marques.** 2006. 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.* **12**(2): 103-108.
- 19. Castanheira M, RE Mendes, TR Walsh, AC Gales, RN Jones.** 2004a. Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(6): 2344-2345.
- 20. Castanheira M, MA Toleman, RN Jones, FJ Schmidt, TR Walsh.** 2004b. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(12): 4654-4661.
- 21. Castanheira M, JM Bell, JD Turnidge, D Mathai, RN Jones.** 2009. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(3): 1225-1227.
- 22. Celenza G, C Pellegrini, M Caccamo, B Segatore, G Amicosante, M Perilli.** 2006. Spread of *bla*<sub>CTX-M</sub>-type and *bla*<sub>PER-2</sub> beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* **57**(5): 975-978.
- 23. Chanawong A, FH M'Zali, J Heritage, A Lulitanond, PM Hawkey.** 2001. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum B-lactamases in gram negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* **48**(6): 924-925.
- 24. Chen HY, M Yuan, DM Livermore.** 1995. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol.* **43**(4): 300-309.
- 25. Cipriano R, VV Vieira, EL Fonseca, K Rangel, FS Freitas, AC Vicente.** 2007. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the *bla*<sub>SPM</sub> clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. *Microb Drug Resist.* **13**(2): 142-146.
- 26. Claeys G, G Verschraegen, T Baere, M Vaneechoutte.** 2000. PER-1 beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* **45**(6): 924-925.
- 27. Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Seventh Edition (M11-A7). Wayne, PA.
-

- 
- 28. Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19<sup>th</sup> Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards (M100-S19). Wayne, PA.
- 29. da Fonseca, EL, VV Vieira, R Cipriano, AC Vicente.** 2007. Emergence of *bla*<sub>GES-5</sub> in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. J Antimicrob Chemother. **59**(3): 576-577.
- 30. da Fonseca.** 2009. Expressão de genes de resistência intrínsecos e adquiridos em *Pseudomonas aeruginosa* e funcionalidade de cassetes gênicos associados a integrons classe 1. Tese (Doutorado). Pós graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 160fls.
- 31. Danel F, LM Hall, D Gur, DM Livermore.** 1997. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. Antimicrob Agents Chemother. **41**(4): 785-790.
- 32. David M, JF Lemeland, S Boyer.** 2008. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: about 24 cases at Rouen University Hospital. Pathol Biol. **56**(7-8): 429-434.
- 33. Diekema DJ, MA Pfaller, RN Jones, GV Doern, PL Winokur, AC Gales, HS Sader, K Kugler, M Beach.** 1999. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997. Clin Infect Dis. **29**(3): 595-607.
- 34. Docquier JD, F Luzzaro, G Amicosante, A Toniolo, GM Rossolini.** 2001. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. Emerg Infect Dis. **7**(5): 910-911.
- 35. Docquier JD, ML Riccio, C Mugnaioli, F Luzzaro, A Endimiani, A Toniolo, G Amicosante, GM Rossolini.** 2003. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. **47**(5): 1522-1528.
- 36. Doumith M, M Warner, M Weinbren, DM Livermore, N Woodford.** 2009. Dissemination of a novel metallo-β-lactamase, NDM-1 (MIM-1) in diverse Enterobacteriaceae in the UK. 49<sup>th</sup> Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco - CA, USA. Setembro 12-15, 2009. Poster C1-058.
- 37. Dropa M, LC Balsalobre, N Lincopan, EM Mamizuka, VC Cassettari, GR Matte, MH Matté.** 2009. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants *bla*<sub>SHV-40</sub>, *bla*<sub>TEM-116</sub> and the class 1 integron-associated *bla*<sub>GES-7</sub> in Brazil. Clin Microbiol Infect. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02944.x
- 38. Dubois V, C Arpin, P Noury, C Andre, L Coulangue, C Quentin.** 2005. Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and enterobacteria in a nursing home. J Clin Microbiol. **43**(8): 4129-4138.
- 39. Duljasz W, M Gniadkowski, S Sitter, A Wojna, C Jebelean.** 2009. First organisms with acquired metallo-beta-lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. Antimicrob Agents Chemother. **53**(5): 2221-2222.
- 40. El Salabi A, M Tolenam, TR Walsh.** 2009. Novel subclass of a group B1 metallo-β-lactamase, TMB-1, in clinical and non-clinical Gram-negative bacteria from Libya. 49<sup>th</sup>
-

---

Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco - CA, USA. Setembro 12-15, 2009. Poster C1-1365.

**41. El Salabi A, MA Toleman, J Week, T Bruderer, R Frei, TR Walsh.** 2010. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(1): 582.

**42. Empel J, K Filczak, A Mrowka, W Hryniewicz, DM Livermore, M Gniadkowski.** 2007. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol.* **45**(9): 2829-2834.

**43. Erac B & Z Gulay.** 2007. Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum beta-lactamase among gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. *Folia Microbiol.* **52**(5): 535-541.

**44. Evans JC & H Segal.** 2007. A novel insertion sequence, ISPA26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(10): 3776–3777.

**45. Gales AC, RN Jones, J Turnidge, R Rennie, R Ramphal.** 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* **32**(Suppl 2): 146-155.

**46. Gales AC, LC Menezes, S Silbert, HS Sader.** 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* **52**(4): 699-702.

**47. Garnes JS, WR Jarvis, TB Emori, TC Horan, JM Hughes.** 1988. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control.* **16**(3): 128-140.

**48. Garza-Ramos U, P Tinoco, J Silva-Sanchez, R Morfin-Otero, E Rodriguez-Noriega, G Leon-Garnica, HS Sader, RN Jones.** 2008. Metallo-beta-lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (*In96*) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *Int J Antimicrob Agents* **31**(1): 78-80.

**49. Giakkoupi P, LS Tzouveleakis, A Tsakris, V Loukova, D Sofianou, E Tzelepi.** 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(9): 2247-2253.

**50. Girlich D, T Naas, A Leelaporn, L Poirel, M Fennewald, P Nordmann.** 2002. Nosocomial spread of the integron-located VEB-1-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis.* **34**(5): 603-611.

**51. Goossens H, M Ferech, RV Stichele, M Elseviers, the ESAC Project Group.** 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet.* **365**: 579-587.

**52. Hancock RE & FS Brinkman.** 2002. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol.* **56**: 17-38.

**53. Higgins PG, L Poirel, M Lehmann, P Nordmann, H Seifert.** 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(12): 5035-5038.

---

- 
- 54. Hirakata Y, T Yamaguchi, H Takemura, H Tanaka, R Yoshida, J Matsuda, M Nakano, K Tomono, S Maesaki, M Kaku, Y Yamada, S Kamihira, S Kohno.** 1998. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*<sub>IMP</sub>. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**(8): 2006-2011.
- 55. Hocquet D, P Nordmann, F Garch, L Cabanne, P Plesiat.** 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(4): 1347-1351.
- 56. Hocquet D, P Berthelot, M Roussel-Delvallez, R Favre, K Jeannot, O Bajolet, N Marty, F Grattard, P Mariani-Kurkdjian, E Bingen, MO Husson, G Couetdic, P Plésiant.** 2007. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(10): 3531-3536.
- 57. Iyobe S, H Kusadokoro, A Takahashi, S Yomoda, T Okubo, A Nakamura, K O'Hara.** 2002. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**(6): 2014-2016.
- 58. Jacoby GA.** 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **22**(1): 161-182.
- 59. Jalal S, O Ciofu, N Hoiby, N Gotoh, B Wretling.** 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(3): 710-712.
- 60. Jiang X, Z Zhang, M Li, D Zhou, F Ruan, Y Lu.** 2006. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(9): 2990-2995.
- 61. Jones RN, MG Stilwell, PR Rhomberg, HS Sader.** 2009. Antipseudomonal activity of piperacillin/tazobactam: more than a decade of experience from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2007). *Diag Microbiol Infect Dis.* **65**(3): 331-334.
- 62. Juan C, X Mulet, L Zamorano, S Alberti, JL Perez, A Oliver.** 2009. Detection of the novel Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) OXA-143 from a plasmid-located integron in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(12): 5288-5290.
- 63. Klevens RM, JR Edwards, RP Gaynes, the National Nosocomial Infections Surveillance Systems.** 2008. The impact of antimicrobial-resistance, health care-associated infections on mortality in the United States. *Clin Infect Dis.* **47**(7): 927-930.
- 64. Koh TH, K Yamaguchi, Y Ishii.** 2008. Characterization of the metallo-beta-lactamase VIM-6 and its genetic support. *Int J Antimicrob Agents.* **32**(5): 446-449.
- 65. Kohler T, M Michea-Hamzhepour, U Henz, N Gotoh, LK Curty, JC Pechere.** 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **23**(2): 345-354.
- 66. Kohler T, SF Epp, LK Curty, JC Pechere.** 1999. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **181**(20): 1331-1333.
-

- 
- 67. Kotsakis SD, CC Papagiannitsis, E Tzelepi, NJ Legakis, V Miriagou, LS Tzouveleakis.** 2010. GES-13, a lactamase variant 1 possessing Lys-104 and 2 Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(3): 1331-1333.
- 68. Kumar A & HP Schweizer.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* **57**(10): 1486-1513.
- 69. Lauretti L, ML Riccio, A Mazzariol, G Cornaglia, G Amicosante, R Fontana, GM Rossolini.** 1999. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integronborne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**(7): 1584-1590.
- 70. Lee K, JH Yum, D Yong, HM Lee, HD Kim, JD Docquier, GM Rossolini, Y Chong.** 2005. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla<sub>SIM-1</sub>*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**(11): 4485-4491.
- 71. Li XZ, N Barre, K Poole.** 2000a. Influence of MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexEMexF-OprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* **46**(6): 885–893.
- 72. Li XZ, Zhang L, Poole K.** 2000b. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* **45**(4): 433-436.
- 73. Lister PD, DJ Wolter, ND Hanson.** 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* **22**(4): 582-610.
- 74. Livermore DM.** 1992. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**(9): 2046-2048.
- 75. Livermore DM.** 1995. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* **8**(4): 557-584.
- 76. Livermore DM & N Woodford.** 2006. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* **14**(9): 413-420.
- 77. Llanes C, D Hocquet, C Vogne, D Benali-Baitich, C Neuwirth, P Plésiat.** 2004. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAb-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(5): 1797-1802.
- 78. Llanes C, C Neuwirth, F El Garch, D Hocquet, P Plesiat.** 2006. Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect.* **12**(3): 270-278.
- 79. Lockhart SR, MA Abramson, SE Beekmann, G Gallagher, S Riedel, DJ Diekema, JP Quinn, GV Doern.** 2007. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol.* **45**(10): 3352-3359.
- 80. Luzzaro F, E Mantengoli, M Perilli, G Lombardi, V Orlandi, A Orsatti, G Amicosante, GM Rossolini, A Toniolo.** 2001. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol.* **39**(5): 1865-1870.
-

- 
- 81. Mansour W, S Dahmen, L Poirel, K Charfi, D Bettaieb, N Boujaafar, O Bouallegue.** 2009. Emergence of SHV-2a extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Tunisia. *Microb Drug Resistance*. **15**(4): 295-301.
- 82. Marchandin H, H Jean-Pierre, C Champs, D Sirot, H Darbas, PF Perigault, C Carriere.** 2000. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **44**(1): 213-216.
- 83. Martins AF, AP Zavascki, PB Gaspareto, AL Barth.** 2007. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection*. **35**(6): 457-460.
- 84. Masuda N, E Sakagawa, S Ohya, N Gotoh, H Tsujimoto, T Nishino.** 2000. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **44**(9): 2242-2246.
- 85. Mendes RE, MA Toleman, J Ribeiro, HS Sader, RN Jones, TR Walsh.** 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): 4693-4702.
- 86. Mendes RE, KA Kiyota, J Monteiro, M Castanheira, SS Andrade, AC Gales, ACC Pignatari, S Tufik.** 2007a. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol*. **45**(2): 544-547.
- 87. Mendes RE, M Castanheira, MA Toleman, HS Sader, RN Jones, TR Walsh.** 2007b. 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*. **51**(7): 2611-2614.
- 88. Miriagou V, G Cornaglia, M Edelstein, I Galani, CG Giske, M Gniadkowski, E Malamou-Lada, L Martinez-Martinez, F Navarro, P Nordmann, L Perixe, S Pournaras, GM Rossolini, A Tsakris, A Vatopoulos, R Cánton.** 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*. **16**(2): 112-122.
- 89. Mirsalehian, A, M Feizabadi, FA Nakhjavani, F Jabalameli, H Goli, N Kalantari.** 2010. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*. **36**(1): 70-74.
- 90. Monteiro J, AF Santos, MD Asensi, G Peirano, AC Gales.** 2009. First report of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. **53**(1): 333-334.
- 91. Morita Y, N Kimura, T Mima, T Mizushima, T Tsuchiya.** 2001. Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Appl Microbiol*. **47**(1): 27-32.
- 92. Moubareck C, S Bremont, MC Conroy, P Courvalin, T Lambert.** 2009. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. **53**(8): 3579-3581.
-



- 
- 93. Mugnier P, P Dubrous, I Casin, G Arlet, E Collatz.** 1996. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**(11): 2488-2493.
- 94. Muller PY, H Janovjak, AR Miserez, Z Dobbie.** 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques.* **32**(6): 1372-1379.
- 95. National Nosocomial Infections Surveillance System.** 2004. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* **32**(8): 470-485.
- 96. Naas T, L Philippon, L Poirel, E Ronco, P Nordmann.** 1999a. An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**(5): 1281-1284.
- 97. Naas T, L Poirel, A Karin, P Nordmann.** 1999b. Molecular characterization of *In50*, a class I integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* **176**(2): 411-419.
- 98. Neonakis IK, EV Scoulica, SK Dimitriou, AI Gikas, YJ Tselentis.** 2003. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university Hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. *Microbial Drug Resistance.* **9**(2): 161-165.
- 99. Nordmann P & T Naas.** 1994. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**(1): 104-114.
- 100. Nouér SA, M Nucci, MP Oliveira, FLPC Pellegrino, BM Moreira.** 2005. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**(9): 3663-3667.
- 101. Okamoto K, N Gotoh, T Nishino.** 2002. Alterations of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by overproduction of multidrug efflux systems, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY/OprM to carbapenems: substrate specificities of the efflux systems. *J Infect Chemother.* **8**(4): 371-373.
- 102. Osano E, Y Arakawa, R Wacharotayankun, M Ohta, T Horii, H Ito, F Yoshimura, N Kato.** 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**(1): 71-78.
- 103. Pagani L, E Mantengoli, R Migliavacca, E Nucleo, S Pollini, M Spalla, R Daturi, E Romero, GM Rossolini.** 2004. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol.* **42**(6): 2523-2529.
- 104. Pages JM & L Amaral.** 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump to Gram-negative bacteria. *BiochimBiophys Acta.* **1794**(5): 826-833.
- 105. Pasteran F, M Rapoport, A Petroni, D Faccone, A Corso, M Galas, M Vazquez, A Procopio, M Tokumoto, V Cagnoni.** 2006. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**(9): 3222-3224.
-

- 
- 106. Paterson DL & RA Bonomo**, 2005. Extended-Spectrum B-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiol Reviews*. **18**(4): 657-686.
- 107. Pavez M, EM Mamizuka, N Lincopan**. 2009. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. **53**(6): 2702.
- 108. Peirano G, LM Seki, VLV Passos, MCFG Pinto, LR Guerra, MD Asensi**. 2009. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother*. **63**(2): 265-268.
- 109. Pellegrino FLPC, LM Teixeira, MGS Carvalho, AS Nouér, MP Oliveira, JLM Sampaio, ADF Freitas, ALP Ferreira, ELT Amorim, LW Riley, BM Moreira**. 2002. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. **40**(7): 2420-2424.
- 110. Pellegrino FL, KRN Santos, LW Riley, BM Moreira**. 2006. *bla*<sub>GES</sub> carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. **10**(4): 251-253.
- 111. Peña C, C Suarez, F Tubau, C Juan, B Moya, MA Dominguez, A Oliver, M Pujol, J Ariza**. 2009. Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1  $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol*. **47**(8) : 2381-2387.
- 112. Perron K, O Caille, C Rossier, C van Delden, JL Dumas, T Kohler**. 2004. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. **279**(10): 8761–8768.
- 113. Picão RC, L Poirel, AC Gales, P Nordmann**. 2009a. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **53**(5): 2225-2226.
- 114. Picão RC, L Poirel, AC Gales, P Nordmann**. 2009b. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. **53**(9): 3908-3913.
- 115. Picão RC, LCC Fehlberg, PP Barbosa, R Girardello, KC Bauab, AC Gales**. 2009c. Cefotaximasas (CTX-M) em *Pseudomonas aeruginosa*: devemos nos preocupar? XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia. Porto de Galinhas, PE. Novembro, 8-12. Poster A03-090.
- 116. Picão RC, AF Santos, AG Nicoletti, GH Furtado, AC Gales**. 2010. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. **65**(4): 796-797.
- 117. Poirel L, E Ronco, T Naas, P Nordmann**. 1999. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. **5**(10): 651-652.
- 118. Poirel L, T Le, IT Naas, A Karim, P Nordmann**. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **44**(3): 622-632.
- 119. Poirel L, VO Rotimi, EM Mokaddas, A Karim, P Nordmann**. 2001a. VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg Infect Dis*. **7**(3): 468-470.
-

- 
- 120. Poirel L, GF Weldhagen, T Naas, C Champs, MG Dove, P Nordmann.** 2001b. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**(9): 2598-2603.
- 121. Poirel L, D Girlich, T Naas, P Nordmann.** 2001c. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid-and-integron-located gene. *J Antimicrob Chemother.* **45**(2): 447-453.
- 122. Poirel L, P Gerome, C Champs, J Stephanazzi, T Naas, P Nordmann.** 2002. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**(2): 566-569.
- 123. Poirel L, E Lebessi, M Castro, C Fevre, M Foustoukou, P Nordmann.** 2004a. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5 producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(2): 2277-2279.
- 124. Poirel L, M Magalhães, M Lopes, P Nordmann.** 2004b. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene *bla*SPM-1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(4): 1406-1409.
- 125. Poirel L, L Brinas, A Verlinde, L Ide, P Nordmann.** 2005. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron *In120* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**(9): 3743-3748.
- 126. Poirel L, A Wenger, J Bille, S Bernabeu, T Naas, P Nordmann.** 2007. SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate from Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(6): 2282-2283.
- 127. Poirel L, J Rodriguez-Martinez, N al Naiemi, Y Debets-Ossenkopp, P Nordmann.** 2010a. Characterization of DIM-1, an integrin-encoding metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(6): 2420-2424.
- 128. Poirel L, JD Docquier, F Luca, A Verlinde, L Ide, GM Rossolini, P Nordmann.** 2010b. BEL-2, an extended-spectrum beta lactamase with increased activity toward expanded-spectrum cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(1): 533-535.
- 129. Poirel L, T Naas, P Nordmann.** 2010c. Diversity, epidemiology and genetics of class D  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(1): 24-38.
- 130. Poole K, K Krebs, C McNally, S Neshat.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol.* **175**(22): 7363-7372.
- 131. Poole K, N Gotoh, H Tsujimoto, Q Zhao, A Wada, T Yamasaki, S Neshat, J Yamagishi, XZ Li, T Nishino.** 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **21**(4): 713-724.
- 132. Poole K.** 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* **61**(17): 2200-2223.
-

- 
- 133. Poole K.** 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med.* **39**(3): 162-176.
- 134. Quale J, S Bratu, J Gupta, D Landman.** 2006. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(5): 1633-1641.
- 135. Queenan AM & K Bush.** 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **20**(3): 440-458.
- 136. Quinn JP.** 2003. *Pseudomonas aeruginosa* infections in the intensive care unit. *Semin Respir Crit Care Med.* **24**(1): 61-68.
- 137. Rasmussen JW & N Hoiby.** 2007. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* **60**(3): 470-482.
- 138. Rhomberg PR & RN Jones.** 2009. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). *Diag Microbiol Infect Dis.* **65**(4): 414-426.
- 139. Richards MJ, JR Edwards, DH Culver, RP Gaynes.** 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **21**(8): 510-515.
- 140. Robledo IE, EE Aquino, MI Sante, JL Santana, DM Otero, CF León, GJ Vasquez.** 2009. Detection of KPC in *Acinetobacter* sp. in Porto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(3): 1354-1357.
- 141. Rodriguez-Martinez JM, L Poirel, P Nordmann.** 2009a. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(11): 1766-1771.
- 142. Rodriguez-Martinez JM, L Poirel, P Nordmann.** 2009b. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(11): 4783-4788.
- 143. Ryoo NH, K Lee, JB Lim, YH Lee, IK Bae, SH Jeong.** 2009. Outbreak by meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-6 metallo-beta-lactamase in a Korean hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **63**(1): 115-117.
- 144. Sader HS, AC Gales, MA Pfaller, RE Mendes, C Zoccoli, A Barth, RN Jones.** 2001. Pathogen frequency and resistance pattern in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* **5**(4): 200-214.
- 145. Sader HS, RN Jones, AC Gales, JB Silva, AC Pignatari, SENTRY Participants Group (Latin America).** 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.* **8**(1): 25-79.
- 146. Sader HS, AO Reis, S Silbert, AC Gales.** 2005. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect.* **11**(1): 73-76.
- 147. Sekiguchi JI, K Morita, T Kitao, N Watanabe, M Okazaki, T Miyoshi-Akiyama, M Kanamori, T Kirikae.** 2008. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**(11): 4194-4197.
-

- 
- 148. Sevillano E, L Gallego, JM Garcia-Lobo.** 2009. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol.* **57**(6): 493-495.
- 149. Siarkou VI, D Vitti, E Protonotariou, A Ikonmidis, D Sofianou.** 2009. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla*<sub>VIM-17</sub> metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(4): 1325-1330.
- 150. Strateva T, V Ouzounova-Raykova, B Markova, A Todorova, Y Marteva-Proevska, I Mitov.** 2007. Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Sofia, Bulgaria. *J Chemother.* **19**(2): 140-145.
- 151. Strateva T & D Yordanov.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* **58**(pt9): 1133-1148.
- 152. Spencer RC.** 1996. Predominant pathogens found in the European prevalence of infection in intensive care study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **15**(4): 281-285.
- 153. Suárez C, C Peña, F Tubau, L Gavaldà, A Manzur, MA Dominguez, M Pujol, F Gudiol, J Ariza.** 2009. Clinical impact of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *J Infect.* **58**(4): 285-290.
- 154. Szabo D, J Szentandrassy, Z Juhasz, K Katona, K Nagy, L Rokusz.** 2008. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **7**(12): 1-5.
- 155. Tam VH, AN Schilling, MT la Rocco, LO Genty, K Lolans, JP Quinn, KW Garey.** 2007. Prevalence of AmpC over-expression in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* **13**(4): 413-418.
- 156. Tam VH, KT Chang, AN Schilling, MT la Rocco, LO Genty, KW Garey.** 2009. Impact of AmpC overexpression on outcomes of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **63**: 279-285.
- 157. Tato M, A Valverde, TM Coque, R Canton.** 2006. PER-1 multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **24**(7): 472-473.
- 158. Toleman MA, AM Simm, TA Murphy, AC Gales, DJ Biedenbach, RN Jones, TR Walsh.** 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* **50**(5): 673-679.
- 159. Toleman MA, DJ Biedenbach, DMC Benett, RN Jones, TR Walsh.** 2005. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother.* **55**(1): 61-70.
- 160. Viedma E, C Juan, J Acosta, L Zamorano, JR Otero, F Sanz, F Chaves, A Oliver.** 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(11): 4930-4933.
- 161. Vieira VV, EL Fonseca, ACP Vicente.** 2005. Metallo- $\beta$ -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* **11**(11): 937.
-

- 
- 162. Vignoli R, G Varela, MI Mota, NF Cordeiro, P Power, E Ingold, P Gadea, A Sirok, F Schelotto, JA Ayala, G Gutkind.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol.* **43**(6): 2940-2943.
- 163. Villegas MV, K Lolans, A Correa, JN Kattan, JA Lopez, JP Quinn.** 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(4): 1553-1555.
- 164. Vourli S, P Giakkoupi, V Miriagou, E Tzelepi, AC Vatopoulos, LS Tzouveleki.** 2004. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **234**(2): 209-213.
- 165. Walsh TR, L Hall, SJ Assinder, WW Nichols, SJ Cartwright, AP MacGowan, PM Bennet.** 1994. Sequences analysis of L1 metallo-beta-lactamase from *Xantomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta.* **1218**(2): 199-201.
- 166. Walsh TR, MA Toleman, L Poirel, P Nordmann.** 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* **18**(2): 306-325.
- 167. Walsh TR.** 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis.* **21**(4): 367-371.
- 168. Walsh TR.** 2010. Structure, function and molecular genetics of MBLs. Official Symposium of 20<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infections Diseases (ECCMID). Viena, Áustria. Abril, 10-13, 2010.
- 169. Wang C, P Cai, D Chang, Z Mi.** 2006. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* **57**(6): 1261-1262.
- 170. Weldhagen GF, L Poirel, P Nordmann.** 2003. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**(8): 2385-2392.
- 171. Weldhagen GF.** 2006. GES: an emerging family of extended spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology Newsletters* **28**(19): 145-149.
- 172. Wisplinghoff H, T Bischoff, SM Tallent, H Seifert, RP Wenzel, MB Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US Hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* **39**(3): 309-317.
- 173. Wolter DJ, E Smith-Moland, RV Goering, ND Hanson, PD Lister.** 2004a. Multidrug resistance associated with mexXY expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **50**(1): 43-50.
- 174. Wolter DJ, ND Hanson, PD Lister.** 2004b. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett.* **236**(1): 137-143.
- 175. Wolter DJ, N Khalaf, IE Robledo, GJ Vazquez, MI Sante, EE Aquino, RV Goering, ND Hanson.** 2009. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(4): 1660-1664.
-

- 
- 176. Woodford N, MJ Ellington, JM Coelho, JF Turton, ME Ward, S Brown, SGB Amyes, DM Livermore.** 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Inter J Antimicrob Agents*. **27**(4): 351-353
- 177. Woodford N, J Zhang, ME Kaufmann, S Yarde, MM Tomas, C Faris, MS Vardhan, S Dawson, SL Cotterill, DM Livermore.** 2008. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. **62**(6): 1265-1268.
- 178. Xavier DE, AC Gales, RE Mendes, ACC Pignatari, LS Filho, LF Cirilo, M Castanheira.** 2006. IMP-18-Producing *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): increasing diversity of mobile metallo-beta-lactamase (MBL) in Brazil. 46<sup>th</sup> Intescience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco - CA. Setembro, 27-30, 2007. Poster C2-419.
- 179. Xavier DE.** 2008. Avaliação da expressão de sistemas de efluxo para resistência antimicrobiana entre amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação (Mestrado). Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP. 123fls.
- 180. Yamano Y, T Nishikawa, T Fujimura, T Yutsudou, M Tsuji, H Miwa.** 2006. Occurrence of PER-1 producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Japan and their susceptibility to doripenem. *J Antibiot*. **59**(12): 791-796.
- 181. Yan JJ, WC Ko, JJ Wu.** 2001. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**(8): 2368-2371.
- 182. Yan JJ, PR Hsueh, JJ Lu, FY Chang, JM Shyr, JH Wan, YC Liu, YC Chuang, YC Yang, SM Tsao, HH Wu, LS Wang, TP Lin, HM Wu, HM Chen, JJ Wu.** 2006. Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. **50**(5): 1861-1864.
- 183. Yao, JCD & RC Moellering Jr.** *Antibacterial Agents*. In: Murray PR, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Pfaller. 2007 *Manual of Clinical Microbiology*. vol 1. Washington: ASM Press. **9**: 1077-1113.
- 184. Yigit, H, AM Queenan, GJ Anderson, A Domenech-Sanchez, JW Biddle, CD Steward, S Alberti, K Bush, FC Tenover.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**(4): 1151-1161. (Erratum, **52**(2): 809, 2008.).
- 185. Yong D, JM Bell, B Ritchie, R Pratt, MA Toleman, TR Walsh.** 2007. A Novel Sub-Group Metallo- $\beta$ -Lactamase (M $\beta$ L), AIM-1 Emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. 47<sup>th</sup> Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago, IL, USA. Setembro 17-20, 2007. Poster C1-539.
- 186. Yong D, MA Toleman, CG Giske, HS Cho, K Sundman, K Lee, TR Walsh.** 2009. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. **53**(12): 5046-5054.
- 187. Yoshihara E, S Eda, S Kaitou.** 2009. Functional interaction sites of OprM with MexAB in the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol Lett*. **299**: 200-204.
-

- 
- 188. Zavascki AP, PB Gaspareto, AF Martins, AL Gonçalves, AL Barth.** 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother.* **56**(6): 1148-1151.
- 189. Zavascki AP, ABMP Machado, KRP Oliveira, SV Superti, DV Cantarelli, VV Cantarelli, PR Pereira, AC Lieberkmecht, AL Barth.** 2009. KPC-2 producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* **34**(3): 281-291.
- 190. Zavascki AP, CG Carvalhaes, RC Picão, AC Gales.** 2010. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **8**(1): 71-93.
- 191. Ziha-Zarifi I, C Llanes, T Kohler, JC Pechere, P Plesiat.** 1999. *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**(2): 287-291.
-



---

## *8. Anexo*

---

## Anexo I

**Tabela Anexo 1.** Perfil de sensibilidade e mecanismos de resistência das 84 amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hemocultura do Hospital São Paulo.

Isolado	CIM (µg/mL)									OprD -
	AZT	PTZ	CAZ	CEP	CIP	MER	GEN	IMI	AMI	
<b>XY+</b>										
5	32	128	32	16	>4	0,5	>16	0,5	<8	<b>0,04</b>
337	>32	128	32	16	>4	8	8	8	<8	<b>0,07</b>
367	32	128	32	16	>4	16	>16	8	>64	<b>0,10</b>
715	8	<8	2	4	>4	4	>16	2	>64	<b>0,09</b>
720	32	128	32	16	>4	16	>16	8	>64	<b>0,13</b>
830	4	<8	2	8	0,5	<0,25	<2	1	<8	<b>0,14</b>
1061	32	256	32	16	>4	16	>16	16	>64	<b>0,11</b>
1356	>32	32	4	8	1	16	<2	0,5	<8	<b>0,18</b>
<b>XY+; AmpC+</b>										
114	>32	>256	>32	32	>4	16	>16	16	>64	<b>0,05</b>
189	16	128	32	16	>4	16	>16	16	>64	<b>0,02</b>
203	>32	256	32	16	>4	16	>16	16	>64	<b>0,04</b>
1170	16	128	16	16	>4	16	>16	8	>64	<b>0,09</b>
1280	>32	256	>32	32	>4	32	>16	16	>64	<b>0,09</b>
1395	32	256	32	16	>4	16	>16	16	>64	<b>0,06</b>
1643	32	256	>32	>32	>4	>32	>16	>32	>64	<b>0,05</b>
1743	32	32	4	4	>4	2	>16	2	<8	<b>0,10</b>
<b>ABM+; XY+</b>										
221	16	128	32	8	<0,12	1	<2	1	<8	0,75
239	>32	>256	>32	32	>4	32	>16	16	>64	<b>0,02</b>
1086	32	64	16	8	>4	16	<2	8	<8	<b>0,15</b>
1758	8	32	8	4	>4	8	>16	8	>64	<b>0,19</b>
2216	2	<8	<1,0	<1,0	0,25	4	<2	4	<8	2,26
2250	4	<8	<1,0	<1,0	1	2	<2	8	<8	1,14
<b>AmpC+</b>										
1084	>32	256	32	16	>4	16	>16	8	>64	<b>0,10</b>
1127	4	16	8	2	0,12	4	<2	4	<8	<b>0,25</b>
1255	4	32	2	4	0,25	1	<2	2	<8	<b>0,07</b>
1345	16	32	16	8	0,12	<0,25	<2	0,5	<8	<b>0,05</b>
1384	>32	256	>32	32	>4	32	>16	16	>64	<b>0,08</b>
1463	8	<8	8	4	<0,12	0,5	<2	0,5	<8	<b>0,12</b>
<b>ABM+; XY+; AmpC+</b>										
354	32	256	32	16	>4	8	>16	8	>64	<b>0,05</b>
483	32	128	32	16	>4	16	>16	16	>64	<b>0,09</b>
1013	4	<8	2	2	0,12	2	>16	1	<8	<b>0,20</b>
1346	16	64	8	16	>4	4	>16	8	>64	<b>0,52</b>
2209	>32	256	>32	32	>4	16	>16	32	16	2,02

## Anexo

continuação da tabela anexo 1

Isolado	CIM (µg/mL)									OprD -
	AZT	PTZ	CAZ	CEP	CIP	MER	GEN	IMI	AMI	
<b>ABM+</b>										
932	16	16	2	4	0,25	8	<2	2	<8	<b>0,58</b>
946	32	64	16	8	4	1	4	1	<8	<b>0,05</b>
1003	64	4	32	32	2	>32	16	8	16	<b>0,17</b>
1044	16	64	16	8	<0,12	1	<2	2	<8	<b>0,19</b>
1310	8	<8	2	2	0,5	16	<2	8	<8	<b>0,08</b>
<b>ABM+; AmpC+</b>										
811	8	<8	2	2	<0,12	4	>16	8	<8	<b>0,09</b>
1134	8	<8	2	2	1	<0,25	<2	2	<8	<b>0,11</b>
<b>SPM-1</b>										
1638	>32	256	>32	>32	>4	>32	>16	32	>64	<b>0,04</b>
2604	16	256	>32	>32	>4	>32	>16	>32	>64	<b>0,11</b>
<b>ABM+; XY+; AmpC+; IMP-16</b>										
1260	32	32	>32	>32	>4	>32	>16	16	16	<b>0,07</b>
<b>ABM+; XY+; AmpC+; SPM-1</b>										
2561	>32	>256	>32	>32	>4	>32	>16	>32	>64	<b>0,10</b>
<b>ABM+; CDJ+; XY+; AmpC</b>										
1093	8	<8	4	4	0,25	0,5	<2	2	<8	<b>0,43</b>
<b>ABM+; CDJ+; XY+</b>										
1125	32	16	4	8	1	0,25	16	1	64	<b>0,59</b>
<b>CDJ+; XY+</b>										
418	32	256	32	16	>4	8	>16	8	>64	2,20
<b>XY+; AmpC+; SPM-1</b>										
1808	>32	256	>32	32	>4	16	>16	32	>64	<b>0,06</b>
<b>XY+; AmpC+; IMP-1</b>										
1191	16	32	8	16	>4	32	<2	16	<8	<b>0,02</b>
<b>XY+; SPM-1</b>										
2312	8	256	>32	>32	>4	>32	>16	>32	>64	<b>0,05</b>
<b>GES-5</b>										
2253	32	128	16	32	>4	32	>16	>32	>64	<b>0,03</b>
<b>Isolados sem determinantes de resistência</b>										
1157	8	<8	2	4	>4	2	>16	1	32	1,11
1577	8	<8	2	4	0,5	4	<2	4	<8	0,76
<b>OprD-</b>										
44	32	32	8	2	>4	8	>16	16	>64	<b>0,04</b>
45	8	<8	2	2	0,12	8	<2	0,5	<8	<b>0,11</b>
96	16	16	4	8	0,25	16	4	32	<8	<b>0,02</b>
127	16	<8	2	4	0,5	0,5	4	1	<8	<b>0,10</b>
193	>32	8	>32	>32	>4	>32	>16	0,5	>64	<b>0,06</b>
201	16	64	32	8	<0,12	1	>16	1	>64	<b>0,01</b>
207	2	<8	<1,0	4	0,25	4	4	4	<8	<b>0,01</b>
319	16	64	16	4	<0,12	1	<2	1	<8	<b>0,13</b>
391	>32	128	>32	32	>4	2	>16	2	>64	<b>0,15</b>
419	2	16	<1,0	2	0,25	1	<2	1	<8	<b>0,08</b>

## Anexo

continuação da tabela anexo 1

Isolado	CIM (µg/mL)									OprD -
	AZT	PTZ	CAZ	CEP	CIP	MER	GEN	IMI	AMI	
	<b>OprD-</b>									
538	4	16	2	8	0,25	2	4	8	<8	<b>0,13</b>
559	32	256	32	8	4	16	8	8	<8	<b>0,13</b>
747	8	<8	2	4	0,5	4	<2	2	<8	<b>0,07</b>
798	16	16	4	8	>4	1	>16	1	>64	<b>0,06</b>
831	32	256	16	8	>4	8	>16	8	>64	<b>0,07</b>
864	4	<8	<1,0	<1,0	0,12	1	<2	1	<8	<b>0,12</b>
872	4	<8	<1,0	2	0,12	0,5	<2	1	<8	<b>0,05</b>
916	4	16	4	4	2	<0,25	<2	2	<8	<b>0,31</b>
949	8	<8	2	2	0,25	16	<2	8	<8	<b>0,14</b>
1114	4	<8	2	4	0,5	0,5	<2	1	<8	<b>0,15</b>
1150	8	<8	16	2	0,12	2	<2	2	<8	<b>0,24</b>
1200	32	32	8	8	0,5	0,5	<2	2	<8	<b>0,05</b>
1361	2	<8	<1,0	<1,0	0,12	0,25	<2	<0,25	<8	<b>0,07</b>
1574	32	256	>32	32	>4	2	16	2	64	<b>0,18</b>
1785	8	<8	2	2	1	1	2	2	<8	<b>0,56</b>
1840	8	16	4	4	0,12	8	<2	2	<8	<b>0,05</b>
2202	16	<8	4	4	0,25	0,25	<2	4	<8	<b>0,15</b>
2487	32	128	>32	>32	>4	32	>16	16	64	<b>0,12</b>
2492	32	256	32	16	0,5	4	<2	2	<8	<b>0,05</b>
2513	32	256	32	16	>4	32	>16	32	>64	<b>0,03</b>
2547	4	32	2	2	0,5	0,25	<2	2	<8	<b>0,07</b>

CIM obtidas de acordo com as recomendações do CLSI, 2009 (28). AZT- aztreonam; PTZ piperacilina/tazobactam; CAZ- ceftazidima; CEP – cefepima; CIP – ciprofloxacina; MER – meropenem; GEN – gentamicina; IMI – imipenem; AMI – ampicilina.

ABM+: aumento da transcrição do gene *mexB* de, no mínimo, duas vezes, em relação à cepa referência PA01; CDJ+: aumento da transcrição do gene *mexD* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; EFN+: aumento da transcrição do gene *mexF* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; XY+: aumento da transcrição do gene *mexY* de, no mínimo, quatro vezes, em relação à cepa referência PA01; AmpC: aumento da transcrição do gene *ampC* de, no mínimo, dez vezes, em relação à cepa referência PA01; OprD-: redução da transcrição do gene *oprD* de, no mínimo, 30% em relação à cepa referência PA01. Os valores em negrito indicam a redução da expressão de OprD.

## Anexo II

**Tabela Anexo 2.** Perfil de sensibilidade e mecanismos de resistência das 61 amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hemoculturas do Medical College of Virginia.

Isolado	CIM (µg/mL)									OprD -
	AZT	PTZ	CAZ	CEP	CIP	MER	GEN	IMI	AMI	
<b>ABM+</b>										
36033	16	64	2	2	>4	0,25	<2	1	16	<b>0,01</b>
34266	8	<8	4	4	>4	2	<2	1	4	<b>0,04</b>
41301	32	<8	>32	32	>4	2	16	<0,25	32	<b>0,08</b>
35454	64	64	>32	32	>4	8	>16	<0,25	8	<b>0,09</b>
35552	16	256	16	8	0,5	4	16	<0,25	<8	<b>0,32</b>
41375	64	<8	>32	>32	2	4	16	<0,25	<8	<b>0,10</b>
<b>ABM+; XY+</b>										
34986	<2	<8	8	8	4	8	<2	16	32	5,88
35877	8	128	8	4	>4	2	<2	0,5	<8	<b>0,36</b>
46277	<2	16	8	8	>4	1	4	16	>64	<b>0,58</b>
35436	16	256	32	32	2	>32	<2	8	64	<b>0,14</b>
49204	2	64	>32	32	4	8	<2	32	32	<b>0,17</b>
<b>ABM+; XY+; EFN</b>										
35241	<2	16	8	4	2	<0,25	2	2	>64	<b>0,12</b>
35365	<2	<8	2	2	0,25	<0,25	<2	1	8	<b>0,28</b>
45163	8	16	2	<1	4	<0,25	<2	1	<8	1,73
<b>ABM+; CDJ+; EFN+; XY+</b>										
40270	16	32	2	2	4	<0,25	<2	1	16	15,22
<b>XY+</b>										
41357	16	256	>32	16	>4	16	4	16	64	<b>0,01</b>
35278	<2	16	8	8	2	32	2	32	64	1,76
<b>AmpC+</b>										
49292	16	16	32	8	4	4	<2	8	32	<b>0,02</b>
45164	64	64	16	16	>4	8	<2	2	8	<b>0,01</b>
43535	16	8	32	8	2	4	2	16	32	<b>0,00</b>
<b>Isolado sem determinante de resistência</b>										
45335	<2	8	8	2	>4	8	<2	16	16	0,74
<b>OprD-</b>										
35310	8	<8	2	2	4	<0,25	>16	1	16	<b>0,02</b>
35299	32	<8	4	4	>4	0,5	>16	1	>64	<b>0,01</b>
34104	16	32	8	4	4	8	<2	8	8	<b>0,06</b>
49343	16	<8	2	2	2	0,25	<2	0,25	16	<b>0,11</b>
34237	16	<8	2	2	>4	1	<2	1	16	<b>0,02</b>
33043	32	16	2	2	2	<0,25	8	1	16	<b>0,02</b>
40493	4	<8	16	4	4	<0,25	8	16	8	<b>0,11</b>
35814	4	<8	16	4	4	1	<2	2	16	<b>0,22</b>

## Anexo

continuação da tabela anexo 2

Isolado	CIM (µg/mL)									OprD -
	AZT	PTZ	CAZ	CEP	CIP	MER	GEN	IMI	AMI	
	<b>OprD-</b>									
34327	32	<8	32	16	>4	1	16	1	32	<b>0,51</b>
34160	4	<8	1	2	4	0,25	<2	1	16	<b>0,02</b>
35514	8	64	8	<1	2	1	<2	1	16	<b>0,02</b>
34150	4	<8	2	2	>4	<0,25	16	<0,25	16	<b>0,05</b>
34077	4	<8	4	4	4	4	<2	16	16	<b>0,05</b>
34148	8	<8	2	2	>4	0,25	16	1	16	<b>0,02</b>
45151	8	256	4	2	4	<0,25	<2	1	16	<b>0,33</b>
43590	16	8	16	8	>4	4	2	1	32	<b>0,04</b>
36701	4	8	16	4	2	1	<2	1	64	<b>0,05</b>
35517	<2	16	2	2	4	<0,25	<2	1	8	<b>0,02</b>
39541	2	8	2	2	4	<0,25	<2	1	8	<b>0,02</b>
34206	8	>256	2	4	4	<0,25	<2	1	8	<b>0,01</b>
49328	<2	128	1	2	4	0,5	<2	0,25	8	<b>0,03</b>
34403	8	<8	16	8	>4	<0,25	<2	0,5	8	<b>0,01</b>
35478	32	32	32	8	2	4	2	16	32	<b>0,00</b>
35554	<2	<8	4	4	4	1	<2	1	8	<b>0,02</b>
35160	2	16	2	2	4	0,5	<2	2	16	<b>0,01</b>
40237	8	8	4	2	4	0,5	2	0,5	64	<b>0,04</b>
35027	<2	8	2	32	>4	1	<2	1	>64	<b>0,66</b>
49528	16	256	>32	32	>4	32	2	32	64	<b>0,02</b>
35328	8	8	4	4	4	<0,25	4	2	>64	<b>0,01</b>
35257	<2	8	2	4	4	2	<2	2	32	<b>0,02</b>
34710	<2	8	2	4	2	0,5	<2	2	16	<b>0,08</b>
45614	4	16	2	8	>4	16	<2	4	16	<b>0,02</b>
49506	16	128	8	8	>4	8	8	<0,25	32	<b>0,05</b>
41312	16	16	8	4	>4	<0,25	2	2	>64	<b>0,04</b>
46257	16	>256	8	2	2	8	<2	16	64	<b>0,12</b>
35236	16	128	16	16	2	2	16	<0,25	<8	<b>0,31</b>
49246	16	8	16	<1	2	2	2	<0,25	32	<b>0,09</b>
35189	>32	>256	>32	>32	>4	>32	>16	2	>64	<b>0,09</b>
35073	32	256	>32	32	4	4	8	<0,25	8	<b>0,24</b>
40222	16	8	16	8	4	4	16	<0,25	64	<b>0,61</b>

CIM obtidas de acordo com as recomendações do CLSI, 2009 (28). AZT- aztreonam; PTZ piperacilina/tazobactam; CAZ- ceftazidima; CEP – cefepima; CIP – ciprofloxacina; MER – meropenem; GEN – gentamicina; IMI – imipenem; AMI – ampicilina.

ABM+: aumento da transcrição do gene *mexB* de, no mínimo, duas vezes, em relação à cepa referência PA01; CDJ+: aumento da transcrição do gene *mexD* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; EFN+: aumento da transcrição do gene *mexF* de, no mínimo, 100 vezes, em relação à cepa referência PA01; XY+: aumento da transcrição do gene *mexY* de, no mínimo, quatro vezes, em relação à cepa referência PA01; AmpC: aumento da transcrição do gene *ampC* de, no mínimo, dez vezes, em relação à cepa referência PA01; OprD-: redução da transcrição do gene *oprD* de, no mínimo, 30% em relação à cepa referência PA01. Os valores em negrito indicam a redução da expressão de OprD.

## Anexo III

**Tabela Anexo 3.** Expressão relativa dos genes avaliados nas 84 amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hemoculturas do Hospital São Paulo, em comparação à cepa referência PA01.

<b>Isolado</b>	<b>ABM</b>	<b>CDJ</b>	<b>EFN</b>	<b>XY</b>	<b>AmpC</b>	<b>OprD</b>
5	0,68	0,64	0,51	8,12	0,00	0,04
44	0,13	0,21	3,77	0,67	2,99	0,04
45	0,22	2,78	13,84	1,43	2,04	0,11
96	0,06	0,21	0,08	2,17	0,00	0,02
114	0,79	0,26	0,85	45,30	>10000	0,05
127	1,07	0,30	0,00	0,53	1,51	0,10
189	0,41	1,09	0,34	12,02	>10000	0,02
193	0,30	0,49	0,34	0,19	0,09	0,06
201	0,19	0,30	0,26	0,13	9,67	0,01
203	0,83	0,37	0,91	20,49	>10000	0,04
207	0,14	2,16	0,25	3,04	0,00	0,01
221	21,85	84,78	16,39	4,82	0,00	0,75
239	4,12	8,29	9,02	27,48	0,08	0,02
319	0,63	1,12	0,87	0,42	1,19	0,13
337	1,73	4,44	9,18	17,58	0,08	0,07
354	2,03	0,91	1,94	238,41	18,79	0,05
367	0,51	0,26	0,84	9,13	0,00	0,10
391	0,55	0,32	0,53	0,59	0,00	0,15
418	1,80	103,49	3,08	8,42	0,00	2,20
419	1,90	7,62	2,02	2,04	0,00	0,08
483	2,59	2,21	7,52	40,14	51,07	0,09
538	0,81	0,17	0,63	1,08	0,00	0,13
559	0,14	0,37	0,49	2,31	0,00	0,13
715	0,77	1,35	0,23	4,13	0,00	0,09
720	1,69	3,87	3,30	24,13	5,76	0,13
747	0,61	0,65	0,54	0,32	0,00	0,07
798	1,36	1,76	2,33	2,55	0,00	0,06

**Anexo***continuação da tabela anexo 3*

<b>Isolado</b>	<b>ABM</b>	<b>CDJ</b>	<b>EFN</b>	<b>XY</b>	<b>AmpC</b>	<b>OprD</b>
811	3,03	2,36	3,40	1,53	25,59	0,09
830	0,92	0,47	0,36	21,27	0,41	0,14
831	0,12	0,28	0,47	0,35	0,00	0,07
864	0,96	0,40	0,29	0,08	0,03	0,12
872	0,21	0,91	0,22	0,07	0,10	0,05
916	1,23	7,22	0,18	0,03	1,71	0,31
932	12,20	2,41	1,04	0,65	0,95	0,58
946	2,70	0,43	0,70	1,75	0,00	0,05
949	1,53	0,36	0,72	0,48	0,00	0,14
1003	3,29	0,87	1,12	1,20	0,00	0,17
1013	3,30	5,65	10,27	7,54	567,07	0,20
1044	4,11	0,39	1,11	0,09	0,00	0,19
1061	0,88	0,13	0,39	7,20	0,41	0,11
1084	0,97	0,14	0,32	3,03	> 10000	0,10
1086	3,67	14,14	56,26	11,50	0,00	0,15
1093	31,54	164,34	99,71	23,40	> 10000	0,43
1114	1,11	10,17	0,38	0,20	0,01	0,15
1125	165,73	> 10000	62,06	958,89	0,00	0,59
1127	0,68	3,99	0,96	0,49	17,93	0,25
1134	2,44	3,22	1,69	0,86	31,85	0,11
1150	0,09	0,23	0,09	1,02	0,00	0,24
1157	0,19	1,09	0,03	1,07	0,00	1,11
1170	1,82	1,64	2,79	13,28	> 10000	0,09
1191	1,78	17,70	8,59	27,53	> 10000	0,02
1200	1,82	0,16	0,48	0,04	0,40	0,05
1255	0,69	1,23	0,99	0,51	229,99	0,07
1260	5,88	0,47	0,72	16,85	18,35	0,07
1280	0,85	0,14	0,73	9,38	> 10000	0,09
1310	5,83	0,51	7,13	0,79	0,07	0,08
1345	0,27	0,08	1,04	0,44	> 10000	0,05
1346	2,72	0,06	0,37	5,74	86,87	0,52



**Anexo***continuação da tabela anexo 3*

<b>Isolado</b>	<b>ABM</b>	<b>CDJ</b>	<b>EFN</b>	<b>XY</b>	<b>AmpC</b>	<b>OprD</b>
1356	1,02	0,83	2,69	560,64	0,00	0,18
1361	0,60	0,17	1,01	2,64	0,00	0,07
1384	0,80	0,06	0,46	3,34	> 10000	0,08
1395	1,61	0,13	3,07	56,53	> 10000	0,06
1463	0,68	0,33	0,46	0,31	24,20	0,12
1574	0,36	0,26	0,26	0,93	0,00	0,18
1577	0,04	0,98	0,72	2,23	0,00	0,76
1638	0,46	0,13	0,50	1,42	5,51	0,04
1643	1,40	1,00	2,15	16,93	13,39	0,05
1743	0,49	2,31	2,02	4,20	> 10000	0,10
1758	4,95	16,44	21,62	31,11	0,00	0,19
1785	1,25	0,15	0,54	1,13	0,00	0,56
1808	0,67	0,16	0,61	16,48	25,02	0,06
1840	0,13	0,03	0,03	0,01	0,00	0,05
2202	0,02	0,20	0,06	0,12	0,00	0,15
2209	7,87	1,78	9,88	24,78	313,03	2,02
2216	6,57	6,70	6,96	17,71	0,00	2,26
2250	4,36	2,55	5,87	10,32	0,00	1,14
2253	0,17	0,14	0,58	1,17	0,00	0,03
2312	1,27	0,16	1,97	20,39	0,00	0,05
2487	0,40	0,23	0,46	2,54	0,00	0,12
2492	1,10	0,30	1,11	0,79	0,00	0,05
2513	0,59	0,08	0,81	2,27	0,00	0,03
2547	0,01	0,03	0,01	0,01	0,00	0,07
2561	2,34	12,31	13,37	21,29	26,64	0,10
2604	1,48	0,26	0,93	2,80	0,00	0,11

## Anexo IV

**Tabela Anexo 4.** Expressão relativa dos genes avaliados nas 61 amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hemoculturas do Medical College of Virginia, em comparação à cepa referência PA01.

<b>Isolado</b>	<b>ABM</b>	<b>CDJ</b>	<b>EFN</b>	<b>XY</b>	<b>AmpC</b>	<b>OprD</b>
35310	0,49	1,35	0,2	0,12	1,17	0,02
35299	0,45	0,17	0,1	0,03	0,31	0,01
49292	1,11	2,09	0,3	0,94	470,66	0,02
34104	0,50	0,08	0,3	0,01	0,57	0,06
49343	1,14	0,29	1,4	0,39	0,01	0,11
36033	3,92	0,14	0,2	2,29	0,01	0,01
34237	0,35	2,10	0,2	0,03	0,07	0,02
33043	0,35	0,80	0,2	0,18	0,01	0,02
40493	0,87	0,23	0,6	0,30	0,07	0,11
40270	5,55	3943,91	>10000	>10000	0,00	15,22
35814	0,01	1,40	0,0	14,12	0,00	0,22
34327	0,69	23,95	6,1	3,65	0,00	0,51
34160	0,19	0,02	0,1	0,06	0,00	0,02
35514	0,31	0,08	0,1	0,21	0,00	0,02
34150	0,26	0,02	0,1	0,19	0,00	0,05
34077	0,26	2,56	0,4	0,21	0,00	0,05
34148	0,17	0,13	0,1	0,04	0,00	0,02
45151	1,21	1,17	3,2	0,68	0,00	0,33
43590	0,25	0,22	0,2	0,16	0,00	0,04
36701	0,44	0,34	0,4	0,41	0,00	0,05
45164	1,05	0,47	0,3	0,09	>10000	0,01
35517	0,16	0,03	0,1	0,01	0,00	0,02
39541	0,22	0,06	0,1	0,07	0,00	0,02
34206	0,13	0,12	0,3	0,10	0,00	0,01
49328	0,32	0,20	0,2	0,12	0,00	0,03
45163	2,46	70,46	450,2	5457,27	0,00	1,73

**Anexo***continuação da tabela anexo 4*

<b>Isolado</b>	<b>ABM</b>	<b>CDJ</b>	<b>EFN</b>	<b>XY</b>	<b>AmpC</b>	<b>OprD</b>
43535	0,48	0,18	0,5	1,69	1894,64	0,00
34403	0,22	0,24	0,2	0,13	0,00	0,01
35478	0,24	0,36	0,2	0,33	0,38	0,00
35554	0,10	0,05	0,1	0,00	1,23	0,02
35877	89,31	84,33	63,6	22,16	0,00	0,36
35160	0,20	0,17	0,4	0,05	0,00	0,01
40237	0,22	0,30	0,9	0,73	0,00	0,04
34266	3,43	0,44	0,5	0,01	0,00	0,04
35027	0,01	0,34	0,2	0,63	0,00	0,66
41357	0,34	0,91	0,1	7,41	0,00	0,01
49528	0,87	1,57	3,1	2,31	0,00	0,02
35328	0,11	0,02	0,2	0,08	0,00	0,01
35257	0,05	0,36	0,1	0,01	0,03	0,02
34710	0,34	0,79	0,4	0,03	0,00	0,08
35278	1,89	33,91	11,6	19,48	0,00	1,76
45614	0,15	0,47	0,2	0,12	0,00	0,02
49506	0,12	9,46	0,5	1,34	0,30	0,05
41312	0,30	0,56	0,0	0,42	0,00	0,04
35241	14,83	19,83	108,2	425,06	0,00	0,12
46277	11,37	12,26	44,6	47,02	0,00	0,58
35436	9,76	5,39	21,3	13,44	0,00	0,14
35365	22,67	25,75	351,7	7,48	0,00	0,28
34986	18,16	21,38	3,8	9331,26	0,00	5,88
45335	0,06	1,02	0,1	0,12	0,00	0,74
49204	2,83	7,99	11,9	39,30	0,00	0,17
46257	0,21	0,16	1,4	2,65	0,00	0,12
35236	1,16	1,35	0,9	0,33	0,00	0,31
49246	0,04	0,43	0,4	0,36	0,00	0,09
41301	2,42	7,46	8,1	0,06	4,55	0,08
35454	7,97	11,26	55,5	0,13	0,00	0,09
35552	3,27	3,33	18,2	1,13	0,00	0,32

**Anexo***continuação da tabela anexo 4*

---

<b>Isolado</b>	<b>ABM</b>	<b>CDJ</b>	<b>EFN</b>	<b>XY</b>	<b>AmpC</b>	<b>OprD</b>
41375	3,95	2,97	28,4	0,05	0,00	0,10
35189	1,21	0,14	2,6	0,21	0,00	0,09
35073	1,28	1,18	15,2	0,46	0,00	0,24
40222	1,99	4,26	19,0	0,30	0,00	0,61

---

**RESUMO**

O objetivo principal desse estudo foi avaliar os mecanismos de resistência aos agentes  $\beta$ -lactâmicos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de dois hospitais, localizados no Brasil e nos Estados Unidos da América (EUA).

Foram avaliadas 145 amostras bacterianas de *P. aeruginosa* recuperadas de hemoculturas, sendo 84 isolados obtidos no período de janeiro de 2000 a maio de 2002 do Hospital São Paulo - HSP (Brasil) e 61 isolados obtidos no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2003 do Medical College of Virginia - MCV (EUA). Todas as amostras bacterianas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, avaliado pela técnica de diluição em ágar. A atividade enzimática das carbapenemases foi avaliada pelo método de hidrólise com inibição pelo EDTA. A pesquisa de genes que codificam ESBL e carbapenemases foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido por sequenciamento. A transcrição dos genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*, que codificam os sistemas de efluxo ABM, CDJ, EFN, XY, respectivamente, da  $\beta$ -lactamase cromossomal *ampC* e da porina *oprD* foi avaliada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), sendo os resultados da transcrição comparados com a cepa referência PA01.

Nossos resultados demonstraram que os isolados procedentes do HSP apresentaram taxas de sensibilidade inferiores aos antimicrobianos testados comparado àquelas apresentadas pelos isolados do MCV, exceto para a ciprofloxacina. Sete isolados clínicos de *P. aeruginosa* do HSP apresentaram atividade carbapenemase, sendo amplificados os genes *bla*<sub>IMP-1</sub> (n=1), *bla*<sub>IMP-16</sub> (n=1) e *bla*<sub>SPM-1</sub> (n=5). Adicionalmente, foi identificada a produção de GES-5 por uma amostra do HSP. Nenhum isolado proveniente do MCV apresentou atividade

---

## Resumo

---

carbapenemase pela técnica espectrofotométrica ou qualquer amplificação dos genes codificadores de ESBL ou carbapenemases pesquisados.

O aumento da transcrição dos genes que codificam os sistemas de efluxo avaliados foi mais frequente entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes do HSP (71,4%), em comparação com os isolados do MCV (52,4%). Os sistemas XY (41,6%) e ABM (24,6%) foram os mais frequentes entre os isolados do HSP e do MCV, respectivamente. Adicionalmente, foi avaliada a transcrição dos diferentes genes que codificam esses sistemas simultaneamente com a expressão de outros mecanismos de resistência. Entre os isolados do HSP, a associação desses diferentes determinantes de resistência foi maior que entre os isolados do MCV. A redução da transcrição de *oprD* foi semelhante entre os dois grupos amostrais, sendo observada em 91,6% e 91,8% dos isolados do HSP e do MCV, respectivamente. O aumento da transcrição de *ampC* foi observado em 30,9% e 5,0% dos isolados do HSP e MCV.

O aumento da transcrição dos genes que codificam os sistemas de efluxo e/ou a redução da transcrição de *oprD* parecem aumentar as CIMs dos  $\beta$ -lactâmicos, embora a associação destes mecanismos com a produção de  $\beta$ -lactamases seja mais significativa para o aumento da CIM. Isso pode sugerir que tais mecanismos podem favorecer a sobrevivência da *P. aeruginosa* sob pressão seletiva, aumentando, assim, a chance de adquirir outros determinantes de resistência aos agentes  $\beta$ -lactâmicos no ambiente hospitalar, e contribuindo para o surgimento de cepas altamente resistentes a esta classe de antimicrobianos.

---

**ABSTRACT**

The aim of this study was evaluate the mechanisms of  $\beta$ -lactams resistance in *P. aeruginosa* clinical isolates from two hospitals, located in Brazil and United States of America (USA).

We have selected 145 *P. aeruginosa* isolated in blood cultures. Of those, 84 and 61 isolates were recovered from patients hospitalized in Hospital São Paulo – HSP (Brazil), and in Medical College of Virginia – MCV (USA), respectively. All strains were submitted to antimicrobial susceptibility testing by agar dilution. Investigation of carbapenemase activity of crude extracts was performed by UV spectrophotometric assays. Detection of ESBL- and MBL-encoding genes was conducted by PCR, followed by amplicon sequencing. The hyperexpression of efflux systems (ABM, CDJ, EFN and XY), AmpC chromosomal  $\beta$ -lactamase, as well as reduced OprD expression was evaluated by quantitative real time PCR (qRT-PCR), compared to that of PA01 reference strain.

Isolates from HSP showed decreased susceptibility rates for most antimicrobials tested compared to those of MCV isolates, except for ciprofloxacin. Carbapenem-hydrolysis was detected in seven *P. aeruginosa* from HSP, in which we have identified the MBL- encoding genes *bla*<sub>IMP-1</sub> (n=1), *bla*<sub>IMP-16</sub> (n=1) and *bla*<sub>SPM-1</sub> (n=5). In addition, the production of GES-5 was observed in a single isolate from this hospital. In contrast, neither MBL- nor ESBL-encoding genes were observed in isolates from MCV.

Efflux hyperexpression was more frequently observed in *P. aeruginosa* clinical isolates from HSP (71.4%) than from MCV (52.4%). The efflux systems XY (41.6%)

---

**Abstract**

---

and ABM (24.6%) were more frequently hyperexpressed in isolates from HSP and MCV, respectively. The simultaneous expression of different resistance determinants in one isolate was also evaluated. This association was more frequent among HSP isolates. Reduced OprD expression was similar among isolates from HSP and MCV, 91.6% and 91.8%, respectively. The hyperexpression of AmpC was 30.9% among HSP isolates and 5.0% among MCV isolates.

The efflux hyperexpression and/or porin loss might increase  $\beta$ -lactam MICs, although not as effectively as do  $\beta$ -lactamases associated with other resistant determinants. This finding suggests that such mechanisms may favor *P. aeruginosa* survival under selective pressure, increasing its possibility to acquire other  $\beta$ -lactam resistance determinants in the hospital environment, contributing to the emergence of strains highly resistant to this class of antimicrobials.

---



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)