

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

DETECÇÃO MOLECULAR DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO
ESTENDIDO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas*
aeruginosa PROVENIENTES DE HOSPITAL PÚBLICO DE
PERNAMBUCO

VALDEMIR VICENTE DA SILVA JÚNIOR

RECIFE/PE

2014

VALDEMIR VICENTE DA SILVA JÚNIOR

**DETECÇÃO MOLECULAR DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO
ESTENDIDO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas
aeruginosa* PROVENIENTES DE HOSPITAL PÚBLICO DE
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientadora: Profa Dra Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora: Profa Dra Ana Catarina de Souza Lopes

RECIFE/PE

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

S586d	Silva Júnior, Valdemir Vicente da. Detecção molecular de beta-lactamases de espectro estendido em isolados clínicos de pseudomonas aeruginosa provenientes de hospital público de Pernambuco / Valdemir Vicente da Silva Júnior. – Recife : O autor, 2014. 67 f. : il. ; tab. ; 30 cm. Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014. Inclui referências, apêndices e anexos. 1. Pseudomonas aeruginosa. 2. Beta-Lactamases. 3. Farmacorresistência bacteriana. 4. Reação em cadeia da Polimerase. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora). II. Título. 618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-006)
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO

VALDEMIR VICENTE DA SILVA JÚNIOR

No dia 21 de fevereiro de 2014, às 14h00, na Sala de Aula do Departamento de Medicina Tropical, os Membros Doutores: a Profa. Dra. Célia Maria de Castro (UFPE) – Presidente da Banca (UFPE), o Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (UFPE) e a Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram o mestrando VALDEMIR VICENTE DA SILVA JÚNIOR sobre a sua Dissertação intitulada "DETECÇÃO MOLECULAR DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE HOSPITAL PÚBLICO DE PERNAMBUCO", a qual foi orientada pela Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel (UFPE), e co-orientada pela Profa. Dra. Ana Catarina Lopes de Souza (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Aprovado

Profa. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo

APROVADO

Profa. Dr. Maria Betânia Melo de Oliveira

Aprovado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vláudia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Ana Catarina de Souza Lopes

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus pelo Seu grande amor e sustento durante cada dia de minha vida; a minha esposa, Nara Lins de Melo pelo amor e companheirismo; a meus pais: Valdemir e Ivanete por me educarem e cuidarem de mim; e a minha irmã Suyenne.

“se procurar a sabedoria como se procura à prata e buscá-la como quem busca um tesouro escondido, então você entenderá o que é temer ao Senhor e achará o conhecimento de Deus.” (Provérbios 2: 4-5)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pois Ele é o meu sustento, a minha fortaleza, e o único que merece exaltação e honra;

A minha esposa, Nara Lins de Melo, pelo companheirismo, cumplicidade e amor por todos os dias da nossa caminhada;

Aos meus pais, Valdemir e Ivanete, por terem me educado desde criança para que hoje eu possa estar concluindo mais esta etapa da minha vida;

Aos meus colegas de graduação (Aline, Thiago, Fábio, Antônio e Maria da Conceição) que me acompanharam durante os quatro anos do curso;

A minha orientadora, Profa. Dra. Amélia Maciel, por me acolher de maneira especial, por todo o aprendizado desde a graduação, e me proporcionar o prazer de poder trabalhar com minhas queridas bactérias.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Catarina Lopes, por ter ajudado de forma crucial na execução desse projeto.

A dona Dejanira por ser um exemplo de dedicação e força, e pelos momentos de alegria proporcionados.

A todos os colegas de laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da UFPE, em especial, Lilian, Paula, Marcelle, Jussy, Laura, Armando, Alexsandra, Jailton, Stephanie, Adriane, Rita.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, em especial, Walter Leite.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, em especial a colega de turma do mestrado Joelma Carvalho.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa conhecida por causar infecções oportunistas em diversos sítios do corpo humano principalmente tendo como destaque as infecções das vias aéreas. Estes patógenos apresentam resistência intrínseca a várias classes de agentes antimicrobianos, e notável habilidade em adquirir outros mecanismos de resistência, como por exemplo, a ação de enzimas beta-lactamases. Os genes que codificam essas enzimas geralmente são adquiridos através de mecanismos de transferência genética intra e/ou interespecies. A ação dessas beta-lactamases juntamente com outros mecanismos de resistência é frequentemente a razão das falhas terapêuticas durante o tratamento das infecções. Sendo assim, o presente estudo visou determinar a frequência genotípica de beta-lactamases do tipo ESBL (Beta-lactamases de espectro estendido) em isolados de *P.aeruginosa* provenientes do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-UFPE). Os 159 isolados tiveram seu DNA extraído através do kit Brazol. O DNA obtido da extração foi quantificado e diluído para então iniciar a pesquisa genética através da técnica de PCR. Os isolados foram selecionados para pesquisa molecular de acordo com o perfil de resistência. Para o gene *bla*_{TEM}, 1,41% (1/71) apresentou positividade; com relação ao *bla*_{GES} observou-se que 2 isolados dos 54 testados (3,92%) carregavam o gene, após sequenciamento e análise *in silico* verificou-se que se tratava da GES-1; a tipagem molecular por ERIC-PCR demonstrou que os dois isolados são geneticamente relacionados. Esses achados possuem importância epidemiológica molecular dado que o gene *bla*_{GES} em *P.aeruginosa* ainda não foi descrito no nordeste Brasileiro e o gene *bla*_{TEM} em *P.aeruginosa* não foi relatado no Brasil; e portanto, servem de alerta para uma possível disseminação desses genes que contribuem de forma expressiva na resistência apresentada por isolados de *P.aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. beta-Lactamases. Farmacorresistência Bacteriana. Reação em cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacteria known to cause opportunistic infections in different sites of the human body has especially highlighted infections of the airways. These pathogens are intrinsically resistant to many classes of antimicrobial agents, and remarkable ability to acquire other resistance mechanisms, such as the action of beta-lactamase enzymes. The genes encoding these enzymes are usually acquired through gene transfer mechanisms for intra and/or inter-species. The action of these beta-lactamases with other resistance mechanisms is often the reason for treatment failure during treatment of infections. Therefore, this study aimed to determine the genotypic frequency of beta-lactamase ESBL (Extended Spectrum Beta-lactamases) in *P. aeruginosa* isolates from the Hospital of Clinics of Pernambuco (HC-UFPE). 159 isolates had their DNA extracted by Brazol kit. DNA obtained from extraction was quantified and diluted to initiate genetic research by PCR. The isolates were selected for molecular research in accordance with the resistance profile. For *bla*_{TEM} gene 1,41% (1/71) were positive, with respect to *bla*_{GES} revealed that 2 of the 54 isolates tested (3,92%) carried the gene after sequencing and *in silico* analysis, it was found that GES-1; molecular typing by ERIC-PCR showed that these two isolates are genetically associated. These findings have molecular epidemiological importance because *bla*_{GES} gene in *P. aeruginosa* has not been described in the northeast from Brazil and *bla*_{TEM} gene in *P. aeruginosa* has not reported in Brazil; and therefore, serve as a warning for a possible spread of these genes that contribute significantly in the resistance of *P. aeruginosa* isolates.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. beta-Lactamases. Drug Resistance, Bacterial. Polimerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática da ação das enzimas ESBLs sobre os antibióticos beta-lactâmicos.....	21
Figura 2. Comparação entre o gene <i>bla</i> _{KLUA-1} e os diferentes tipo de CTX-M.....	24
Figura 3. Representação esquemática da extração de DNA utilizando o Kit brazol.....	30
ARTIGO	
Figura 1. Gel de agarose representado a amplificação do gene <i>bla</i> _{GES} (P118HC e P119HC) (à esquerda). Gel de agarose mostrando a relação clonal entre os dois isolados de <i>P.aeruginosa</i> produtores de GES (à direita).....	50
Figura 2. Gel de agarose representando a PCR positiva para o gene <i>bla</i> _{TEM}	51

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Nomenclatura e epidemiologia de ESBLs tipo GES.....	26
Tabela 2. Primers usados para amplificação dos genes <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	31

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	Brain Heart Infusion
<i>Bla</i>	Gene codificante de beta-lactamase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DIP	Doenças Infecciosas e Parasitárias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
ESBL	Extended Spectrum Beta-lactamase
GES	Guiana beta-lactamase de espectro estendido
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -Carbapenemase
LB	Luria Bertani
MBL	Metalo-Beta-lactamase
MDR	Multidroga resistente
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
URCC	Unidade de Recuperação de Cirurgia Cardíaca
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	Extensivamente droga resistente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : um patógeno oportunista resistente	18
2.2 Mecanismos de resistência intrínsecos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.2.1 Mecanismos de resistência adquiridos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e antimicrobianos	20
2.4 Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)	21
2.4.1 ESBLs: Família TEM e SHV	22
2.4.2 ESBLs: Família CTX-M	23
2.4.3 ESBLs: Família GES	25
2.4.4 Epidemiologia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtora de ESBLs	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Desenho do Estudo	29
4.2 Local do Estudo	29
4.3 Padronização das técnicas empregadas	29
4.3.1 Armazenamento dos isolados bacterianos	29
4.3.2 Extração de DNA total	30
4.3.3 Condições para detecção dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , através de PCR	31
4.3.4 Condições para detecção dos gene <i>bla</i> _{GES} através de PCR	32
4.3.5 Eletroforese em gel de agarose	32
4.3.6 Determinação da relação clonal realizada por ERIC-PCR	32
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
6. CONCLUSOES	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICES	43
APÊNDICE A – Artigo	44

APÊNDICE B –Tabela representando os isolados de <i>P.aeruginosa</i> obtidos para este estudo e seus respectivos tipos de amostra e setor proveniente.....	56
ANEXOS	65
ANEXO A - Registro no Comitê de Ética nº 009/11	66
ANEXO B - Adendo do Registro no Comitê de Ética nº 009/11.....	67

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa que cresce no solo, pântanos e ambientes marinhos costeiros, bem como em plantas e tecidos animais. Dentre o gênero *Pseudomonas* a emergência da espécie *P. aeruginosa* como um patógeno oportunista pode ser uma consequência da sua resistência aos antimicrobianos e desinfetantes que conseguem eliminar outras bactérias ambientais (STOVER et al., 2000). Seu genoma possui cerca 6.300.000 pares de bases (6,3 Mpb) o que é significativamente maior que a maioria dos genomas bacterianos, e apresenta cerca de 5.570 códigos abertos de leitura (ORFs-“Open reading frames”), o que torna sua complexidade genética próxima de um simples eucarioto como por exemplo *Saccharomyces cerevisiae*, cujo genoma codifica cerca de 6.200 proteínas (STOVER et al., 2000).

Como patógeno oportunista *P. aeruginosa* está geralmente envolvida em infecções respiratórias, do trato urinário, gastro-intestinais, otite média, e bacteremias em pacientes imunocomprometidos (e.g.:pacientes oncológicos, vítimas de queimaduras, portadores do vírus HIV e de fibrose cística). Essas infecções resultam de morbidade e mortalidade significantes. No século XXI, *P. aeruginosa* desempenha um papel de destaque como agente de infecções hospitalares (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2014).

Dentre as bactérias gram-negativas, *P.aeruginosa* possui maior facilidade em desenvolver resistência a antimicrobianos (FIGUEIREDO et al., 2007). Essa capacidade de adquirir resistência por vários mecanismos, sejam eles intrínsecos ou por aquisição de determinantes de resistência transferíveis, muitas vezes é desenvolvida durante o tratamento da infecção, algo que geralmente é inevitável por ser inerente a espécie (NEVES et al., 2011; TIAN et al., 2011). Em ambiente hospitalar, *P.aeruginosa* tem sido isolada de diferentes superfícies abióticas como equipamentos de ventilação e intubação, lentes de contato e até piscinas de hidroterapia (MORALES et al., 2012).

A produção de enzimas tipo do ESBLs (Extended Spectrum Beta-lactamase) por parte de isolados clínicos de *P. aeruginosa* é um importante mecanismo de resistência nessa espécie e confere resistência aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos de amplo espectro (e.g.: cefalosporinas de terceira e quarta

geração). A presença de *P.aeruginosa* carreando genes codificantes de ESBLs vem sendo documentada em vários lugares do mundo, como por exemplo, China, Reino Unido, Turquia e também no Brasil. (JIANG et al., 2006; WOODFORD et al., 2008) YAKUPOGULLARI et al., 2008; UMADEVI, et al, 2011)

No Brasil, *P.aeruginosa* é um dos principais agentes causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) onde os diversos estudos apontam para uma disseminação clonal da espécie (FREITAS; BARTH, 2002; GALES; TORRES, 2004; SADER et al., 1993). Também é importante salientar a disseminação de clones de alto risco extensivamente droga-resistentes (XDR) (CABOT et al., 2012) *P.aeruginosa* tem sido citada no grupo dos patógenos denominado “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, espécies de *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) conhecido como as mais importantes ameaças emergentes à saúde deste século (KANJ; KANAFANI, 2011)

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*: um patógeno oportunista resistente

O gênero *Pseudomonas* compreende bacilos gram-negativos, aeróbios, com motilidade unipolar e possui cerca de 140 espécies onde a maioria são saprófitas. As principais espécies causadoras de doenças em humanos estão associadas com infecções oportunistas. Estas espécies incluem *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.cepacia*, *P.stutzeri*, *P.maltophilia* e *P.putrefaciens* (NADEEM et al.,2009). *Pseudomonas aeruginosa* tem recebido maior atenção por estar mais frequentemente envolvida em infecções hospitalares, sendo um patógeno frequentemente associado a complicações clínicas graves. Esta bactéria pode acometer qualquer região do corpo de um paciente susceptível causando infecções de pele em pacientes vítimas de queimaduras, infecções em neonatos, infecções oculares, em feridas, ossos e articulações, infecções do trato urinário e, mais frequentemente, no trato respiratório (NADEEM et al.,2009; PIRES et al., 2009).

Infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística geralmente tem *P. aeruginosa* como a principal causa de morbidade e mortalidade, devido a sua permanência nas vias aéreas e a conversão para a variante mucóide do patógeno, mesmo diante de intensa antibioticoterapia (STEHLING; SILVEIRA; LEITE, 2008). Altas taxas de mortalidade (entre 20% e 38%) também vêm sendo atribuídas a esse micro-organismo nas infecções da corrente sanguínea adquiridas em ambiente hospitalar (FEHLBERG et al., 2012).

Além disso, *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a diversos agentes antimicrobianos e usualmente desenvolve resistência a outros agentes antimicrobianos durante o tratamento da infecção com antibióticos. Dentre os mecanismos de resistência intrínsecos podemos citar a expressão constitutiva tanto de beta-lactamase do tipo AmpC como das bombas de efluxo, combinadas com a baixa permeabilidade da membrana externa, e combinados a estes, é notável a habilidade em adquirir resistência através de mutações, ou através da transferências de genes provenientes de outras espécies (LIVERMORE, 2002; STRATEVA; YORDANOV, 2009; TIAN et al., 2011; XAVIER et al., 2010).

2.2 Mecanismos de resistência intrínsecos em *Pseudomonas aeruginosa*

P.aeruginosa é intrinsecamente resistente a uma variedade de antimicrobianos (POOLE, 2011). A Expressão constitutiva da beta-lactamase cromossomal do tipo AmpC e sistemas de bombas de efluxo, combinados com a redução da permeabilidade da membrana externa através da diminuição ou ausência da expressão de porinas são exemplos de mecanismos de resistência intrínsecos existentes em *P. aeruginosa* (STRATEVA & YORDANOV, 2009).

Beta-lactamases do tipo AmpC são enzimas não sofrem a ação dos inibidores de beta-lactamases (e.g.: ácido clavulânico) e seus genes são de origem cromossomal, no entanto podem apresentar superexpressão induzível aumentando até cerca de 1000 vezes sua expressão quando na presença de antibióticos (BAGGE et al., 2002; MELETIS,BAGKERI, 2013). Em *P.aeruginosa*, os sistemas de efluxo contribuem para o fenótipo de resistência a diversos antimicrobianos de importância clínica, além disso, acredita-se que alguns sistemas de efluxo também estejam envolvidos com a patogenicidade, ou seja, na colonização e sobrevivência da célula bacteriana dentro do hospedeiro (LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013; PIDDOCK, 2006).

A diminuição ou até mesmo ausência da expressão do gene *oprD* que codifica a porina OprD, tem importante contribuição para a resistência inclusive aos carbapenêmicos, principalmente imipenem (LIU et al., 2013).

2.2.1 Mecanismos de resistência adquiridos em *Pseudomonas aeruginosa*

P.aeruginosa consegue desenvolver resistência a uma grande variedade de agentes antimicrobianos. A resistência adquirida é uma consequência de mutações no seu DNA ou pela aquisição de genes, através de processos de transferência genética horizontal, e essa resistência pode ocorrer durante a terapia antimicrobiana (POOLE, 2011). As mutações geralmente são responsáveis pela superexpressão de beta-lactamases endógenas ou dos sistemas de bombas de efluxo, ou até a diminuição da expressão de porinas específicas e modificações de sítios-alvos de antimicrobianos, enquanto que a aquisição de genes de resistência está principalmente associada às beta-lactamases (e.g.: ESBLs, KPC, MBLs) e às enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (MELETIS; BAGKERI, 2013).

Carbapenemases do grupo B de Ambler que possuem um íon zinco (Zn^{2+}) no centro ativo, são encontradas em isolados de *P.aeruginosa* no mundo inteiro e são chamadas de metalo beta-lactamases (MBLs), esses genes são encontrados em integrons transferíveis (GISKE et al., 2009).

A *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), enzima que pertence ao grupo 2f da classificação funcional de Bush e Jacoby, inicialmente apenas descrita em *Klebsiella*, o gene *bla_{KPC}* já foi descrito em isolados de *P.aeruginosa* inclusive no Brasil, demonstrando a capacidade de disseminação dessa enzima em diferentes espécies bacterianas (BUSH; JACOBY, 2010; JÁCOME et al., 2012)

2.3 *Pseudomonas aeruginosa* e antimicrobianos

Há um número limitado de antimicrobianos considerados ativos contra *P. aeruginosa*, incluindo penicilinas anti-pseudomonas (piperaciclina e ticarciclina) e cefalosporinas, carbapenêmicos e fluoroquinolonas, principalmente ciprofloxacina (CARMELI et al., 1999) (CLSI, 2013). Agentes antimicrobianos usualmente utilizados no tratamento das infecções causadas por *P.aeruginosa* são ceftazidima e imipenem, no entanto os isolados clínicos vêm frequentemente demonstrando resistência a esses fármacos através da aquisição de genes que codificam enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e/ou metalo beta-lactamases (MBLs).

A detecção da ESBL do tipo GES, mais especificamente a GES-5, subtipo que demonstrou ampliação da sua capacidade hidrolítica para carbapenêmicos vem adquirindo importância (CASTILLO-VERA et al., 2012; PICÃO; GALES, 2007). Devido às bactérias produtoras de enzimas ESBLs, o uso de antibióticos da classe dos beta-lactâmicos fica restrito apenas aos carbapenêmicos (PICÃO; GALES, 2007). Entretanto, os primeiros isolados de *P.aeruginosa* produtores de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) foram detectados no ano de 2007 na Colômbia (VILLEGAS et al., 2007). A partir de então, vários relatos ocorreram como nos Estados Unidos (POIREL et al., 2010), Trinidad e Tobago (AKPAKA et al., 2009), China (GE et al., 2011) e recentemente também no Brasil (JÁCOME et al., 2012). Essas enzimas do tipo KPC, que conferem resistência aos carbapenêmicos, e juntamente com as ESBLs fazem com que restem apenas as polimixinas como as únicas alternativas terapêuticas, que são polipeptídeos que apresentam

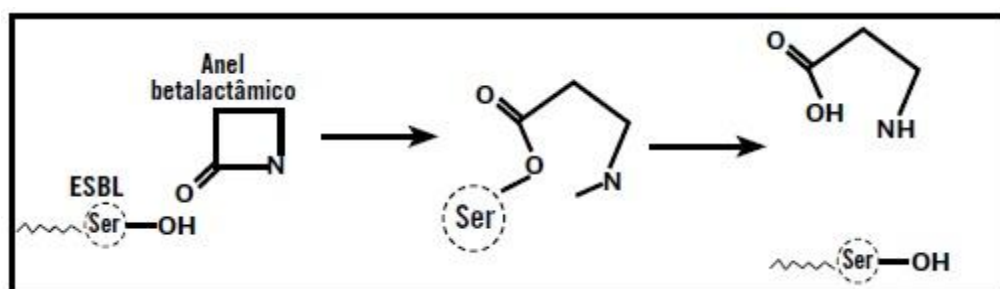
nefrotoxicidade e até mesmo neurotoxicidade para o paciente. (PICÃO & GALES, 2007) (MENDES; BURDMANN, 2009)

A Sociedade de Doenças Infecciosas da América apontou seis patógenos para os quais há poucos ou nenhum fármaco com eficácia que estão no estado final de desenvolvimento, ainda que seja feita uma escolha adequada, o tratamento dessas infecções é limitado; são eles: membros da família Enterobacteriaceae produtores de ESBL, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*-vancomicina resistente, *Staphylococcus aureus*-metilicina resistente, e espécies de *Aspergillus* (LEE; BAE; LEE, 2011)

2.4 Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)

As Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas de resistência pertencentes à classe das beta-lactamases que tem ação sobre os antibióticos beta-lactâmicos, e em geral, são capazes de hidrolisar penicilinas (ex: ampicilina e piperaciclina), cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração e o monobactâmico aztreonam. ESBLs (particularmente as derivadas da família TEM e SHV, que são as beta-lactamases clássicas) são prontamente inibidas pelos inibidores de beta-lactamases disponíveis comercialmente (e.g.: ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam) fato que não acontece com a mesma eficácia nas ESBLs que não pertencem às famílias TEM e SHV (PEREZ et al, 2007). As ESBLs agem clivando o anel de beta-lactâmico através de uma ligação não covalente da hidroxila livre ao lado do sítio ativo do resíduo de serina, a hidrólise finalmente libera a enzima ativa e o antimicrobiano hidrolisado inativo (DA SILVA; LINCOPAN, 2012; DE SOUSA JÚNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

Figura 1-Representação esquemática da ação das enzimas ESBLs sobre os antibióticos beta-lactâmicos.



FONTE: DA SILVA; LINCOPAN (2012)

Em meados dos anos 80 evidenciou-se a resistência às cefalosporinas de amplo-espectro em bactérias gram-negativas tendo como base dessa resistência a produção de beta-lactamases. Dentre as primeiras ESBLs as mesmas foram descritas em bactérias relacionadas com infecções graves, que causaram problemas clínicos significantes estavam as mutantes derivadas das beta-lactamases de espectro restrito SHV-1 e TEM-1. Os genes codificantes dessas enzimas mutantes estão presentes em elementos genéticos móveis facilitando a disseminação entre os patógenos (LIVERMORE, 1995). De acordo com a mais recente classificação funcional das beta-lactamases proposta por Karen Bush e George Jacoby em 2010, as ESBLs pertencem aos grupos 2be (ex.: TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1 E VEB-1); 2ber (ex.: TEM-50). Até então, haviam sido detectadas 172 enzimas da família TEM, 127 da família SHV, 90, 5 e 7 enzimas das famílias CTX-M, PER e VEB, respectivamente. Com relação à família GES, foram detectadas 15 enzimas e elas foram classificadas no grupo 2f (Carbapenemases) com uma ressalva quanto à GES-1 que ao contrário das demais, demonstrou pouca interação com o imipenem, (BUSH & JACOBY, 2010).

Em 2005, Poirel e colaboradores detectaram em *P. aeruginosa* na enzima GES-9 a mutação de uma glicina no lugar de uma serina na posição 243 não demonstrou atividade contra carbapenêmicos, apesar de possuir a mesma mutação (gly170ser) que confere atividade carbapenemase a outras enzimas da mesma família, por exemplo GES-2, GES-3 e GES-4 (POIREL *et al*, 2005). Mais de 430 ESBLs foram caracterizadas sendo muitas delas descritas no Brasil (DA SILVA; LINCOPAN, 2012).

2.4.1 ESBLs: Família TEM e SHV

As enzimas TEM e SHV foram descritas nos início dos anos 80, o nome “TEM” é uma contração de Temoniera, nome do paciente cuja bactéria resistente foi isolada, já “SHV” faz alusão ao grupo sulfidril variável (do inglês, “sulphydryl variable”) que é uma propriedade bioquímica da enzima, portanto não há um consenso em relação ao nome das beta-lactamases de uma forma geral (HERITAGE *et al.*, 1999; POIREL *et al.*, 2000). Sua importância se deve a que a maioria das ESBLs são derivadas dessas beta-lactamases de espectro restrito do tipo TEM-1 e TEM-2 e SHV-1, que são penicilinases e passaram por uma ou mais

substituições de aminoácidos ao redor do seu sítio ativo o que explica a extensão do seu perfil de hidrólise (GNIADKOWSKI, 2001; MEDEIROS, 1997).

A prevalência dessas beta-lactamases em populações de enterobactérias hospitalares, tem refletido, por exemplo, num índice de resistência à ampicilina de cerca de 50% em *Escherichia coli*. (GNIADKOWSKI, 2001). Enzimas do tipo TEM e SHV são bastante comuns em bactérias da família Enterobacteriaceae e foram identificadas em isolados de *P.aeruginosa* entre 1996 e 2002 (PICÃO & GALES, 2007).

Em 1999, variantes com espectro estendido como TEM-42 e SHV2a já haviam sido relatadas em poucos isolados de *P.aeruginosa* na França (POIREL et al., 1999). Estudos de clonagem e sequenciamento realizados na França, relataram um isolado de *P.aeruginosa* carreando o gene *bla*_{TEM-21}, que faz parte de transposon Tn801 de origem cromossomal interrompido por um IS6100, demonstrando que esses genes possuem as mais variadas origens (DUBOIS et al., 2002)

Outras variantes da família TEM, também foram descritas em *P.aeruginosa* na França: TEM-4, TEM-21, TEM-24. Quanto a família SHV, além SHV2a, já citada, foram encontrados isolados de *P.aeruginosa* produtores de SHV-5 e SHV-12 na Tailândia (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003;)

2.4.2 ESBLs: Família CTX-M

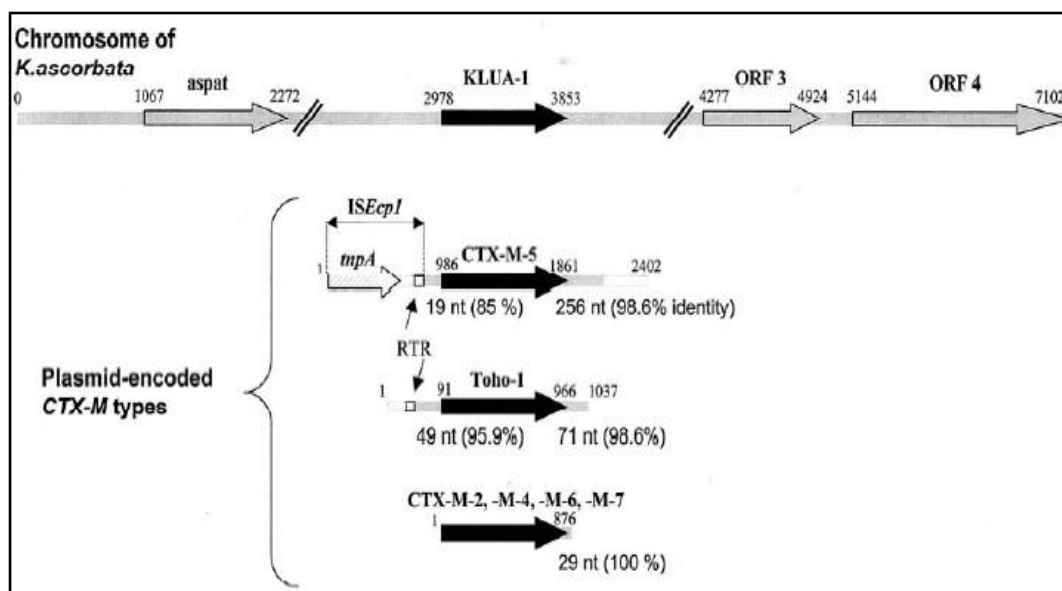
CTX-M é um grupo de beta-lactamases, amplamente disperso no mundo inteiro, essas enzimas foram inicialmente relatadas na segunda metade dos anos 1980, no entanto sua dispersão entre as bactérias por diversas partes do mundo aumentou drasticamente desde 1995. As enzimas CTX-M, receberam esse nome em referência a sua atividade hidrolítica acentuada contra cefotaxima além de outras cefalosporinas de amplo espectro. (BONNET, 2004). Na Alemanha, no início do ano de 1989, foi relatada uma *E. coli* resistente a cefotaxima, que produzia uma enzima não pertencente a família TEM nem SHV de ESBLs, a enzima foi então designada CTX-M-1 (BAUERNFEIND, et al 1990).

Um estudo filogenético demonstrou que há cinco principais grupos de enzimas CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTXM-25). Os membros

de cada grupo compartilham >94% de identidade, já entre membros de grupos distintos observou-se <90% de identidade (BONNET, 2004).

Estudos revelam que as enzimas CTX-M tem como origem uma beta-lactamase cromossomal *bla*_{KLUA} encontrada em *Kluyvera ascorbata* que confere a essa bactéria baixos níveis de resistência as penicilinas, cefalotina e cefuroxima. Observou-se que o gene *bla*_{KLUA} compartilha 98,6% de identidade com CTX-M-5 e Toho-1 (que é um tipo de cefotaximase), e 100% de identidade com CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-6 e CTX-M-7 (Figura 2) (HUMENIUK et al., 2002).

Figura 2: Comparação entre o gene *bla*_{KLUA-1} e os diferentes tipo de CTX-M



FONTE: HUMENIUK, et al (2002).

No Brasil, a enzima CTX-M-2 já foi identificada em um isolado de *P. aeruginosa* proveniente de uma amostra de hemocultura de uma paciente, quatro dias após seu óbito devido um choque séptico (PICÃO et al., 2009)

2.4.3 ESBLs: Família GES

GES, nome dado a beta-lactamase de espectro estendido da Guiana, é outra família de ESBLs não pertencente à família TEM e SHV que pertence a classe A de Ambler e vem emergindo no mundo inteiro (WELDHAGEN *et al*, 2006). Na classificação das beta-lactamases proposta por Bush e Jacoby, a GES aparece no grupo 2f e até então possuía um total de 15 representante (WELDHAGEN, 2006) (BUSH & JACOBY, 2010).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae* ORI-1) que carregava o gene *bla*_{GES} foi isolada em 1998, na França, a partir de uma amostra de swab retal de uma paciente do sexo feminino de apenas um mês de idade, que havia sido anteriormente hospitalizada no Hospital de Caiena, na cidade de Caiena situada na Guiana Francesa. Este isolado abrigava um plasmídeo não-transferível (pTK1) que confere um perfil de resistência às cefalosporinas de amplo espectro antagonizado por a adição de ácido clavulânico, tazobactam, ou imipenem (POIREL *et al.*, 2000). Hoje se sabe que essa primeira representante da família GES, denominada GES-1, possui atividade limitada contra o imipenem (BUSH & JACOBY, 2010).

Desde o ano 2000, vários novos tipos de GES vem sido descritas e caracterizadas das diversas regiões do mundo (WELDHAGEN, 2006). A variante GES-2 foi descrita num isolado de *P.aeruginosa* proveniente de amostras de hemocultura na África do Sul, e sua diferença em relação à GES-1 consiste em uma substituição de uma asparagina no lugar de uma glicina na posição 170 que corresponde a região do “loop” ômega das enzimas da classe A de Ambler, essa mutação conferiu maior capacidade hidrolítica contra o imipenem (POIREL *et al.*, 2001) Em 2006 na China, a variante GES-5 foi descrita pela primeira vez em *P.aeruginosa*, apresentando 3 mutações nucleotídicas silenciosas em relação à GES-5 descrita em *Escherichia coli* (WANG *et al.*, 2006).

GES-1 pode ser considerada a variante de ESBL tipo GES mais difundida, pois foi posteriormente descrita na Argentina, Portugal, África do Sul, França e também no Brasil. GES-1 foi encontrada em duas espécies bacterianas diferentes, *K.pneumoniae* e *P.aeruginosa*. Em todos os casos relatados, GES-1 está associada ao integron de classe 1 (WELDHAGEN *et al*, 2006). Na América do Sul, há relatos de

ESBLs tipo GES na Argentina e na Colombia por exemplo (MARTÍNEZ; ESPINAL; MÁTTAR, 2007; PIERSIGILLI et al., 2009)

Tabela 1: Nomenclatura e epidemiologia de ESBLs tipo GES

Designation	GenBank no.	Country of origin	Isolated from other countries	Bacterial host species
GES-1	AF156486	French Guiana	Brazil, Portugal, Argentina, South Africa, France	<i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>
GES-2	AF326355	South Africa	Argentina	<i>P. aeruginosa</i>
GES-3	AB113580	Japan		<i>K. pneumoniae</i>
GES-4	AB116260	Japan		<i>K. pneumoniae</i>
GES-5 ^a	AY494717	Greece	Korea	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>
GES-6 ^b	AY494718	Greece		<i>K. pneumoniae</i>
GES-7 (IBC-1)	AF208529	Greece		<i>E. cloacae</i>
GES-8 (IBC-2)	AF329699	Greece		<i>P. aeruginosa</i>
GES-9	AY920928	France		<i>P. aeruginosa</i>

FONTE: WELDHAGEN (2006)

Até o momento no Brasil, há relatos de *P.aeruginosa* carreando o gene *bla*_{GES} nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Amazônia, cujo primeiro data de 2002 numa paciente que desenvolveu infecção no sítio cirúrgico após histerectomia, o isolado era produtor de GES-1. No Rio de Janeiro os isolados também eram produtores de GES-1. Outros casos em São Paulo detectaram as variantes GES-1 e GES-5 sendo o mais recente foi em 2012, GES-5 também foi descrita na região amazônica do Brasil, fato que preocupa, pois demonstra que os isolados circulantes produtores de GES-1 podem ter sofrido mutação. (DA FONSECA et al., 2007; PELLEGRINO et al., 2006; POLOTTO et al., 2012)

2.4.4 Epidemiologia de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de ESBLs

Existem relatos da ocorrência de *P.aeruginosa* produtoras de ESBLs em todos os continentes (PICÃO & GALES, 2007). A primeira ESBL relatada em *P.aeruginosa* foi de um isolado produtor de PER-1 proveniente do trato urinário de um paciente de um hospital francês em 1991 e era inibida por ácido clavulânico, a enzima foi posteriormente encontrada na Síria, Irã, Iraque, Leste Europeu, França, Bélgica e Itália (NORDMANN et al., 1993; PICÃO & GALES, 2007). Entre 1996 e

2002 foram detectadas *P.aeruginosa* produtoras de TEM e SHV, a isolado clínico produtor da variante TEM-42 foi descrito na França obtido da pele de um paciente com graves queimaduras (MUGNIER et al., 1996; PICÃO & GALES, 2007). Num hospital da Tailândia em 1999 foram detectadas duas amostras de *P.aeruginosa* produtoras de VEB-1, e também uma variante VEB-3 na China em 2006 (GIRLICH et al., 2001; PICÃO & GALES, 2007). Na França em 1998, o gene *bla*_{GES-1} foi encontrado em um isolado de *K.pneumoniae* proveniente de “swab” retal de uma paciente previamente internada na Guiana Francesa (POIREL et al, 2000). Em 1999, também na França, foi descrita a presença de GES-1 em *P.aeruginosa* numa amostra de escarro de uma paciente de 46 anos internada (DUBOIS et al, 2002).

A primeira ESBL detectada em *P.aeruginosa* no Brasil foi proveniente de um isolado carreando o gene *bla*_{GES-1}, obtida de uma infecção do sítio cirúrgico de uma paciente de 63 anos internada num hospital em São Paulo que havia sido submetida à histerectomia devido a uma neoplasia do endométrio. A paciente estava sendo tratada empiricamente com Polimixina B/ Vancomicina, que conseguiu erradicar a infecção, porém ela veio a óbito após três meses de permanência na UTI. (CASTANHEIRA et al, 2004). Em 2005, foi detectada a produção de CTX-M-2 em *P.aeruginosa* no Brasil, o isolado foi obtido de uma hemocultura positiva, cuja paciente estava internada com suspeita de pneumonia, outras enzimas da família CTX-M já haviam sido descritas em *P.aeruginosa* em países como Holanda e Bolívia (PICÃO et al, 2009). Todos esses relatos demonstram o quanto é imprescindível a detecção dessas enzimas amplamente disseminadas pelo mundo e que conferem ampla resistência aos bacilos gram-negativos, em especial a *P.aeruginosa*, foco do presente estudo.

3. OBJETIVOS

3.1-Objetivo geral

Determinar a frequência genotípica das Beta-lactamases de Espectro Estendido (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}) em isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes do Hospital das Clínicas-UFPE, durante o período de abril de 2011 a maio de 2013.

3.2- Objetivos específicos

- Avaliar os perfis de susceptibilidade dos isolados de *P.aeruginosa* procedentes do Hospital das Clínicas-UFPE;
- Realizar a pesquisa molecular dos genes codificantes de ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES})
- Correlacionar os dados moleculares com o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.
- Descrever os dados microbiológicos e moleculares dos isolados de acordo com a procedência clínica e setor hospitalar.

4. METODOLOGIA

4.1-Desenho do estudo

Estudo descritivo de base laboratorial, onde foram realizadas técnicas de biologia molecular para detecção dos genes de resistência em isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes do Hospital das Clínicas-UFPE, obtidos entre abril de 2011 a maio de 2013. As metodologias utilizadas seguiram protocolos específicos contemplados em artigos científicos sendo realizadas as devidas modificações quando necessário.

4.2-Local do estudo

Os isolados foram obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas de Pernambuco, sendo este o hospital-escola da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Ciências da Saúde (CCS). A análise dos isolados para detecção dos genes codificantes de ESBLs foi realizada no laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical- UFPE.

4.3-Padronização das técnicas empregadas

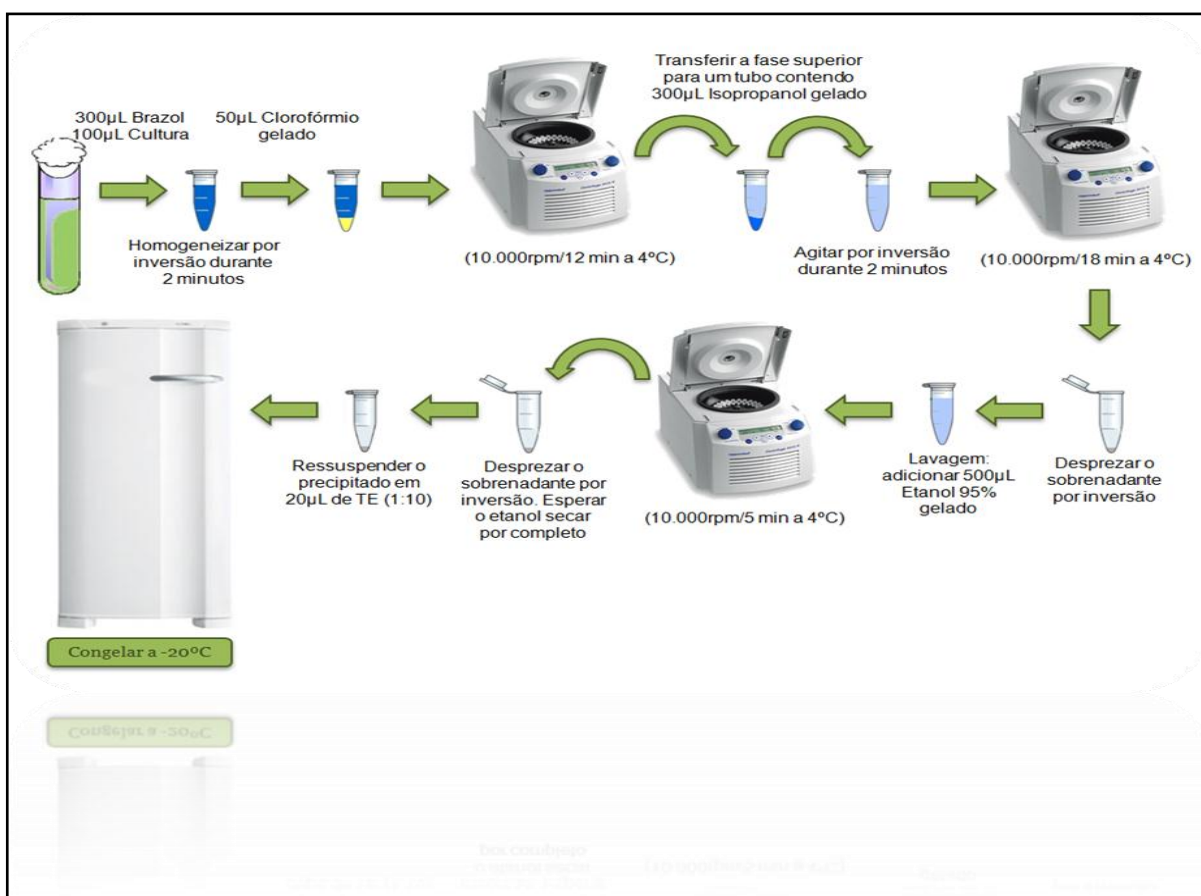
4.3.1 Armazenamento dos isolados bacterianos

Os isolados de *P.aeruginosa* obtidos do Laboratório de Bacteriologia do HC-UFPE foram inoculados em tubos de tampa rosqueável contendo meio Ágar Casoy inclinado e transportados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular no Departamento de Medicina Tropical- UFPE. Após a incubação em estufa a 37°C durante 18 a 24 horas, os isolados foram semeados em meio Ágar Cetrimide, que é seletivo para o isolamento de *P.aeruginosa*, neste meio de cultura se observam as características fenotípicas dessa bactéria, como a produção de pigmentos (pioverdina e piocianina), a morfologia da colônia e odor característico. Os isolados de *P. aeruginosa*, portanto, foram estocados em microtubos com glicerol 20% e caldo BHI em freezer a -20 °C.

4.3.2 Extração de DNA total

Após incubação em caldo LB num período de 18 a 24 horas, a extração do DNA total foi realizada utilizando o kit Brazol (LGC-Biotecnologia), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, como mostra a figura 3 abaixo:

Figura 3: Representação esquemática da extração de DNA utilizando o Kit brazol.



FONTE: JÁCOME, P.R.L.A. 2012

O DNA bacteriano foi devidamente quantificado através do nanodrop (espectrofotometria) em uma faixa de comprimento de onda entre 260 a 280 nm.

4.3.3 Condições para detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, através de PCR

A técnica de PCR foi empregada de acordo com o perfil de resistência dos isolados em estudo para pesquisa molecular dos genes codificantes das enzimas ESBLs: TEM, SHV, CTX-M. Os “primers” utilizados estão dispostos na tabela abaixo e a técnica foi realizada de acordo com os autores. A reação foi preparada para atingir um volume total de 25µl, contendo 5ng de DNA, 2.0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega, USA), 200µM de cada dNTP (Promega, USA), 1.5mM de MgCl₂, 1µM de cada “primer” e o tampão de reação 1X (concentração final). As reações foram levadas ao termociclador (Biosystems) e após de aquecimento prévio (95°C por 5min), seguiram-se 35 ciclos de 1min a 95°C, 1min na temperatura específica cada para cada “primer” (tabela 2) e 1min a 72°C. A extensão final foi de 10min a 72°C para os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}. (CABRAL *et al*, 2012).

Tabela 2: Primers usados para amplificação dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}.

4.3.4 Condições para detecção dos gene *bla*_{GES} através de PCR.

Nome do primer	Sequência (5´-3´)	Temperatura de anelamento
CTX-MA1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	61°C
CTX-MA2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG	
CTX-M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	60°C
CTX-M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	
CTX-M25U	ATGATGACTCAGAGCATTCG	62°C
CTX-M25L	TGGGTTACGATTTTCGCCGC	
SHV. For	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	62°C
SHV. Rev	AGCGCGAGAAGCATCCTG	
T1F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	57°C
T2R	GACAGTTACCAATGCTTAATC	

4.3.4 Condições para detecção dos gene *bla*_{GES} através de PCR.

Os isolados que apresentaram resistência à carbapenêmicos foram submetidos à técnica de PCR para pesquisa do gene *bla*_{GES}. A reação foi preparadas para um volume final de 25 µL por tubo, compreendendo: 10 ng DNA genômico, 10 pmol de cada “primer”, tampão 1x, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e 2U da enzima Taq DNA polimerase. A reação para amplificação do gene *bla*_{GES} utilizou as seguintes condições de ciclagem: 3 min a 93°C de aquecimento prévio; seguido de 40 ciclos de 1 min a 93°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, sendo que o última extensão foi de 7 min a 72°C. (WANG *et al*, 2006). Os “primers” utilizados foram: GES1A 5'-ATGCGCTTCATTACGCAC-3' e GES-1B, 5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3'.

4.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da reação de PCR foram aplicados num volume de 5µL no gel de agarose a 1% para posterior visualização dos “amplicons” referentes aos genes pesquisados, através de uma eletroforese. O gel estava submerso em tampão TBE 0,5x e foi submetido a uma voltagem constante de 100 v. Um marcador de 100pb (AMRESCO) foi utilizado como padrão de peso molecular. Os produtos da PCR foram adicionados de 1 µL do corante de DNA Blue. Após o término da eletroforese os “amplicons” foram visualizados sob luz ultravioleta e devidamente fotodocumentados.

4.3.6 Determinação da relação clonal realizada por ERIC-PCR.

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, contendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos “primers” (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3']; ERIC-2 [5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima Taq polimerase. As condições de ciclagens utilizadas na reação de ERIC-PCR foram: aquecimento inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 8 minutos. Após os 40 ciclos realizou-se uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72°C. Os produtos de ERIC-PCR foram corados com corante de DNA Green e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (DUAN *et al*, 2009).

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os isolados bacterianos foram coletados no período descrito no projeto, provenientes de pacientes internados das diversas enfermarias clínicas e cirúrgicas do Hospital em estudo. Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de ética do Centro de Ciências da Saúde bem como pelo seu respectivo adendo, número CAAE 0490.0.172.000-11. (Anexos A e B)

6. CONCLUSÕES

-Os isolados de *P.aeruginosa* provenientes do HC-UFPE apresentaram níveis de resistências a cefalosporinas de amplo espectro de 80,5%, aos carbapenêmicos de 33,96%; 51,57% foram resistentes ao monobactâmico aztreoan.

-Dos setenta e um isolados testados para o gene *bla*_{TEM}, apenas um foi positivo. No entanto, esse achado representa a disseminação desse gene entre *P.aeruginosa*. Dois isolados a carregavam o gene *bla*_{GES}, dentre 54 isolados testados. O isolados GES positivos apresentaram relação clonal mediante a ERIC-PCR e o seqüenciamento revelou que se tratava da variante GES-1, descrita apenas nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro.

-O isolado TEM- positivo foi sensível apenas à polimixina B e aos carbapenêmicos no teste de susceptibilidade, já os clones produtores de GES-1 foram considerados pan-resistentes por serem sensíveis apenas à Polimixina B.

-O isolado produtor de TEM foi obtido de um paciente da UTI de uma urocultura; os dois isolados GES-positivos foram provenientes de fragmentos de pé direito e esquerdo, o paciente estava internado no setor de clínica médica.

REFERÊNCIAS

AKPAKA, P. E. et al. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2670–1, ago. 2009.

BAGGE, N. et al. Constitutive High Expression of Chromosomal β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Caused by a New Insertion Sequence (IS 1669) Located in ampD. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3406–11, 2002.

BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum Beta-Lactamases: the CTX-M Enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–76, mar. 2010.

CABOT, G. et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6349–57, dez. 2012.

CARMELI, Y. et al. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1379–82, jun. 1999.

CASTILLO-VERA, J. et al. Unusual Diversity of Acquired β -lactamases in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Mexican Hospital. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 18, n. 5, p. 471–8, out. 2012.

DA FONSECA, E. L. et al. Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 576–7, mar. 2007.

DA SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

DE SOUSA JÚNIOR, M. A.; FERREIRA, EDVANA DOS SANTOS; CONCEIÇÃO, GILDÁSIO CARVALHO. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, n. 63, p. 152–174, 2004.

DUBOIS, V. et al. Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Carrying a bla TEM-21 Gene Located on a Chromosomal Interrupted Tn A Type Transposon. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3624–3626, 2002.

FEHLBERG, L. C. C. et al. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 18, n. 4, p. 402–7, ago. 2012.

FIGUEIREDO, E. A. P. DE et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 421–427, dez. 2007.

FREITAS, A. L. P.; BARTH, A. L. Antibiotic Resistance and Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*: Focus on Imipenem. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2002.

GALES, A. C.; TORRES, P. L. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in an Intensive Care Unit of a Teaching Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 267–271, 2004.

GE, C. et al. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1184–6, maio 2011.

GIRLICH, D. et al. Molecular Epidemiology of the Integron-Located VEB-1 Extended-Spectrum beta-Lactamase in Nosocomial Enterobacterial Isolates in Bangkok, Thailand. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 1, p. 175–182, 2001.

GISKE, C. G. et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 1–4, jan. 2009.

GNIADKOWSKI, M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 11, p. 597–608, nov. 2001.

HERITAGE, J. et al. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 309–318, 1999.

HUMENIUK, C. et al. Beta-Lactamases of *Klebsiella pneumoniae*, Probable Progenitors of Some Plasmid-Encoded CTX-M Types. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 3045–3049, 2002.

JÁCOME, P. R. L. D. A. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990, set. 2012.

JIANG, X. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 2990–5, set. 2006.

KANJ, S. S.; KANAFANI, Z. A. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 86, n. 3, p. 250–9, mar. 2011.

LAMERS, R. P.; CAVALLARI, J. F.; BURROWS, L. L. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. **PloS one**, v. 8, n. 3, jan. 2013.

LEE, J. H.; BAE, I. K.; LEE, S. H. New Definitions of Extended-Spectrum beta-Lactamase Conferring Worldwide Emerging Antibiotic Resistance. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 1, p. 216–232, 2011.

LIU, Y. et al. Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Chinese university hospital. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 19, n. 6, p. 463–8, dez. 2013.

LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–84, out. 1995.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 5, p. 634–40, 1 mar. 2002.

MARTÍNEZ, P.; ESPINAL, P.; MÁTTAR, S. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. **ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA**, v. 11, n. 1, p. 6–15, 2007.

MEDEIROS, A. A. Evolution and Dissemination of beta-Lactamases Accelerated by Generations of beta-Lactam Antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 19–45, 1997.

MELETIS, G.; BAGKERI, M. *Pseudomonas aeruginosa* : Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options. **Infection Control**, p. 33–56, 2013.

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 6, p. 752–759, 2009.

MORALES, E. et al. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. **BMC health services research**, v. 12, n. 1, p. 122, jan. 2012.

MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. January, p. 422, jan. 2014.

MUGNIER, P. et al. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2488–93, nov. 1996.

NADEEM, S. G. et al. Comparison of the in vitro susceptibility of Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **British Journal of medical Practitioners**, v. 2, n. 4, p. 35–39.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, ago. 2011.

NORDMANN, P. et al. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 962–9, maio 1993.

PELLEGRINO, F. L. P. C. et al. BlaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 251–3, ago. 2006.

PEREZ, F. A. E. THE CONTINUING CHALLENGE OF ESBLs. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 5, p. 459–469, 2007.

PICÃO, R. C. et al. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2225–6, maio 2009.

PICÃO, R. C.; GALES, A. C. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **INFECTOLOGIA**, n. 49, p. 79–84, 2007.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance. **Nature Publishing Group**, v. 4, n. August, p. 629–636, 2006.

PIERSIGILLI, A. L. et al. Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de β -lactamasa de espectro extendido en un centro privado de Córdoba. **Revista Chilena Infectología**, v. 26, n. 4, p. 331–335, 2009.

PIRES, E. J. V. C. et al. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 384–390, dez. 2009.

POIREL, L. et al. Extended-spectrum beta-lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical microbiology and infection**, v. 5, p. 651–652, 1999.

POIREL, L. et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 622–32, mar. 2000.

POIREL, L. et al. GES-2 , a Class A Beta-Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. **Antimicrobial agents and chemotherapy** v. 45, n. 9, p. 2598–2603, 2001.

POIREL, L. et al. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3072, jul. 2010.

POLOTTO, M. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 176, jan. 2012.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 65, jan. 2011.

SADER, H. S. et al. Epidemiologic Typing of Multiply Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from an Outbreak in an Intensive Care Unit. **DIAGN MICROBIOL INFECT DIS**, v. 17, p. 13–18, 1993.

STEHLING, E. G.; SILVEIRA, W. D. DA; LEITE, D. D. S. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 86–8, fev. 2008.

STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 , an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959–964, 2000.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. Pt 9, p. 1133–48, set. 2009.

TIAN, G.-B. et al. PME-1, an extended-spectrum β -lactamase identified in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2710–3, jun. 2011.

VILLEGAS, M. V. et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553–5, abr. 2007.

WANG, C. et al. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261–2, jun. 2006.

WELDHAGEN, G. F. GES: an Emerging Family of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 28, n. 19, p. 145–149, 2006.

WELDHAGEN, G. F.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* : Novel Developments and Clinical Impact. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2385–2392, 2003.

WOODFORD, N. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1265–8, dez. 2008.

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

YAKUPOGULLARI, Y. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 221–2, jan. 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Artigo

Estruturação do artigo de acordo com as normas do periódico Current Microbiology

Emergência de Beta-lactamases de Espectro Estendido em Isolados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* em Recife, Brasil

Emergence of Extended Spectrum Beta-lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Recife, Brazil

Valdemir Vicente da Silva Júnior, Laura Durão Ferreira, Lílian Rodrigues Alves, Adriane Borges Cabral, Marcelle Aquino Rabelo, Armando Monteiro Bezerra Neto, Ana Catarina de Souza Lopes, Maria Amélia Vieira Maciel.

Resumo: Setenta e um isolados de *P.aeruginosa* resistentes a cefalosporinas de terceira geração e aztreonam foram submetidos à pesquisa do gene *bla*_{TEM} e cinquenta e quatro isolados resistentes a carbapenêmicos foram submetidos à pesquisa do gene *bla*_{GES}. Na técnica de PCR detectamos que um isolado era produtor de *bla*_{TEM} (P97HC) e que dois deles (P118HC e P119HC) carregavam o *bla*_{GES}. Os dois isolados foram provenientes de amostras de pacientes internados num hospital universitário em Recife-Pernambuco, Brasil. O isolado positivo para TEM era sensível apenas a carbapenêmicos e polimixina B, já os isolados positivos para GES apresentaram sensibilidade apenas à polimixina B no teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA). Após detecção molecular do gene *bla*_{GES}, o produto da reação de PCR seguiu para o sequenciamento que revelou após análises *in silico* que tratava-se da variante GES-1 (GenBank KF679347). Os isolados foram submetidos à técnica de ERIC-PCR para avaliação do perfil clonal, onde foi verificada uma relação clonal entre os mesmos. Estes são os primeiros casos de ocorrência de ESBLs em *P.aeruginosa* no nordeste do Brasil. Isso mostra que o gene está se dispersando nesse micro-organismo pelo país, fato que merece uma atenção especial dado que essas enzimas conferem um amplo espectro de resistência, dificultando o tratamento das infecções por *P.aeruginosa*

Abstract: Seventy-one isolates of *P. aeruginosa* resistant to third generation cephalosporins and aztreonam were submitted to research *bla*_{TEM} gene and fifty-four isolates resistant to carbapenems were submitted to the research *bla*_{GES} gene. In PCR detected that it was an isolated producer *bla*_{TEM} (P97HC) and that two of them (P118HC and P119HC) carried the *bla*_{GES}. Two isolates were from specimens of patients in a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil . Isolate positive for TEM was sensitive only to carbapenems and polymyxin B, while positive isolates to GES were sensible only to polymyxin B in antimicrobial susceptibility testing (AST). After molecular detection of *bla*_{GES} gene, the product of the PCR reaction for sequencing that followed after *in silico* analysis revealed that this was the variant GES-1 (GenBank KF679347). The isolates were subjected to the technique of ERIC-PCR for evaluation of clonal profile, where a clonal relationship was observed between them. These are the first cases of occurrence of ESBLs in *P. aeruginosa* in northeast of Brazil. This it shows that the gene is dispersing this microorganism in the country a fact that deserves special attention because these enzymes confer a broad spectrum of resistance, making treatment difficulting infections by *P. aeruginosa*.

Valdemir Vicente da Silva Júnior,

Laura Durão Ferreira, Lílian Rodrigues Alves,

Adriane Borges Cabral,

Marcelle Aquino Rabelo,

Armando Monteiro Bezerra Neto,

Ana Catarina de Souza Lopes,

Maria Amélia Vieira Maciel.

Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil. E-mail: jrv1_1@hotmail.com

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno associado a infecções oportunistas que vem sendo relatado no mundo inteiro [2,37, 29]. O principal sítio de infecção são as vias aéreas, sendo por isso, frequentemente isolada de amostras de secreção traqueal. No entanto, sua versatilidade em adquirir resistência e capacidade de adaptação faz de *P.aeruginosa* um micro-organismo causador de diversos tipos de infecções relacionadas à assistência a saúde [28,38]. Mecanismos de resistências tanto intrínsecos quanto adquiridos são uma das causas mais recorrentes de falhas terapêuticas nas infecções por esses patógenos. Dentre os mecanismos intrínsecos merecem destaque, os sistemas de efluxo multidrogas, a redução da expressão de porinas e as beta-lactamases cromossomais do tipo AmpC [2,25].

Quanto às beta-lactamases adquiridas por mecanismos de transferência genética encontradas em *P.aeruginosa* podemos citar as metalo beta-lactamases (MBL), *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases, e as ESBLs, que são as beta-lactamases de espectro estendido inibidas por ácido clavulânico.[1,7] Algumas variantes da beta-lactamases clássicas TEM e SHV já foram descritas em *P.aeruginosa* (e.g.: TEM-4, TEM-21, TEM-42, SHV-2a, SHV-5) [27]. Dentre as ESBLs não derivadas das beta-lactamases de espectro restrito TEM-1, TEM-2 e SHV-1 encontramos as cefotaximases (CTX-M) e também a ESBL tipo GES [8,15].

Inicialmente descrita num isolado de *K. pneumoniae* na França proveniente de uma paciente previamente hospitalizada na Guiana Francesa, a enzima GES (Beta-lactamase de espectro estendido da Guiana) possui, segundo a atualização das beta-lactamases proposta por Bush e Jacoby em 2010, cerca de 15 variantes, sendo a GES-1 mais difundida entre os países [34]. A GES-1 apresenta pouca afinidade com o imipenem, porém mutações geraram variantes com atividade hidrolítica ampliada para carbapenêmicos, como por exemplo a GES-5. O primeiro relato de uma ESBLs num isolado de *P.aeruginosa* foi exatamente uma GES-1 proveniente de paciente submetida a histerectomia em São Paulo no ano de 2002 [35].

O presente trabalho teve por objetivo relatar a presença de ESBLs entre isolados clínicos de *P.aeruginosa* provenientes de pacientes internados num hospital universitário em Recife-PE, Brasil. Estes achados possuem importância epidemiológica, já que sabemos da facilidade de dispersão desses genes entre espécies de *P.aeruginosa*.

Materiais e Métodos:

Isolados Bacterianos

Um total de 159 isolados de *P.aeruginosa* provenientes de amostras clínicas (ponta de cateter, drenos, abscessos, ferida operatória, sangue e secreções diversas), de pacientes ambientados nos setores de risco (Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), clínicas cirúrgicas e serviço de hemodiálise/nefrologia) do Hospital das Clínicas de Pernambuco, foram coletados entre os anos de 2011 e 2013. De acordo com o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados, 54 demonstraram resistência a carbapenêmicos (imipenem e/ou meropenem) e foram selecionados para a pesquisa do gene *bla_{GES}*.

Extração do DNA total dos isolados

Os isolados previamente selecionados para o estudo foram incubados a uma temperatura de 37° entre 18 a 24 horas em tubos contendo caldo LB. Após o crescimento, os inóculos foram submetidos à um processo extração de DNA através do kit Brazol (LGC-Biotecnologia) segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi devidamente quantificado por espectrofotometria entre 260 a 280 nm de comprimento de onda

Condições para realização da técnica de PCR

As PCRs para pesquisa do gene *bla*_{TEM} foram realizadas segundo Cabral e colaboradores 2012 [6]. Já as reações de amplificação do gene *bla*_{GES} por PCR continham: 10 ng DNA genômico, 10 pmol de cada “primer”, tampão 1x, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e 2U da enzima Taq DNA polimerase. A reação utilizou as seguintes condições de ciclagem: 3 min a 93°C de aquecimento prévio; seguido de 40 ciclos de 1 min a 93°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, sendo que a última extensão foi de 7 min a 72°C. Os “primers” utilizados para o gene *bla*_{GES} foram: GES1A 5'-ATGCGCTTCATTACGCAC-3' e GES-1B, 5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3' [40]. Os produtos da reação de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% para realização de eletroforese. Um marcador de 100pb (AMRESCO) foi utilizado como padrão de peso molecular. Após o término da eletroforese os fragmentos correspondentes ao gene em estudo foram visualizados sobe luz ultravioleta e devidamente fotodocumentos.

Condição para realização da ERIC-PCR

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, contendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos “primers” (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3']; ERIC-2 [5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima Taq polimerase. As condições de ciclagens utilizados na reação de ERIC-PCR foram: aquecimento inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 8 minutos. Após os 40 ciclos realizou-se uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72°C.

Os produtos de ERIC-PCR foram corados com corante de DNA Green e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados para análise de perfis clonais [9].

Sequenciamento e análise *in silico*

O produto da PCR foi quantificado por espectrofotometria e posteriormente purificado através do kit de purificação de DNA Wizard (SV gel and PCR clean-up System) (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação o fragmento de DNA foi levado ao sequenciamento. Este apresentou resultado satisfatório, os “picos” correspondentes a cada base nitrogenada que compõe o nucleotídeo (A,T,C e T) foram analisados pelo software Chromas Lite, onde foi confirmada a autenticidade da sequência, dado que a sequência obtida foi comparada com o banco de dados do Genbank (NCBI). A sequência de aminoácidos correspondente à cada trinca de bases nitrogenadas foi obtida utilizando-se o software EXPASY (Expert Protein Analysis System). Após o término das análises *in silico* a sequência foi depositada no GenBank (KF679347).

Resultados e discussão

De um total de 159 isolados de *P.aeruginosa* coletados de hospital universitário em Recife, 71 isolados MDR resistentes a cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam, e 54 isolados que apresentaram resistência a carbapenêmicos foram selecionados para pesquisa dos genes *bla*TEM e *bla*GES.

O tipo de amostra clínica mais frequente foi secreção traqueal (29,56%, 47/159) seguido de amostras de sangue (15,14%, 24/159). A UTI foi o setor hospitalar, que apresentou maior porcentagem de paciente infectados por *P.aeruginosa* (40,88%, 65/159) (Apêndice B).

Isolados multidroga resistentes (MDR) foram 50,94% (81/159), assim considerados quando a resistentes a três ou mais classes de fármacos, e os isolados pan-resistentes (quando resistentes à todas as drogas testadas com exceção ou não da polimixina B) representaram 8,17% (13/159).

A resistência aos carbapenêmicos foi de 51,57% (82/159). 80,5% (128/159) e 33,96% (54/159) foram resistentes à cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam respectivamente.

Foi realizada a pesquisa genética através da PCR, para os genes *bla*_{TEM} em 71 isolados e para o gene *bla*_{GES} em 54 isolados, os resultados obtidos foram, um isolado positivo para TEM (isolado P97HC) e dois isolados positivos para GES (isolados P188HC e P119HC), sendo que os isolados GES-positivos apresentaram relação clonal através da técnica de ERIC-PCR como mostra a figura abaixo.

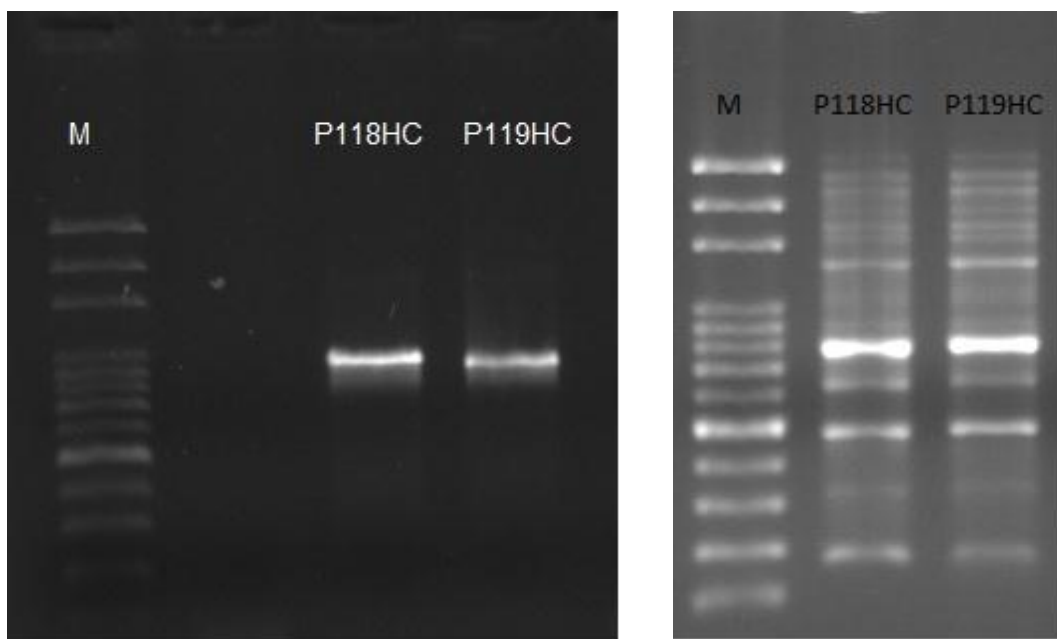


Figura 1: Gel de agarose representando a amplificação do gene *bla*_{GES} (P118HC e P119HC) (à esquerda). Gel de agarose mostrando a relação clonal entre os dois isolados de *P.aeruginosa* produtores de GES (à direita).

Os dois clones produtores de GES foram sensíveis apenas a polimixina B, sendo considerados pan-resistentes, *P.aeruginosa* com fenótipo pan-resistente produtor de GES-5 foi descrito na Amazônia. Esse resultado merece destaque, pois vem sendo relatada a presença de clones extensivamente resistentes, conhecido como XDR.[5]

O resultado do sequenciamento revelou que os isolados P118HC e P119HC eram produtores da variante GES-1, após as análises *in silico*. Esse tipo de GES já foi descrita no Brasil, mas apenas no sudeste do país, sendo restrita aos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro [31,36]. Isso mostra que o gene está se espalhando nesta bactéria, fato que serve de alerta já que essa enzima já apresentou uma mutação que conferiu maior atividade contra imipenem, e conhecemos a capacidade

de *P.aeruginosa* em adquirir mutações [5]. No Brasil, também em São Paulo e na Amazonia já foi descrita a variante GES-5 [8,36].

O gene *bla*_{TEM} já foi descrito na França, onde se encontraram algumas de suas variantes, mas o Brasil parece não apresentar casos de *P.aeruginosa* produtoras de TEM, no entanto, precisamos saber qual a variante encontrada nos nossos isolados, através de sequenciamento. O isolado P97HC foi apenas sensível a carbapenêmicos e polimixina B no teste de susceptibilidade, expressando assim um fenótipo de multi-resistência [11]. O isolado utilizado como cepa controle já foi caracterizado por Cabral e colaboradores em 2012.

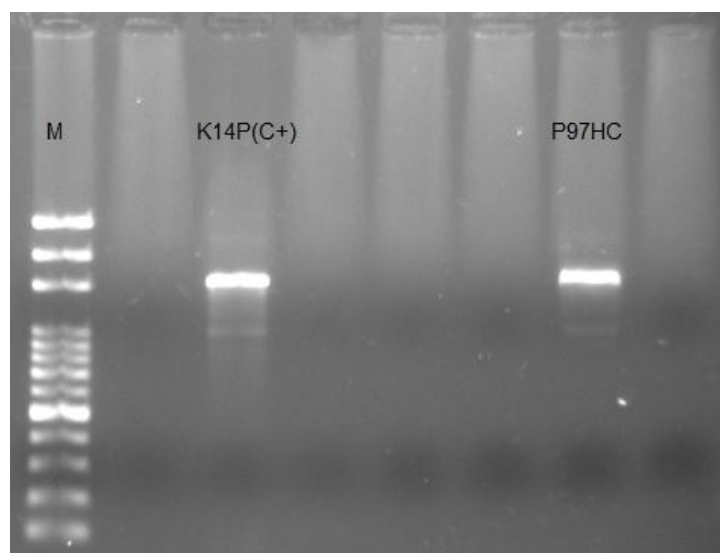


Figura 2: Gel de agarose representando a PCR positiva para o gene *bla*_{TEM}.

Conclusões

Devemos considerar a epidemiologia molecular das ESBLs além das particularidades terapêuticas de cada hospital estudado, o que pode justificar um percentual relativamente pequeno de isolados positivos para essas enzimas através da pesquisa molecular.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram a importância da pesquisa de genes de resistência em *P.aeruginosa*, como as ESBLs, pois enzimas como variantes de TEM e GES contribuem de forma efetiva para os fenótipos de multidroga resistência. A presença de ESBLs em *P.aeruginosa* é um achado de

relevância epidemiológica, e como já citamos o Brasil não possui muitos dados em relação à presença dessas enzimas nessa bactéria. Isso, no entanto, não exclui a importância de outros mecanismos de resistência presentes em *P.aeruginosa* como por exemplo, bombas de efluxo, redução da expressão de porinas, e até mesmo as enzimas do tipo KPC.

A relação clonal entre os isolados GES-positivos mostra a facilidade que *P.aeruginosa* possui em se disseminar, o que merece atenção para que sejam evitados eventuais surtos de bactérias extensivamente resistentes, conhecidas como XDR.

Referências

- 1-AKPAKA, P. E. et al. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2670–1, ago. 2009.
- 2- DE SOUSA JÚNIOR, M. A.; FERREIRA, EDVANA DOS SANTOS; CONCEIÇÃO, GILDÁSIO CARVALHO. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, n. 63, p. 152–174, 2004.
- 3- BAGGE, N. et al. Constitutive High Expression of Chromosomal β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Caused by a New Insertion Sequence (IS 1669) Located in ampD. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3406–11, 2002.
- 4- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–76, mar. 2010.
- 5-CABOT, G. et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6349–57, dez. 2012.
- 6-CABRAL, Adriane Borges *et al.* Multidrug resistance genes, including *blaKPC* and *blaCTX-M-2*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.45, n.5, p.572-578, outubro 2012.
- 7-CASTANHEIRA, M. *et al.* Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n.6, p. 2344–2345, junho 2004.

8-DA FONSECA, E. L. et al. Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 576–7, mar. 2007.

9-DUAN, H.; et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511–517, 2009.

10-FEHLBERG, L. C. C. et al. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 18, n. 4, p. 402–7, ago. 2012.

11-FIGUEIREDO, E. A. P. DE et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 421–427, dez. 2007.

12- GALES, A. C.; TORRES, P. L. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in an Intensive Care Unit of a Teaching Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 267–271, 2004.

13-GE, C. et al. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1184–6, maio 2011.

14-GISKE, C. G. et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 1–4, jan. 2009.

15-GNIADKOWSKI, M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 11, p. 597–608, nov. 2001.

16- HERITAGE, J. et al. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 309–318, 1999.

17- MARTÍNEZ, P.; ESPINAL, P.; MÁTTAR, S. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. **ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA**, v. 11, n. 1, p. 6–15, 2007

18-JIANG, X. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 2990–5, set. 2006.

- 19-KANJ, S. S.; KANAFANI, Z. A. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 86, n. 3, p. 250–9, mar. 2011.
- 20- LEE, J. H.; BAE, I. K.; LEE, S. H. New Definitions of Extended-Spectrum beta-Lactamase Conferring Worldwide Emerging Antibiotic Resistance. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 1, p. 216–232, 2011.
- 21- DA SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.
- 22-LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–84, out. 1995.
- 23-LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 5, p. 634–40, 1 mar. 2002.
- 24- FREITAS, A. L. P.; BARTH, A. L. Antibiotic Resistance and Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*: Focus on Imipenem. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2002.
- 25- MORALES, E. et al. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. **BMC health services research**, v. 12, n. 1, p. 122, jan. 2012.
- 26-MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. January, p. 422, jan. 2014.
- 27-MUGNIER, P. et al. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2488–93, nov. 1996.
- 28- NADEEM, S. G. et al. Comparison of the in vitro susceptibility of Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **British Journal of medical Practitioners**, v. 2, n. 4, p. 35–39, 2009.
- 29-NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, ago. 2011.
- 30-PELLEGRINO, F. L. P. C. et al. BlaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 251–3, ago. 2006

- 31-PICÃO, R. C. et al. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3908–13, set. 2009.
- 32- PIERSIGILLI, A. L. et al. Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de β -lactamasa de espectro extendido en un centro privado de Córdoba. **Revista Chilena Infectología**, v. 26, n. 4, p. 331–335, 2009..
- 33-PIRES, E. J. V. C. et al. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 384–390, dez. 2009.
- 34-POIREL, L. et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 622–32, mar. 2000.
- 35- POIREL, L. et al. GES-2 , a Class A Beta-Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. **Antimicrobial agents and chemotherapy** v. 45, n. 9, p. 2598–2603, 2001.
- 36-POLOTTO, M. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 176, jan. 2012.
- 37-POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Frontiers in microbiology**, v. 2, n. April, p. 65, jan. 2011.
- 38-STEHLING, E. G.; SILVEIRA, W. D. DA; LEITE, D. D. S. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 86–8, fev. 2008.
- 39-VILLEGAS, M. V. et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553–5, abr. 2007.
- 40-WANG, C. et al. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261–2, jun. 2006.
- 41- WELDHAGEN, G. F. GES: an Emerging Family of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 28, n. 19, p. 145–149, 2006.

APÊNCIDE B - Tabela representando os isolados de *P.aeruginosa* obtidos para este estudo e seus respectivos tipos de amostra e setor proveniente.

Identificação do isolado	Setor Hospitalar	Tipo de amostra clínica
P1HC	UTI	Secreção Traqueal
P2HC	UTI	Secreção Traqueal
P3HC	Cirurgia Geral	Líquido
P4HC	UTI	Swab Nasal
P5HC-1	UTI	Secreção
P5HC-2	UTI	Secreção
P6HC	Cirurgia Geral	Sangue
P7HC-1	UTI	Secreção
P7HC-2	UTI	Secreção
P8HC	UTI	Fragmento
P9HC	Nefrologia	Tecido
P10HC	Cirurgia Geral	Sangue
P11HC	UTI	Swab Nasal
P12HC	UTI	Swab Nasal
P13HC	Dermatologia	Fragmento
P14HC	UTI	Ponta de cateter

P16HC	URCC	Secreção Traqueal
P17HC	Nefrologia	Sangue
P18HC	UTI	Ponta de Cateter
P19HC	URCC	Sangue
P20HC	DIP	Sangue
P21HC	Diálise	Ponta de cateter
P22HC	UTI	Secreção
P23HC	UTI	Secreção de Ferida Operatória
P24HC	UTI	Secreção
P25HC	UTI	Secreção Traqueal
P26HC	Cirurgia Geral	Secreção de Dreno
P27HC	UTI	Líquido
P28HC	UTI	Fragmento
P29HC	Dermatologia	Biópsia
P30HC	UTI	Secreção Traqueal
P31HC	UTI	Secreção Traqueal
P32HC	DIP	Urina
P33HC	DIP	Sangue
P34HC	DIP	Sangue

P35HC	UTI	Secreção Traqueal
P36HC	Clínica Médica	Fragmento
P37HC	UTI	Secreção Traqueal
P38HC	UTI	Secreção Traqueal
P39HC	UTI	Swab Retal
P40HC	UTI	Secreção Traqueal
P41HC	UTI	Secreção Traqueal
P42HC	UTI	Secreção Traqueal
P43HC	UTI	Swab Nasal
P44HC	UTI	Secreção Ocular
P45HC	UTI	Sangue
P46HC	UTI	Secreção Traqueal
P47HC	UTI	Secreção de Ferida Operatória
P48HC	UTI	Secreção Traqueal
P49HC	UTI	Secreção Traqueal
P50HC	URCC	Secreção Traqueal
P51HC	Cirurgia Geral	Secreção de Ferida Operatória
P52HC	UTI	Secreção Traqueal
P53HC	Clínica Médica	Secreção Traqueal

P54HC	Transplante	Urina
P55HC	URCC	Secreção Traqueal
P56HC	Neurologia	Fragmento
P57HC	Neurologia	Fragmento
P58HC	UTI	Urina
P59HC	Diálise	Sangue
P60HC	URCC	Secreção
P61HC	UTI	Secreção Traqueal
P62HC	Enfermaria	Secreção Traqueal
P63HC	UTI	Urina
P64HC	URCC	Urina
P65HC	Clínica Médica	Secreção Traqueal
P66HC	Nefrologia	Secreção
P67HC	Nefrologia	Urina
P68HC	Nefrologia	Secreção
P69HC	Nefrologia	Secreção
P70HC	Nefrologia	Fragmento
P71HC	Reumatologia	Secreção
P72HC	Reumatologia	Secreção de Ferida

P73HC	DIP	Secreção Traqueal
P74HC	Cirurgia Vascular	Secreção de Ferida Operatória
P75HC	Cirurgia Vascular	Fragmento
P76HC	Nefrologia	Sangue
P77HC	UTI	Secreção Traqueal
P78HC	Reumatologia	Secreção Traqueal
P79HC	UTI	Secreção Traqueal
P80HC	Nefrologia	Fragmento
P81HC	Urologia	Secreção Traqueal
P82HC	Nefrologia	Sangue
P83HC	Urologia	Fragmento
P84HC	Clínica Médica	Urina
P85HC	Reumatologia	Ponta de cateter
P86HC	Nefrologia	Secreção de Cateter
P87HC	UTI	Swab nasal
P88HC	UTI	Swab nasal
P89HC	UTI	Swab nasal
P90HC	UTI	Secreção Traqueal
P91HC	Enfermaria	Urina

P92HC	UTI	Secreção Traqueal
P93HC	UTI	Swab retal
P94HC	Clínica Médica	Urina
P95HC	Clínica Médica	Fragmento
P96HC	Clínica Médica	Urina
P97HC	UTI	Urina
P98HC	Pediatria	Secreção
P99HC	UTI	Secreção Traqueal
P100HC	Nefrologia	Sangue
P101HC	Transplante	Urina
P102HC	UTI	Secreção Traqueal
P103HC	UTI	Secreção Traqueal
P104HC	UTI	Urina
P105HC	Enfermaria	Fragmento
P106HC	Enfermaria	Secreção Traqueal
P107HC	UTI	Secreção Traqueal
P108HC	Ortopedia	Secreção
P109HC	Clínica Médica	Secreção Traqueal
P110HC	Pediatria	Secreção

P111HC	UTI	Secreção Traqueal
P112HC	Enfermaria	Fragmento
P113HC	Urologia	Urina
P114HC	Clínica Médica	Secreção Traqueal
P115HC	Ortopedia	Fragmento
P116HC	Ortopedia	Fragmento
P117HC	URCC	Sangue
P118HC	Clínica Médica	Fragmento de pé direito
P119HC	Clínica Médica	Fragmento de pé esquerdo
P120HC	Diálise	Secreção de ferida
P123HC	Clínica Médica	Secreção Traqueal
P124HC	Clínica Médica	Urina
P125HC	UTI	Secreção Traqueal
P126HC	Clínica Médica	Sangue
P127HC	Neurologia	Urina
P128HC	UTI	Sangue
P129HC	UTI	Secreção Traqueal
P130HC	Nefrologia	Secreção de cateter
P131HC	UTI	Secreção Traqueal

P132HC	UTI	Swab nasal
P133HC	UTI	Swab retal
P134HC	UTI	Secreção Traqueal
P135HC	DIP	Sangue
P136HC	Enfermaria	Sangue
P137HC	Cirurgia Plástica	Sangue
P138HC	Ortopedia	Urina
P139HC	DIP	Sangue
P140HC	Clínica Médica	Urina
P141HC	UTI	Secreção traqueal
P142HC	Clinica Médica	Fragmento
P143HC	Endocrinologia	Secreção traqueal
P144HC	Berçário	Fragmento
P146HC	DIP	Secreção ocular
P147HC	Enfermaria	Secreção ocular
P148HC	Berçário	Fezes
P149HC	UTI-neonatal	Sangue
P150HC	Enfermaria	Sangue
P151HC	Ambulatório	Sangue

P152HC	Ambulatório	Swab retal
P153HC	Clinica Médica	Secreção
P154HC	Nefrologia	Ponta de catéter
P155HC	Enfermaria	Secreção traqueal
P156HC	Clinica médica	Secreção
P157HC	UTI	Secreção
P158HC	Enfermaria	Secreção traqueal
P159HC	Enfermaria	Secreção traqueal
P160HC	UTI	Fezes
P161HC	UTI	Sangue

ANEXOS

ANEXO A- Registro no Comitê de Ética nº 009/11



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 111/2011 - CEP/CCS

Recife, 07 de abril de 2011

Registro do SISNEP FR – 396521

CAAE – 0490.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 009/11

Título: Caracterização fenotípico-molecular de *Staphylococcus* spp. Multiresistentes de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco.

Pesquisador Responsável: Marcelle Aquino Rabelo

Senhor (a) Pesquisador (a):

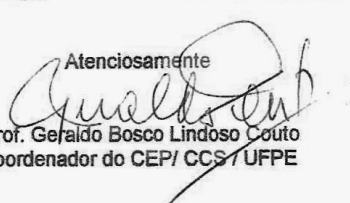
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 06 de abril de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente



Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A

Mestranda Marcelle Aquino Rabelo
Departamento de Medicina Tropical - CCS/UFPE

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588;
e-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B- Adendo do Registro no Comitê de Ética nº 009/11

Departamento de Medicina Tropical
Mestranda Marcelle Aquino Rabelo
Coordenador Comissão Ética Pesquisa/CCS/UFPE
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto

Recife, 01 de fevereiro de 2012

Prezado Coordenador Geraldo Bosco

Venho através desta carta, solicitar á V.Sa. adicionar um termo de adendo ao projeto intitulado **“CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICO-MOLECULAR DE *Staphylococcus spp.* MULTIRESISTENTES DE AMOSTRAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE SAÚDE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO”** cujo registro CEP/CCS/UFPE número 009/11, justificando que devido a problemas de processamento das amostras no Laboratório do Hospital das Clínicas da UFPE, e a necessidade de ampliar o tamanho da amostra de bactérias de interesse médico solicitamos expandir o cronograma do citado projeto para o prazo de um ano, à partir do prazo de aprovação deste termo de adendo.

Quilgus
de
Assinada
17/01/12
GA

Marcelle Aquino Rabelo
Mestranda Marcelle Aquino Rabelo

 **Geraldo Bosco Lindoso Couto**
Coordenador do CEP/CCS/UFPE