



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

Lilian Rodrigues Alves

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM RECIFE, PERNAMBUCO**

RECIFE - PE

2013

LILIAN RODRIGUES ALVES

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM RECIFE, PERNAMBUCO.**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Tropical da Universidade
Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Amélia Vieira Maciel
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes

Recife-PE
2013

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

A474c Alves, Lilian Rodrigues.
Caracterização genética da resistência antimicrobiana em isolados clínicos de *pseudomonas aeruginosa* provenientes de um hospital universitário em Recife, Pernambuco / Lilian Rodrigues Alves. – Recife: O autor, 2013.
98 f. : il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Pseudomonas aeruginosa. 2. Infecção. 3. Resistência bacteriana a antibióticos. 4. Tipagem molecular I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-096)



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 DA MESTRANDA

LILIAN RODRIGUES ALVES

No dia 08 de março de 2013, às 08h00, na Sala de Aula do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, os Membros Doutores a Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira – Presidente da Banca (UFPE), a Prof^ª. Dr^ª. Márcia Maria Camargo de Moraes (UFPE) e o Prof^º. Dr^º. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda LILIAN RODRIGUES ALVES sobre a sua Dissertação intitulada “CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO”, a qual foi orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Maria Amélia Vieira Maciel (UFPE) e co-orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Maria Camargo de Moraes

Aprovada

Prof^º. Dr^º. Paulo Sérgio Ramos de Araújo

APROVADA



**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**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

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

Valdênia Maria Oliveira de Souza

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 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 Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

DEDICO,

A Deus, Pai eterno, por sempre me guiar, proteger e abençoar;

*Aos meus pais Carlos Alberto e Nadira Rodrigues por todo amor,
carinho, dedicação, educação, incentivo e ensinamentos. Vocês são
os meus alicerces.*

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Amélia Maciel pela confiança, orientação, dedicação, ensinamentos, amizade e incentivo a minha carreira acadêmica, além de ser uma “mãe científica” para seus alunos;

A Prof^a. Dr^a. Ana Catarina por ter aceitado ser minha co-orientadora, por toda atenção dedicada, ensinamentos e, acima de tudo, pela amizade e confiança;

Aos meus amigos de laboratório, Rita Andrade, Adriane Borges, Paula Jácome, Emmily Margate, Valdemir Júnior, Jussyêgles Pereira, Alessandra Lima pelas horas de diversão, conversas e aprendizado;

Aos meus “curicas” favoritos Jailton Lobo, Marcelle Aquino, Armando Monteiro e Stephanie Targino por toda ajuda e dedicação durante o desenvolvimento deste estudo, pelas conversas, risos e horas de trabalho;

A Amanda Ferreira, Thays Miranda e Mariana Nunes pela disponibilidade e ajuda essenciais para a conclusão desta dissertação;

Aos professores e a todos que fazem parte do Departamento de Medicina Tropical pela contribuição na minha formação e pelos valiosos ensinamentos; em especial a Walter Leite por toda dedicação e prestatividade;

A todos os professores da Disciplina de Microbiologia e Imunologia pela amizade, ensinamentos e incentivo durante todos esses anos; em especial a Dona Djanira por ser uma anjinha em nossas vidas;

A equipe do setor de Bacteriologia do ULab, em especial ao Dr. Henrique, Dr^a Mércia, Dr^a Maria do Carmo e Dr^a Miriam, pela disponibilidade em nos ajudar a realizar este estudo.

A toda minha família, em especial aos meus pais, tios e irmão, pelo apoio incondicional, amor, compreensão e incentivo durante todos os dias da minha vida;

A Carlos Henrique por todo amor, companheirismo, amizade e, principalmente, pela paciência e compreensão ao longo desta jornada. Te amo por tudo que você é e representa para mim.

Aos meus colegas de mestrado André, Érica, Danielly, Márcio, Rita, Viviane, Joanne, Carla, Ruth, Vanessa, Carlos Eduardo pelo tempo de convívio e pela amizade;

A minha colega, amiga e irmã “gêmula”, Larissa Matos pelo companheirismo, apoio, carinho e amizade ao longo de todos estes anos; por se fazer presente em todos os dias da minha vida o meu muitíssimo obrigada;

A minha grande amiga Hênia Fabiane, por estar sempre ao meu lado, por nunca me deixar desistir e me incentivar a sempre seguir em frente;

As minhas amigas Adnaiany, Janizélly e Jerdlane, por todos estes anos de amizade, brincadeiras e carinho que nem mesmo a distância conseguiu enfraquecer;

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização de mais um sonho, os meus mais sinceros agradecimentos.

A Propesq-UFPE, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

*“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda
a escada. Apenas dê o primeiro
passo.”*

Martin Luther King

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista associado a infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS), cuja principal característica é a capacidade de desenvolver resistência a diversos antimicrobianos através da produção de enzimas metalo- β -lactamases (M β LS) e KPC (*Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase), além da hiperexpressão dos sistemas de efluxo multidroga. O objetivo do estudo foi caracterizar o perfil de fenotípico e genético de resistência, bem como determinar o grau de similaridade genética de isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital universitário em Recife, Pernambuco, no período de abril a agosto de 2011 e maio a setembro de 2012. O perfil de susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* foi determinado pela técnica de disco-difusão, segundo critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). A pesquisa dos genes *mexA*, *mexE* e *mexX* foi realizada em isolados multidroga resistentes (MDR) e a pesquisa dos genes *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{KPC} foi realizada em isolados que apresentaram resistência a cefalosporinas e carbapenêmicos. Os genes descritos foram detectados pela Reação em Cadeia da Polimerase. Todos os isolados foram submetidos à tipagem molecular através da técnica de amplificação de sequências de consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR). Cento e vinte isolados de *P. aeruginosa* apresentaram taxas de resistência variando de 7,5% para polimixina e 52,5% para cefotaxima. Não foram observados genes M β L nos 17 isolados resistentes a ceftazidima e imipenem ou meropenem. O gene *bla*_{KPC} foi encontrado em 4/33 isolados resistentes aos carbapenêmicos. Os genes *mexA* e *mexE* foram detectados em 67/69 isolados MDR e o *mexX* em 66/69. A ERIC-PCR demonstrou 82 perfis genéticos distintos entre os 120 isolados. Neste estudo, concluiu-se que os sistemas de efluxo e a KPC parecem contribuir para a resistência de isolados de *P. aeruginosa*. A heterogeneidade genética observada pode estar relacionada com a variabilidade genética desta espécie bacteriana oriunda de mutações não letais e recombinações, como a conjugação e transformação.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; infecção; resistência bacteriana a antibióticos; tipagem molecular

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen related to healthcare-associated infections, whose main feature is the ability to develop resistance to several antibiotics by producing metallo- β -lactamases (M β Ls) and KPC (*Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase) enzymes, and the overexpression of the multidrug efflux systems. The aim of this study was to investigate the genetic determinants related to the antimicrobial resistance and determine the degree of genetic similarity among clinical isolates of *P. aeruginosa* from a university hospital in Recife, Pernambuco, in the period April to August 2011 and from May to September 2012. The susceptibility profile of the isolates of *P. aeruginosa* was determined by disk diffusion technique according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). The search for genes *mexA*, *mexE* and *mexX* was held in isolated multidrug-resistant (MDR) and the research of genes *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{KPC} was held in isolates exhibiting resistance to cephalosporins and carbapenems. The described genes were detected by Polymerase Chain Reaction (PCR). All isolates were subjected to molecular typing by amplification repetitive intergenic consensus sequences of enterobacteria technique (ERIC-PCR). One hundred and twenty isolates of *P. aeruginosa* showed resistance rates ranging from 7.5% to 52.5% for polymyxin and cefotaxime. M β L genes were not observed in the 17 isolates resistant to ceftazidime and imipenem or meropenem. The *bla*_{KPC} gene was found in 4/33 isolates resistant to carbapenems. *MexA* and *mexE* genes were detected in 67/69 MDR isolates and *mexX* on 66/69. The ERIC-PCR showed 82 distinct genetic profiles among the 120 isolates. In this study, we concluded that the KPC and efflux systems appear to contribute to resistance isolates of *P. aeruginosa*. The genetic heterogeneity observed may be related to the genetic variability of this bacterial species originating from non-lethal mutations and recombinations, such as conjugation and transformation.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; infection; bacterial resistance to antibiotics; molecular typing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – Esquema representativo da técnica de extração de DNA utilizando o Kit Brazol	33
 ARTIGO 1	
Figura 1 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-PE).	44
Figura 2 – Gel de eletroforese dos produtos de PCR: a. Gene <i>mexA</i> ; b. Gene <i>mexE</i> ; c. Gene <i>mexX</i> .	44
Figura 3 – Dendrograma de similaridade genética, gerado pelo software PAST, entre 120 isolados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-PE), estimado pela técnica de ERIC-PCR.	47
 ARTIGO 2	
Figura 1 – Gel de eletroforese dos produtos de PCR para o gene <i>bla_{KPC}</i>	56
Figura 2 – Gel de eletroforese dos produtos de PCR: a. Genotipagem por ERIC-PCR; b. Genotipagem por RAPD.	56

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Dados dos primeiros exemplares de cada subclasse de M β L descritas até o presente momento.	20
Tabela 2 – Relação dos iniciadores e temperaturas de anelamento para a pesquisa de genes de M β L.	34
Tabela 3 – Relação dos iniciadores e temperaturas de anelamento para a pesquisa de genes dos sistemas de efluxo multidroga.	35
 ARTIGO 1	
Tabela 1 – Relação dos iniciadores e temperaturas de anelamento para a pesquisa de genes de M β L	42
Tabela 2 – Relação dos iniciadores e temperaturas de anelamento para a pesquisa de genes dos sistemas de efluxo multidroga	42
Tabela 3 – Perfil de resistência aos antimicrobianos e genes de bombas de efluxo presentes em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de um hospital universitário em Recife-PE, durante o período de abril a agosto de 2011 e maio a setembro de 2012.	45
 ARTIGO 2	
Tabela 1 – Características fenotípicas de isolados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de paciente internado em hospital universitário em Recife-PE.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	Australian imipenemase
BHI	Brain Heart Infusion
<i>bla</i>	Genes que codificam β -lactamase
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DIM	Dutch imipenemase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenics Consensus-based PCR
GIM	German imipenemase
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
IMP	Imipenemase
KHM	Kyorin Hospital metalo- β -lactamase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -carbapenemase
MβL	Metalo- β -lactamase
MDR	Multidroga resistente
NDM	New Delhi metalo- β -lactamase
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SIM	Seoul imipenemase
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
TBE	Tris-borato EDTA
TMB	Tripoli etalo- β -lactamase
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	Verona Imipenemase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2 Mecanismos de Resistência	18
2.2.1 Metallo- β -Lactamase (MBL)	19
2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase – KPC	21
2.2.3 Sistemas de Efluxo Multidroga	23
2.2.3.1 Família ABC	24
2.2.3.2 Família MATE	24
2.2.3.3 Família MFS	25
2.2.3.4 Família SMR	25
2.2.3.5 Família RND	25
2.3 Métodos de Genotipagem	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 Desenho do Estudo	31
4.2 Local do Estudo	31
4.3 População Alvo	31
4.4 Considerações éticas	31
4.5 Padronização e Técnicas Laboratoriais Empregadas	32
4.5.1 Isolados bacterianos	32
4.5.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	32
4.5.3 Extração de DNA total	32
4.5.4 Condições da PCR para identificação dos genes de resistência <i>bla</i> _{SPM} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM}	33
4.5.5 Condições da PCR para identificação do gene de resistência <i>bla</i> _{KPC}	34
4.5.6 Condições da PCR para identificação dos genes de resistência <i>mexA</i> , <i>mexE</i> e <i>mexX</i>	35
4.5.7 Eletroforese em gel de agarose	36
4.5.8 ERIC-PCR	36
4.5.9 RAPD	36
5. ARTIGO 1	38
6. ARTIGO 2	53
7. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE	76
APÊNDICE A – Artigo 1 em inglês	76
APÊNDICE B – Artigo 2 em inglês	90
ANEXO	97
Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco	97

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes causadores de infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) por apresentar, associado aos fatores de virulência, resistência a diversos antimicrobianos, além de poder adquirir novos mecanismos de resistência durante o tratamento (FALAGAS et al., 2006; ZAVASCKI et al., 2006; FUENTEFRIA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009). Esta resistência é explicada pelo surgimento de cepas de *P. aeruginosa* multidroga resistentes (TAM et al., 2010), tendo como principais mecanismos a produção de enzimas metalo- β -lactamases (M β L), β -lactamases de espectro estendido (ESBL), carbapenemases do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase), β -lactamases do tipo AmpC, perda de porinas (OprD) e os sistemas de efluxo (ZAVASCKI et al., 2005; GRÄF et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; JACOBY, 2009; WIRTH et al., 2009; ASKOURA et al., 2011; NEVES et al., 2011; BEGUM et al., 2013).

No Brasil, os genes mais envolvidos na resistência por M β L são *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}, sendo o *bla*_{SPM} mais frequentemente encontrado (FIGUEIREDO et al., 2009). Sader e colaboradores (2005) relataram a produção de três tipos de M β L (SPM-1, VIM-2 e IMP-1) em isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos de um hospital em São Paulo. Em Recife, Poirel e colaboradores (2004) e Jácome e colaboradores (2012a) analisaram isolados clínicos de *P. aeruginosa* e identificaram apenas o gene *bla*_{SPM-1}, assim como os estudos realizados por Magalhães et al., (2005) e Vieira et al., (2005), sendo este último em São Luís do Maranhão, mostrando uma tendência nacional de maior frequência do gene *bla*_{SPM-1} (GRÄF et al., 2008).

O surgimento de mais uma β -lactamase do tipo carbapenemase, a KPC, tem limitado as opções terapêuticas e preocupado os profissionais de saúde. Inicialmente descrita em membros da família Enterobacteriaceae, a KPC tem se disseminado em isolados de *P. aeruginosa* em todo o mundo (VILLEGAS et al., 2007; AKPAKA et al., 2009), sendo o primeiro relato no Brasil descrito por Jácome e colaboradores (2012b). A produção desta enzima é o mecanismo de maior relevância devido à crescente diversidade enzimática que tem sido observada nos últimos anos (FRITSCHÉ et al., 2005; GRÄF et al., 2008).

Os sistemas de efluxo multidroga do tipo *mex* em *P. aeruginosa* contribuem para a resistência a múltiplos antibióticos. Apesar de conferir um nível de resistência moderada, o seu impacto clínico pode ser grande, pois este sistema diminui as concentrações de

antibióticos dentro da célula bacteriana, tornando-o ineficiente no combate a infecção pela *P. aeruginosa* (MESAROS, et al., 2007).

No estado de Pernambuco, só há relatos na literatura da pesquisa de genes responsáveis pela produção de enzimas M β L (POIREL, et al., 2004; MAGALHÃES, et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2012; Jácome et al.; 2012a) e KPC (JÁCOME et al., 2012b) em *P. aeruginosa*.

Um método de genotipagem bacteriana tem se mostrado bastante promissor e é baseado na amplificação por PCR de sequências de consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR). Esta técnica permite evidenciar diferenças em um grupo fenotipicamente idêntico, tendo impacto direto na intervenção terapêutica por ser essencial na identificação de cadeias de transmissão em surtos hospitalares (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; PFALLER et al., 2001; ALVES et al., 2006).

Os estudos de caracterização genética têm por objetivo fornecer evidências laboratoriais de agentes infecciosos, durante um período de tempo em uma determinada área geográfica com a finalidade de observar a disseminação e relação genética entre micro-organismos. Em relação a *P. aeruginosa*, a caracterização genética é fundamental para compreensão da dispersão desta bactéria, auxiliando na elaboração de estratégias de redução de infecção, uma vez que a partir de perfis moleculares é possível mapear o fluxo gênico e rotas de dispersão em ambientes hospitalares (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997).

Diante do exposto, o presente estudo tem por finalidade determinar o perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos, pesquisar os genes de resistência *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *mexA*, *mexE* e *mexX*, e identificar os perfis genéticos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital universitário em Recife, Pernambuco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas spp. faz parte de um grupo de micro-organismos heterogêneos e largamente distribuídos na natureza, que possuem metabolismo bastante versátil (VILA; MARCO, 2002). O gênero *Pseudomonas* possui mais de 140 espécies distribuídas em cinco grupos e sua taxonomia tem sido baseada na utilização de análises de sequências dos genes 16S de RNA ribossomal (rRNA) (TYLER et al., 1995; ANZAI et al., 2000).

Até 1973, o gênero *Pseudomonas* era visto como amplo e bastante diversificado com membros diferenciados por características fenotípicas. Palleroni et al., (1973), utilizando homologia de sequências de rRNA, concluíram que os cinco grupos do gênero apresentavam características filogenéticas distintas. Em 1989, Johnson e Palleroni confirmaram estas observações por meio de experimentos de hibridização de DNA, reafirmando unidades taxonômicas baseadas em associações fenotípicas e genotípicas. A espécie de maior representatividade deste gênero é a *Pseudomonas aeruginosa* (TYLER et al., 1995; SOARES, 2001).

P. aeruginosa é um dos mais importantes agentes de infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). Esta bactéria é classificada como bacilo Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, pertencente à família Pseudomonadaceae, com tamanho de 0,5-1,0µm por 1,5-4,0µm, não fermentador de carboidratos, aeróbio estrito, móvel (apresenta um ou mais flagelos polares, dependentes de oxigênio molecular) e não produtor de esporos (POLLACK, 2000; MADIGAN, et al., 2004; PITT; SIMPSON, 2006; FIGUEIREDO et al., 2009).

Seu diagnóstico é baseado no isolamento e identificação através da morfologia da colônia, produção de pigmentos e provas bioquímicas. É comumente isolada em meios enriquecidos (Ágar Sangue) ou seletivo e diferencial (Ágar eozina azul de metileno – EMB). Outro meio seletivo e diferencial que é específico para *P. aeruginosa* é o cetiltrimetil cloreto de amônio (cetrímide), pois este micro-organismo resiste aos compostos de amônia quaternária. Neste meio, a identificação é feita pela análise macroscópica das colônias, avaliação da produção de pigmentos e presença de odor característico de uva produzido pela piocianina. Em seguida, realiza-se a coloração de Gram e uma bateria de testes bioquímicos, que tem como resultado: fermentação de carboidratos negativa, citocromo-oxidase positiva, utilização do citrato como única fonte de carbono, incapacidade de descarboxilar a lisina e incapacidade de utilizar o aminoácido triptofano (WINN et al., 2008). Também possui a

capacidade de sintetizar vários pigmentos hidrossolúveis, dentre eles: pioverdina, piocianina, piorrubina e piomelanina. A piocianina é um pigmento azul fenazínico específico desta bactéria, que quando combinado com a pioverdina produz uma coloração verde brilhante característica (FREITAS; BARTH, 2004).

Suas colônias podem apresentar diversos morfotipos, até mesmo quando isoladas de um único paciente, sendo as colônias planas com bordas rugosas e com brilho metálico as mais frequentemente isoladas, embora também possam se apresentar pequenas e lisas, ou ainda colônias grandes e mucóides, estando estas últimas mais associadas a pacientes com fibrose cística e outras infecções respiratórias crônicas (MARTÍNEZ; GOMES; GARAU, 2006; HOGARDT et al., 2007; MENA et al., 2008).

A infecção pela *P. aeruginosa* é prevalente em pacientes com doença de base grave, como o câncer, doença renal crônica, diabetes, doenças cardíacas, neurológicas e pulmonares (doença pulmonar obstrutiva crônica - DPOC), sendo o patógeno mais comum associado a casos de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística. Produz várias substâncias que são consideradas como responsáveis pelo seu alto poder de colonização, virulência e patogenicidade. Dentre os fatores de virulência podemos citar a produção de alginato, neuraminidase, lipopolissacarídeo (LPS), exotoxina A, enterotoxina, exoenzima S, fosfolipase C, elastase, leucocidina e piocianina, além de possuírem *pili*. Dentre os fatores de virulência, a produção de alginato é, em última instância, responsável pelo mau prognóstico e pelas altas taxas de mortalidade entre os pacientes com fibrose cística (NOUÉR, et al., 2005; JELSBK, et al., 2007).

2.2 Mecanismos de Resistência

Frequentemente, isolados de *P. aeruginosa* apresentam um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive contra cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipenem e meropenem). Por estas razões, infecções causadas por *P. aeruginosa* estabelecem um desafio para a terapia antimicrobiana (TODAR, 2009; FUENTEFRÍA et al., 2008).

Este amplo espectro de resistência aos antimicrobianos apresentado pela *P. aeruginosa* se deve ao fato da mesma poder apresentar, simultaneamente, diversos mecanismos distintos de resistência a antimicrobianos. Por se tratar de uma bactéria que tem origem no solo, o convívio com outros micro-organismos produtores naturais de antibióticos, como os

actinomicetos, induziu o desenvolvimento de uma resistência natural em *P. aeruginosa* (TODAR, 2009).

A seguir, estão descritos os principais e mais importantes mecanismos de resistência em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

2.2.1 Metallo- β -Lactamase (M β L)

As M β Ls são as carbapenemases de maior diversidade molecular e consistem em uma grande ameaça clínica (WALSH, 2010). Estas enzimas apresentam dois íons de zinco em seu sítio ativo, que coordenam íons de água polarizada para o ataque oxianion sobre o anel β -lactâmico (GANTA et al., 2009). Esse método de ataque e hidrólise é exclusivo entre as β -lactamases e é clinicamente crítico, uma vez que as M β Ls não formam uma ligação covalente intermediária estável ou pseudo-estável, logo, não se liga fisicamente ao substrato β -lactâmico e, portanto, escapa a ação de inibidores de β -lactamase, como ácido clavulânico e sulbactam (WALSH et al., 2005, GANTA et al., 2009).

As M β Ls podem hidrolisar todos os β -lactâmicos, exceto monobactâmicos, como o aztreonam, porém atualmente muitos isolados clínicos estão apresentando uma série de β -lactamases de tal forma que a panresistência (resistência a todos os agentes antimicrobianos) aos β -lactâmicos é um fenômeno comum em alguns países como a Índia e a Grécia (WALSH, 2010).

A primeira M β L foi descrita em 1966 em um isolado de *Bacillus cereus*, estando seu gene localizado no cromossomo bacteriano (SABATH; ABRAHAM, 1966, KUWABARA; ABRAHAM, 1967; HUSSAIN et al., 1985) e apenas 25 anos depois, em 1991, foi isolada a primeira M β L em um isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*, codificada por genes plasmidiais, ficando esta conhecida como IMP-1 (WATANABE et al., 1991; OSANO et al., 1994). Com o surgimento das M β Ls mediadas por plasmídeos em patógenos de importante relevância clínica, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e membros da família Enterobacteriaceae em vários países, este mecanismo de resistência tornou-se um sério problema de saúde pública, uma vez que limita as opções terapêuticas para infecções causadas por estes patógenos (BUSH, 2001; JONES et al., 2005; ROSSOLINI, 2005; WALSH et al., 2005). Um dado importante é o fato de que muitos destes genes de M β Ls estarem presentes em espécies ambientais, constituindo, de certa forma, reservatórios de genes de resistência (BEBRONE, 2007).

Estas enzimas pertencem à classe molecular B, segundo a classificação de Ambler (1980). Outras classificações para as MβL foram surgindo com o tempo, como a de Bush (1989) que classificou as mesmas no grupo 3, segundo as suas propriedades bioquímicas, característica que foi reforçada em 1995 com a classificação funcional de Bush, Jacoby e Medeiros . Com o surgimento de novas MβLs, Rasmussen e Bush (1997) propuseram a divisão do grupo 3 de acordo com o perfil de hidrólise para os carbapenêmicos e outros β-lactâmicos em três novos subgrupos: o subgrupo 3a, que inclui as MβLs com amplo espectro de atividade; o subgrupo 3b, que compreende as enzimas que hidrolisam preferencialmente os carbapenêmicos; e o subgrupo 3c, composto pelas enzimas que hidrolisam fracamente os carbapenêmicos e com elevada capacidade de hidrolisar as cefalosporinas.

Contudo, o sequenciamento genético das MβLs levou Galleni e colaboradores (2001) a proporem um novo esquema de classificação numérico subdividindo o grupo 3 em 3 subclasses: B1, B2, e B3. Este esquema foi atualizado por Garau e colaboradores (2004) após a elucidação da estrutura tridimensional de algumas MβLs representantes de cada subclasse, porém esta classificação, segundo Walsh e colaboradores (2005), não é adequada para classificar todas as MβLs. Desta forma, em 2010, Bush e Jacoby revisaram a classificação dos mesmos de 1995, mantendo a subdivisão por perfil de hidrólise das MβLs (3a, 3b e 3c) e ampliando o arsenal de enzimas inseridas em cada subclasse.

Atualmente dez tipos de MβLs clinicamente importantes foram identificadas. A Tabela 1 descreve os primeiros casos de cada MβL, identificados em patógenos clinicamente importantes.

Tabela 1 – Dados dos primeiros exemplares de cada tipo de MβL descritas até o presente momento.

Enzima MβL	Micro-organismo (1º isolamento)	Cidade/País	Ano ^a	Referências
IMP-1 (Imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Okasaki/ Japão	1991	OSANO et al., 1994
VIM-1 (Verona imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Verona/ Itália	1997	LAURETTI et al., 1999
SPM-1 (São Paulo metalo-β-lactamase)	<i>P. aeruginosa</i>	São Paulo/ Brasil	2001	TOLEMAN et al., 2002
GIM-1 (German imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Dusseldorf/ Alemanha	2004	CASTANHEIRA et al., 2004
SIM-1 (Seoul imipenemase)	<i>A. baumannii</i>	Seul/ Coréia	2003/ 2004	LEE et al., 2005

AIM-1 (Australian imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Adelaide/ Austrália	2002	YONG et al., 2007
KHM-1 (Kyorin Hospital metalo- β - lactamase)	<i>C. freundii</i>	Tokyo/ Japan	1997	SEKIGUCHI et al., 2008
NDM-1 (New Delhi metalo- β lactamase)	<i>K. pneumoniae</i>	Nova Deli/ Índia	2008	YONG et al., 2009
DIM-1 (Dutch imipenemase)	<i>P. stutzeri</i>	Amsterdan/ Holanda	2007	POIREL et al., 2010
TMB-1 (Tripoli metalo- β -lactamase)	<i>A.xylosoxidans</i>	Tripoli/Libia	2012	EL SALABI et al., 2012

Nota: Ano³ = ano do primeiro isolamento

A. baumannii = *Acinetobacter baumannii*;

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

K. pneumoniae = *Klebsiella pneumoniae*

C. freundii = *Citrobacter freundii*

A. xylosoxidans = *Achromobacter xylosoxidans*

P. stutzeri = *Pseudomonas stutzeri*

Atualmente as M β LS constituem um problema mundial e sua ocorrência já foi descrita na Ásia, Europa, América, Oceania e na África. A detecção das M β LS vem crescendo em diferentes partes do mundo desde o início da década de 90 (NORDMANN; POIREL, 2002; GALES et al., 2003; FRITSCHKE et al., 2005; WALSH, 2005).

Conforme estudos de revisão realizados por Fritsche e colaboradores (2005) e Mendes e colaboradores (2006), as enzimas encontradas com maior frequência associadas a *P. aeruginosa* em diversas regiões do mundo são a IMP e a VIM, cujos genes responsáveis por sua codificação são, respectivamente, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}. No Brasil, diferente de outros países, a enzima M β L mais frequente é a SPM, codificada pelo gene *bla*_{SPM} (PICOLI, 2008; FIGUEIREDO et al., 2009).

Em 2010, foi publicado o primeiro relato de infecção causada por *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 fora do Brasil. A bactéria foi isolada em 2007 de um paciente suíço que havia recebido atendimento em um hospital universitário do Recife. Foi observado através de tipagem bacteriana por eletroforese de campo pulsado que este isolado identificado na Europa tinha um padrão de restrição do DNA quase idêntico ao das outras linhagens brasileiras, diferindo em apenas três ou quatro bandas, indicando que estes isolados de *P. aeruginosa* eram geneticamente semelhantes (SALABI et al., 2010).

2.2.2 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – KPC

Atualmente, o subgrupo clinicamente mais importante é o dentre as carbapenemases do grupo A é o da enzima KPC, que compreende 15 variantes identificadas até o momento (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; LAHEY, 2011; GenBank®, 2013). A KPC está

envolvida em surtos endêmicos e pseudo-endêmicos em regiões dos EUA e Israel, que em alguns casos foram causado por clones relacionados (WOODFORD et al., 2004; LEAVITT et al., 2007; NAVON-VENEZIA et al., 2009; HIRSCH; TAM, 2010). Outras áreas com altas taxas de prevalência é a província de Zhejiang, da China continental, embora isto ocorra provavelmente devido a sistemas de vigilância inconsistentes em diferentes regiões e, portanto, pode se prever que as taxas de outras províncias, são mais elevadas do que as estimadas (ZHANG et al., 2007; QI et al., 2010; WU et al., 2010). O mesmo vem acontecendo na Europa, onde as enzimas KPC vêm sendo cada vez mais detectadas, porém, é impossível determinar se este crescimento é devido ao aumento na prevalência ou a maior conscientização da notificação dos casos (WALSH, 2010).

Isolados KPC-positivos carregam enzimas que são capazes de hidrolisar diversos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, contudo são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (ZHANG et al., 2008; PEIRANO et al., 2009; GOREN et al., 2010). Observa-se também que a concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos diminui na presença de ácido clavulânico, devido à inibição da enzima (QUEENAN; BUSH, 2007).

Diversos estudos demonstram que isolados de *Klebsiella pneumoniae* KPC-positivos apresentam redução da susceptibilidade ou resistência a todos os β -lactâmicos, além de serem resistentes a aminoglicosídeos e fluorquinolonas (BRATU et al., 2005; POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007; ROCHE et al., 2009; CABRAL et al., 2012) e sensíveis a polimixina B e tigeciclina (LEAVITT et al., 2007; URBAN et al., 2008). Este perfil de resistência limita as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções graves, restringindo ao uso de tigeciclina e polimixinas (MONTEIRO et al., 2009).

Até o momento, a mobilização do gene *bla*_{KPC} ocorreu através de uma combinação de transferência de plasmídeos e do transposon Tn4401, sempre associados ao gene da carbapenemase, embora os elementos adicionais de inserção de outros transposons possam alterar seu ambiente genético imediato (GOOTZ et al., 2009; ROBLEDO et al., 2010). A disseminação das enzimas KPC para além dos Estados Unidos tem ocorrido através da dinâmica da população humana, a exemplo do estudo de Dortet e colaboradores (2008) que relataram isolados KPC-positivo (KPC-2) oriundos da França após o paciente ter sido admitido e ter recebido tratamento em um hospital de Nova York (WALSH et al., 2010).

Todas as enzimas KPC demonstram atividade carbapenemase, e só tinham sido encontradas em membros da família Enterobacteriaceae, todavia, as KPCs foram

recentemente identificadas e caracterizadas a partir de isolados de bacilos não fermentadores. Em Porto Rico, Robledo e colaboradores (2010) encontraram dez isolados do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, também positivos para KPC. Após sequenciamento genético observaram a presença de quatro variantes desta enzima: KPC-2, KPC-3, KPC-4 e a nova variante, KPC-10.

Em *Pseudomonas aeruginosa*, outro bacilo não fermentador, já foram detectadas enzimas KPC na Colômbia (KPC-2) (VILLEGAS et al., 2007), Porto Rico (KPC-5) (WOLTER et al., 2009), Trinidad e Tobago (KPC-2) (AKPAKA et al., 2009) e nos Estados Unidos (KPC-2) (POIREL et al., 2010a).

No Brasil há dois relatos de casos de bactérias do gênero *Pseudomonas* produtoras da enzima KPC-2. Almeida e colaboradores (2012) detectaram o primeiro caso de KPC-2 em um isolado clínico de *Pseudomonas putida*. Já o estudo realizado por Jácome e colaboradores (2012) detectaram a mesma enzima (KPC-2) presente em dois isolados clínicos de *P. aeruginosa*, sendo este o primeiro relato no Brasil.

2.2.3 Sistemas de Efluxo Multidroga

Em bactérias Gram-negativas, a membrana externa limita a taxa de antimicrobianos que entram na célula e os sistemas de efluxo multidroga exportam vários agentes antimicrobianos, de classes estruturalmente distintas, para fora da bactéria. Os transportadores de efluxo são expressos em todas as células vivas, agindo para protegê-las contra os efeitos tóxicos de produtos químicos orgânicos. A multirresistência bacteriana tem sido muitas vezes associada com a superexpressão destes transportadores. Os antimicrobianos expelidos para fora da célula têm que atravessar a membrana externa de baixa permeabilidade para, assim, entrar novamente na célula bacteriana, contudo as bombas de efluxo e a membrana externa trabalham em sinergia impedindo o retorno deste agente (POOLE, 2002). Os agentes antimicrobianos mais comumente expulsos pelas bombas de efluxo são macrólídeos, tetraciclina e quinolonas. Em todos os processos metabólicos há geralmente um elevado grau de especificidade para o transporte de proteínas e enzimas, embora as bombas de efluxo multidroga reconheçam uma ampla variedade de substratos estruturalmente e quimicamente diferentes (VILA et al., 2007).

Os sistemas de efluxo multidroga foram classificados de acordo com três critérios básicos: a fonte de energia utilizada pelo sistema, a relação filogenética com outros sistemas de efluxo e a especificidade de substratos, que é a capacidade de transportar diferentes

substratos pela membrana. Desta forma os sistemas de efluxo foram agrupados em cinco famílias: família *ATP binding cassette* (ABC), família *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE), *major facilitator superfamily* (MFS), família *small multidrug resistance* (SMR) e a família *resistance-nodulation-cell division* (RND), presentes tanto em bactérias Gram-negativas quanto em bactérias Gram-positivas (POOLE, 2007; VILA et al., 2007).

Os sistemas de efluxo da família ABC são dependentes de ATP. Já os da família MATE dependem de um sistema antiporte (prótons H^+) que acople cátions de sódio (Na^+). Os demais tipos de bombas de efluxo são dependentes da força motiva de prótons H^+ (antiporte), pois a expulsão antimicrobiana é realizada utilizando esta força como força motriz de efluxo. As principais bombas de efluxo envolvidas na multidroga resistência pertencem a este grupo de exportadores dependentes de força motiva de prótons, sendo a família RND o grupo mais importante, bem como as famílias MFS e SMR (MORITA et al., 2000; MAGNET et al., 2001; POOLE, 2002; ROUQUETTE-LOUGHLIN et al., 2003).

2.2.3.1 Família ABC

Os sistemas de efluxo do tipo ABC são transportadores multidroga dependentes de ATP, pois o utilizam como fonte de energia para expelir os agentes antimicrobianos para fora da célula. A essa família pertencem diversos sistemas que transportam fármacos, aminoácidos, açúcares, cátions, peptídeos, dentro outros. Poucos sistemas de efluxo desta família foram descritos em procariotos. Entretanto, estudos apontam que o papel dos sistemas de efluxo pertencentes à família ABC na resistência aos antimicrobianos é subestimado e estes membros estão raramente envolvidos na aquisição de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas (MAGNET et al., 2001; POOLE, 2002; LUBELSKI et al., 2007).

2.2.3.2 Família MATE

Os sistemas de efluxo da família MATE são bastante similares em tamanho aos sistemas pertencentes à família MSF, mas diferem quanto à sua sequência de aminoácidos. Esta família foi recentemente caracterizada com a identificação de NorM, que consiste em um sistema de transporte dependente de prótons H^+ e cátions Na^+ identificado em *Vibrio parahaemolyticus*, que confere resistência a detergentes, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (MORITA et al., 2000; ROUQUETTE-LOUGHLIN et al., 2003).

Embora tenham sido encontrados com ampla distribuição em procariotos, plantas e leveduras, necessita-se de mais conhecimento sobre os membros desta família, pois os dados que constam na literatura são recentes e escassos. Entretanto, esta situação poderá ser revertida com a caracterização da estrutura e da regulação destes transportadores, visto que os membros da família MATE parecem estar envolvidos na resistência aos antimicrobianos de importância clínica (MCKEEGAN, et al., 2003).

2.2.3.3 Família MFS

Esta é uma das mais antigas e maiores famílias, quanto a sua diversidade e números de sistemas de efluxo de drogas. É encontrada em todas as classes de organismos vivos e está envolvida no uniporte, simporte e antiporte de vários substratos como nutrientes, metabólitos, íons essenciais e drogas (SAIER JR, 2007).

Os sistemas de efluxo da família MFS estão divididos em duas subfamílias capazes de ejetar fármacos para o exterior da célula. São elas a subfamília DHA12 e DHA14, formadas por uma única proteína de membrana que diferem, apenas, pelo número de segmentos transmembrana. Esta família é dependente da força próton-motriz, a qual realiza o transporte de drogas para o exterior na célula através de antiporte com H^+ (íons hidrogênio) (VARDY et al., 2005).

2.2.3.4 Família SMR

A família SMR é dividida em dois grupos filogenéticos e, aparentemente, apenas um deles está relacionado à extrusão de drogas; Assim como a família MFS, a SMR também utiliza a força próton-motriz como fonte de energia para ejetar drogas para o exterior da célula (PUTMAN et al., 2000).

Os membros desta família são compostos por uma série de proteínas com quatro segmentos transmembrana que, acopladas ao potencial de membrana, expulsam para o exterior celular detergentes, antimicrobianos, entre outros compostos (LI et al., 2003).

2.2.3.5 Família RND

A família RND é constituída por uma proteína de membrana interna (bomba RND – transportador), ligada por uma proteína de fusão maior (MFP) e um fator de membrana externa (OMF) que juntos são capazes de expulsar uma grande variedade de substratos. Esta é

a família de bombas de efluxo mais clinicamente relevante, pois conferem resistência intrínseca e adquirida a bactérias Gram-negativas. Geralmente, os genes que codificam os sistemas de efluxo pertencentes a esta família estão localizados no cromossomo bacteriano, porém a expressão destes genes já foi reportada em plasmídeos (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; COYNE et al., 2011).

Através do sistema antiporte de íons H^+ , os sistemas RND de efluxo exportam uma grande variedade de substratos, dentre eles: antimicrobianos, antissépticos, desinfetantes, detergentes, corantes, ácidos graxos tóxicos, sais biliares, solventes, entre outros (POOLE, 2007).

O funcionamento destas bombas é baseado na abertura de um canal que atravessa as membranas externa e interna, permitindo que o antimicrobiano seja eliminado para o meio extracelular. Este canal é composto por três proteínas, onde a primeira é a bomba propriamente dita, dependente de energia, localizada na membrana citoplasmática e com função de transporte; a segunda, com função de facilitar a passagem dos antimicrobianos pela membrana externa e a terceira, de localização periplasmática, que faz a ligação entre as outras duas. Os genes que codificam os sistemas de efluxo são organizados em operons, onde o primeiro gene codifica a proteína periplasmática, o segundo a proteína de transporte e o terceiro a proteína da membrana externa (LIVERMORE, 2002; JO et al., 2003; STRATEVA; YORDANOV, 2009).

Pseudomonas aeruginosa possui em seu genoma genes que codificam 12 sistemas de efluxo da família RND denominados *mex* (*multidrug efflux pump*). Sua expressão é codificada por operons, sempre regulados pelo produto de um gene regulador proximal. Até o presente momento, sete desses sistemas já foram caracterizados: o MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK, MexGHI-OpmD e MexVW-OprM. Estes sistemas de efluxo são designados de MDR (multidroga resistentes), pois conferem resistência a múltiplos antimicrobianos (OKAMOTO; GOTOH; NISHINO, 2001; POOLE, 2007; ASKOURA; MOTTAWEA; TAHER, 2011).

Pseudomonas aeruginosa apresenta resistência intrínseca a diversos antimicrobianos. Isto é devido, principalmente, à presença de sistemas constitutivos de efluxo. O MexAB-OprM foi o primeiro sistema de efluxo da família RND caracterizado em *P. aeruginosa* (POURNARAS, et al., 2005). Dos sete sistemas já caracterizados, somente o MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM têm sido relacionados à resistência intrínseca e adquirida a uma ampla variedade de antimicrobianos de importância clínica. Os demais

sistemas ainda não foram detectados em isolados clínicos e por isso acredita-se que eles não sejam relevantes clinicamente, pois são capazes de ejetar um número reduzido de agentes antimicrobianos quando comparados com os demais sistemas de efluxo da família RND já caracterizados em isolados de *P. aeruginosa* (POOLE, 2007).

O sistema MexAB-OprM é o mais importante e, além disso, é expresso constitutivamente pela *P. aeruginosa*, promovendo resistência intrínseca e adquirida a diversos antimicrobianos. Os substratos dessa bomba incluem os β -lactâmicos, inibidores de β -lactamases, fluoroquinolonas, tetraciclina, novobiocina, cloranfenicol, macrolídeos, sulfonamidas e trimetoprim, dentre outros compostos, como detergentes, corantes e triclosan. É importante notar que este sistema exporta β -lactâmicos, uma classe de antimicrobiano pouco frequente como substrato para os sistemas de efluxo, incluindo os carbapenêmicos com exceção do imipenem (MASUDA et al., 2000; YONEYAMA et al., 2000; NARITA et al., 2003; ASKOURA et al., 2011).

O sistema MexEF-OprN é expresso em níveis muito baixos em cepas selvagens de *P. aeruginosa* e parece não contribuir significativamente para a resistência natural desta espécie. Esta bomba induz uma maior resistência às fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim e carbapenêmicos, além de induzir hipersensibilidade a vários β -lactâmicos e aminoglicosídeos (LLANES et al., 2011).

Já o sistema de efluxo MexXY-OprM, confere a *P. aeruginosa* resistência a tetraciclina, eritromicina e aminoglicosídeos. A expressão deste sistema em *P. aeruginosa* é induzida na presença de aminoglicosídeos, assim, acredita-se que o efluxo ativo de drogas pelo sistema MexXY-OprM seja o mecanismo responsável pela resistência adaptativa de *P. aeruginosa* aos aminoglicosídeos, já que foi observado que a exposição prolongada de cepas selvagens de *P. aeruginosa* sensíveis a esta classe de agentes antimicrobianos resulta no desenvolvimento de resistência e, conseqüentemente, leva à hiperexpressão deste sistema de efluxo (AIRES et al., 1999; HOCQUET et al., 2003; ASKOURA et al., 2011). Quando hiperexpresso, também é capaz de induzir resistência às fluoroquinolonas, apesar de não contribuir para a resistência intrínseca de *P. aeruginosa* a estes antimicrobianos (MINE et al., 1999).

2.3 Métodos de Genotipagem

As infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) são uma importante causa de morbidade e mortalidade tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, e a transmissão de bactérias associadas a surtos hospitalares pode ser controlada através de medidas adequadas. Para que isso seja possível, entretanto, é essencial discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie. Uma das primeiras etapas na investigação de um possível surto hospitalar é detectar a linhagem que está originando os casos de infecção. Para tanto, deve-se proceder à tipificação epidemiológica da mesma. As investigações epidemiológicas têm-se tornado mais efetivas em decorrência do aprimoramento de diferentes métodos de tipagem de micro-organismos. Esses métodos podem se basear em características fenotípicas, como os métodos tradicionais ou utilizar métodos moleculares mais avançados, os quais permitem analisar as características genotípicas destes micro-organismos (TENOVER et al., 1995; WALSH et al., 2010).

A utilização da biologia molecular para a identificação de subtipos de microrganismos vem gerando importantes informações de interesse epidemiológico e clínico, como, a eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) e reação em cadeia da polimerase com iniciador arbitrário (*Random Amplification Polymorphic DNA* - RAPD). Esses recursos são reconhecidos e tidos como técnicas recomendadas para a tipagem de patógenos nosocomiais. O PFGE consiste na migração de fragmentos de DNA através do uso de diversos campos elétricos gerados em posições diferentes e alternadas, apresentando importância para o estudo da epidemiologia hospitalar de muitos microrganismos devido à sua alta capacidade discriminatória, boa reprodutibilidade e fácil interpretação (LOUREIRO et al., 2002; WALSH et al., 2010). O RAPD é um tipo de reação de PCR, mas os segmentos de DNA que são amplificados são aleatórios. Por meio destas técnicas, pode-se determinar a variabilidade genética, distâncias filogenéticas, demonstrar a relação entre os isolados bacterianos e elucidar suas vias de transmissão (SADER et al., 1993; WALSH et al., 2010).

A descoberta de que genomas de procariotos contêm sequências repetitivas como as denominadas ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), tem expandido o uso da biologia molecular e demonstra-se útil para avaliar a variabilidade genética de vários isolados bacterianos (VERSALOVIC et al., 1991). Esta técnica origina sequências de consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC) ou unidades intergênicas repetitivas (IRU) que ocorrem em múltiplas cópias no genoma bacteriano, principalmente das enterobactérias e vibriões (WILSON; SHARP, 2006). A ERIC-PCR possui uma maior

aplicabilidade e poder discriminatório e pode substituir o RAPD-PCR ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), os quais são requeridos para demonstrar pequenos níveis de variabilidade genética (GEORGHIOU et al., 1995; MAURER et al., 1998). Adicionalmente, estudos demonstraram que a ERIC-PCR apresenta boa correlação com PFGE, considerado o “padrão ouro” na tipagem de micro-organismos (GUNAWARDANA; TOWNSEND; FROST, 2000).

Lipman e colaboradores (1995) citaram que a genotipagem pelo método de ERIC-PCR é mais prático, simples e rápido. Esta técnica é baseada na análise de sequências cromossômicas repetidas, que tem sido usada para a caracterização clonal de diferentes espécies de enterobactérias e para o estudo da relação genética entre isolados (COSTA et al., 2006). Visando uma maior precisão da tipagem de microrganismos, técnicas moleculares foram desenvolvidas, apresentando elevada importância entre as linhagens envolvidas em casos de infecção hospitalar, pois se aproximaram da possibilidade de erradicação de fontes ambientais, prevenção de infecções cruzadas e monitoramento da eficácia da terapia antimicrobiana (SILBERT et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de susceptibilidade, o perfil genotípico de resistência (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *mexA*, *mexE* e *mexX*) e clonal de isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes internados em um hospital universitário em Recife, Pernambuco.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* frente aos antimicrobianos;
- Pesquisar a ocorrência dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} nos isolados de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou imipenem e/ou meropenem;
- Pesquisar a ocorrência dos genes *mexA*, *mexE* e *mexX* nos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes;
- Pesquisar a ocorrência do gene *bla*_{KPC} nos isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos;
- Investigar o perfil clonal dos isolados de *P. aeruginosa* pela técnica da ERIC-PCR;

4. MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo de base laboratorial que visa determinar o perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos preconizados pelo CLSI, a frequência da ocorrência dos genes de resistência (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *mexA*, *mexE* e *mexX*) e os clones circulantes de *P. aeruginosa* provenientes dos isolados clínicos de pacientes internados em um hospital universitário em Recife, Pernambuco, durante o período de abril a agosto de 2011 e maio a setembro de 2012.

4.2 Local do estudo

O estudo foi realizado em um hospital universitário em Recife, estando apto para a realização de pesquisas científicas que visam à melhora da qualidade dos serviços que são ofertados à população do estado de Pernambuco.

O hospital em estudo conta com 413 leitos, sendo 11 leitos destinados à Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) adulto e UTI cirúrgica, e 13 leitos destinados à UTI neonatal e Unidade de Cuidados Intermediários (UCI). Os 389 leitos restantes estão distribuídos nas enfermarias das diversas especialidades oferecidas neste hospital.

4.3 População alvo

Isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes internados em um hospital universitário em Recife, que foram fornecidos pelo laboratório de análises clínicas do próprio hospital, durante o período estabelecido.

4.4 Considerações éticas

O projeto de pesquisa para a realização deste estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, conforme as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde/CNS número 196/96, as quais estabelecem diretrizes e normas reguladoras de pesquisas envolvendo seres humanos. A carta de aprovação do CEP pode ser vista na seção anexo deste estudo (ANEXO A), bem como a carta de aprovação do adendo para continuação desta pesquisa também aprovada pelo CEP (ANEXO B).

4.5 Padronização e Técnicas Laboratoriais Empregadas

4.5.1 Isolados bacterianos

Cento e vinte isolados clínicos de *P. aeruginosa*, previamente identificados pelo sistema automatizado Phoenix™ (BD - Becton Dickinson and Company) do hospital universitário em estudo foram semeados em tubos rosqueados contendo Ágar Casoy (OXOID) inclinado e transportados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical/UFPE, para dar continuidade ao seu processamento. Após incubação em estufa a 37°C/24 horas, os isolados foram semeados em Ágar Cetrimide (HIMEDIA) para a confirmação da espécie bacteriana e para avaliar as características microbiológicas típicas da *P. aeruginosa*, como a produção de pigmentos, morfologia das colônias e produção do odor característico.

4.5.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Após a confirmação da pureza dos isolados de *P. aeruginosa* foi realizado o antibiograma pela técnica de difusão de discos em Ágar Mueller-Hinton (DIFCO) ou método de Kirby-Bauer, de acordo com os padrões definidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), para *P. aeruginosa*, utilizando os seguintes antimicrobianos: ceftazidima, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, aztreonam, gentamicina, polimixina B, ticarcilina-ácido clavulânico e amicacina (DME). A leitura dos halos de inibição formados foi realizada utilizando paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros e interpretados de acordo com os padrões existentes na literatura (BAUER; KIRBY, 1966; CLSI, 2012). Como controle de qualidade para o teste do antibiograma utilizamos a cepa controle de *P. aeruginosa* 27853 da *American Type Culture Collection* (ATCC). Todos os resultados foram comparados com as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) determinadas pelo sistema automatizado Phoenix™ (BD - Becton Dickinson and Company) do hospital em estudo e foi possível verificar a equivalência entre os resultados dos dois métodos.

4.5.3 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada utilizando o kit Brazol (LGC-Biotecnologia), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, como mostra o esquema abaixo:

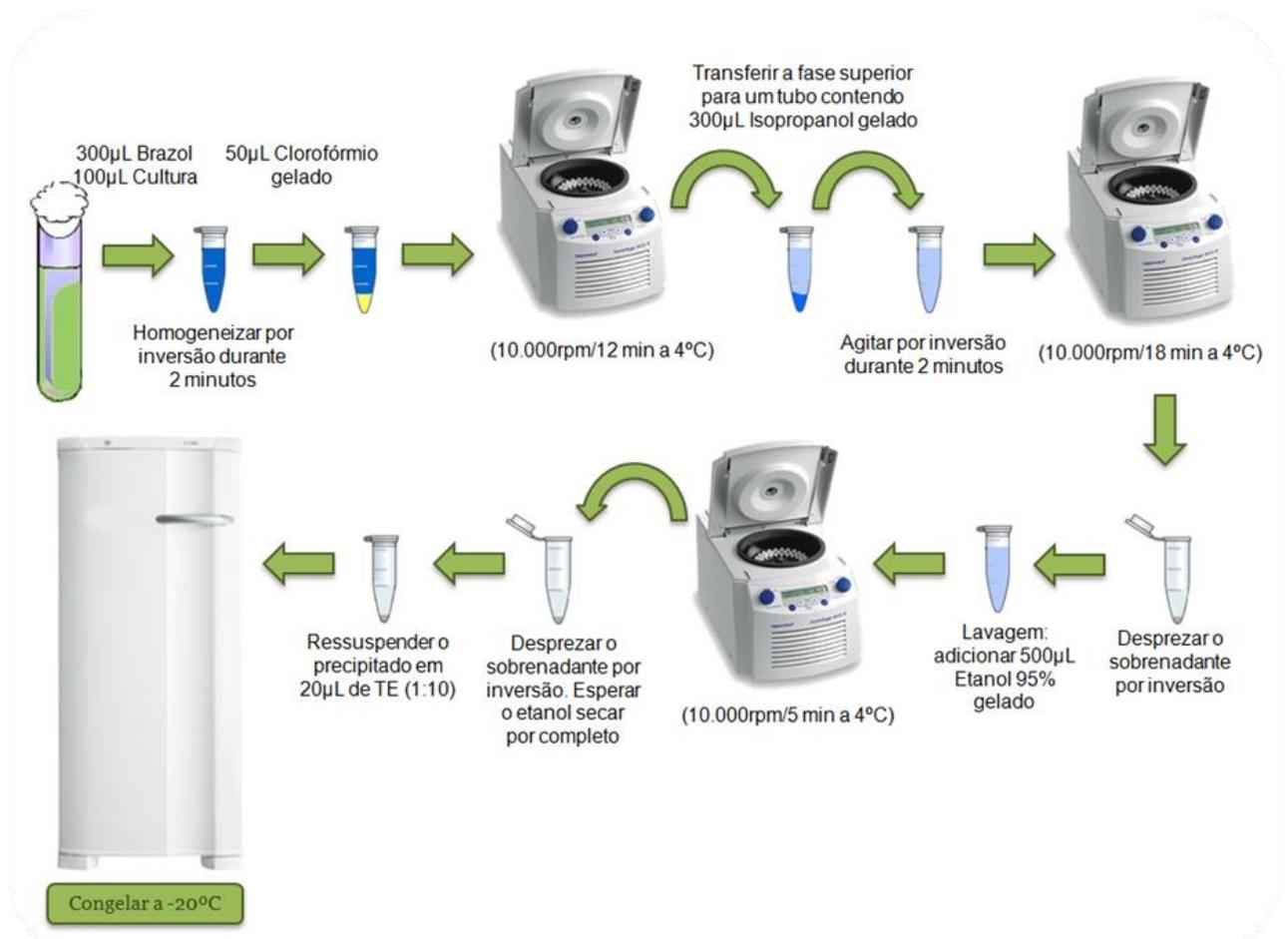


Figura 1 – Esquema representativo da técnica de extração de DNA utilizando o Kit Brazol (cedido pela pesquisadora M.Sc. Paula Jácome)

Após a extração do DNA bacteriano foi realizada a sua quantificação no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) utilizando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), espectrofotômetro cuja faixa de comprimento de onda é completa (190 a 840nm) e garante uma alta precisão e reprodutibilidade.

4.5.4 Condições da PCR para identificação dos genes de resistência *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}

Os isolados resistentes a ceftazidima e/ou imipenem e/ou meropenem foram selecionados para a pesquisa de MβLs. Estes foram submetidos a PCR para a detecção dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}, cujos iniciadores estão descritos na Tabela 2, a seguir:

Tabela 2 – Relação dos iniciadores e temperaturas de anelamento para a pesquisa de genes de MBL

Gene	Iniciadores (Primers)	Temperatura de anelamento (°C)	Referências
<i>bla_{IMP}</i>	F(5' GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC 3') R(5' GTGATGCGTCYCCAAYTTCAC 3')	51	DONG et al., 2008
<i>bla_{VIM}</i>	F (5' CAGATTGCCGATGGTGTGG 3') R (5' AGGTGGGCCATTCAGCCAGA 3')	57	DONG et al., 2008
<i>bla_{SPM-1}</i>	F(5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3') R(5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3')	55	GALES et al., 2003

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 25 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (IDT), Tampão 1x (PROMEGA), 100 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (LUDWIG BIOTEC), 1,5 mM de MgCl₂ (PROMEGA) e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (PROMEGA). Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo para os genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, e *bla_{VIM}* cedidos gentilmente pela Prof^a Márcia Camargo (UPE). As amplificações destes genes foram realizadas em termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento segundo temperatura dos iniciadores por 1 minuto (conforme a tabela 2), e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos realizou-se uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C (GALES et al., 2003).

4.5.5 Condições da PCR para identificação do gene de resistência *bla_{KPC}*

Os isolados resistentes aos carbapenêmicos foram submetidos à pesquisa para o gene de resistência *bla_{KPC}* segundo metodologia e iniciadores descritos por Yigit et al., (2001). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 5 ng DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (EUROFINS) ([5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3'] e [5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3']), Tampão 1x (PROMEGA), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato(LUDWIG BIOTEC), 1,5 mM de MgCl₂ (PROMEGA) e 2U da enzima *Taq* DNA polimerase (PROMEGA). Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo constituído pela cepa de *P. aeruginosa* P22A proveniente da bacterioteca do nosso grupo de pesquisa. Os

parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 35 ciclos realizou-se uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72°C.

4.5.6 Condições da PCR para identificação dos genes de resistência *mexA*, *mexE* e *mexX*

Os isolados MDR foram submetidos à pesquisa dos genes de resistência *mexA*, *mexE* e *mexX* cujos iniciadores estão descritos na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3 – Relação dos iniciadores e temperaturas de anelamento para a pesquisa de genes dos sistemas de efluxo multidroga

Gene	Iniciadores (Primers)	Temperatura de anelamento (°C)	Referências
<i>mexA</i>	F(5' CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC 3')	71°C	OZER et al., 2011
	R(5' GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC 3')		
<i>mexE</i>	F (5' CCAGGACCAGCACGAACTTCTTGC 3')	69°C	OZER et al., 2011
	R (5' CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCACC 3')		
<i>mexX</i>	F(5' TGAAGGCGGCCCTGGACATCAGC 3')	71°C	OZER et al., 2011
	R(5' GATCTGCTCGACGCGGGTCAGCG 3')		

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 10 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (EUROFINS), Tampão 1x (PROMEGA), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (LUDWIG BIOTEC), 2 mM de MgCl₂ (PROMEGA) e 1U de *Taq* DNA polimerase (PROMEGA). Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo constituído da cepa de *P. aeruginosa* PAO1 gentilmente cedida pela Prof^a Márcia Carmargo (UPE). Os parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Após os 35 ciclos realizou-se uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C (OZER et al., 2011).

4.5.7 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação pela técnica de PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose (FISHER BIOREAGENTS®) em tampão TBE 0,5x e voltagem constante de 100 v. Um marcador de 100pb (AMRESCO) foi utilizado como padrão de peso molecular. Os produtos foram adicionados de Blue ou Green (JENA BIOSCIENCE), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados para posteriores análises.

4.5.8 ERIC-PCR

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (EUROFINS) (ERIC-1 [5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), Tampão 1x (PROMEGA), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (LUDWIG BIOTEC), 1,5 mM de MgCl₂ (PROMEGA) e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (PROMEGA) (DUAN et al., 2009). Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação 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 PCR foram corados com Green (JENA BIOSCIENCE) e submetidos à eletroforese em géis de agarose (FISHER BIOREAGENTS®) a 1,5%, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais, através da construção de um dendrograma utilizando o software PAST.

4.5.9 RAPD

As reações de RAPD foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 40 ng de DNA genômico, 10 pmol do iniciador (EUROFINS) M13 (5'- GAGGGTGGCGGTTCT-3'), Tampão 1x (PROMEGA), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (LUDWIG BIOTEC), 3 mM de MgCl₂ (PROMEGA) e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (PROMEGA) (FONSECA et al., 2008). Os parâmetros de amplificação utilizados na RAPD foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Após os 40 ciclos realizou-se uma etapa de alongamento final de 6 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram corados com Green (JENA BIOSCIENCE) e submetidos à

eletroforese em géis de agarose (FISHER BIOREAGENTS®) a 1%, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais.

5. ARTIGO 1

Detecção dos sistemas de efluxo (MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexXY-OprM), metalo- β -lactamases (SPM, IMP, VIM) e perfil clonal em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de um hospital universitário em Recife, Pernambuco.

Autores:

- (1) Lílian Rodrigues Alves – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Mestranda em Medicina Tropical.
- (2) Jailton da Costa Lobo - Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas. Bacharel em Biomedicina.
- (3) Marcelle Aquino Rabelo – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Doutoranda em Medicina Tropical.
- (4) Armando Monteiro Bezerra Neto – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Mestre em Medicina Tropical.
- (5) Ana Catarina de Souza Lopes – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical. Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco.
- (6) Maria Amélia Vieira Maciel – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical. Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco.

Endereços para Correspondência:

Lílian Rodrigues Alves

Rua Coronel João Ribeiro, 844 – Bairro Novo, Olinda-PE / Brasil

CEP: 53030-040

Tel. +55(81)3429-0204

e-mail: lilianalves88@hotmail.com

Maria Amélia Vieira Maciel

Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Medicina Tropical.

Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil

50670-901

Tel. 21268526

e-mail: amelia57@gmail.com

Revista:

A estruturação do artigo procura estar de acordo com os requisitos de publicação do Current Microbiology, no formato de artigo original.

Resumo

Introdução: *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista associado a infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS), cuja principal característica é a capacidade de desenvolver resistência a diversos antimicrobianos, por meio da produção de enzimas metalo- β -lactamase (M β L) e hiperexpressão dos sistemas de efluxo. Estes dois mecanismos contribuem para a resistência a múltiplos antibióticos. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil de susceptibilidade e genético de resistência, e a similaridade genética em isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes internados em hospital universitário em Recife-PE, no período de abril a agosto de 2011 e maio a setembro de 2012. **Metodologia:** Os isolados de *P. aeruginosa* coletados foram submetidos à técnica de disco-difusão para determinar o perfil de susceptibilidade. A pesquisa dos genes *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} em isolados resistentes a ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMP) ou meropenem (MPM) e a pesquisa dos genes *mexA*, *mexE* e *mexX* em isolados multidroga resistentes (MDR) foram realizadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Todos os isolados foram submetidos à tipagem molecular através da PCR de sequências de consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR). **Resultados:** Cento e vinte isolados de *P. aeruginosa* apresentaram taxas de resistência que variaram de 7,5% para polimixina a 52,5% para cefotaxima. Em nenhum dos 17 isolados resistentes a CAZ e IMP ou MPM foram detectados os genes para M β L. Sessenta e nove isolados (57,5%) foram considerados MDR por apresentar resistência a mais de três classes de antimicrobianos. Os genes *mexA* e *mexE* foram detectados em 67/69 isolados de *P. aeruginosa* MDR e o *mexX* em 66/69. A ERIC-PCR demonstrou 82 perfis genéticos distintos. **Conclusões:** Os sistemas de efluxo parecem contribuir para a resistência de *P. aeruginosa* e a ausência de M β Ls indica uma possível mudança epidemiológica na resistência bacteriana no hospital estudado. A heterogeneidade genética encontrada sugere a ocorrência de mutações não letais nos isolados bacterianos.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; infecção; resistência; tipagem molecular.

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes causadores de infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) por apresentar resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, além de poder adquirir novos mecanismos de resistência durante o tratamento do paciente [1-3].

O aumento da prevalência de isolados de *P. aeruginosa* multidroga resistente (MDR) compromete seriamente a escolha do tratamento adequado, gerando altas taxas de morbidade e mortalidade [4]. Os principais mecanismos envolvidos na multidroga resistência em isolados clínicos de *P. aeruginosa* são as enzimas metalo- β -lactamases (M β LS) e os sistemas de efluxo multidroga [5,6].

O primeiro isolado de *P. aeruginosa* produtor de M β L foi descrito no Japão em 1991 e, desde então, as metalo-enzimas têm se disseminado em todo o mundo. Estas enzimas hidrolisam todos os β -lactâmicos (incluindo os carbapenêmicos), com exceção dos monobactâmicos. As M β LS mais comuns em todo o mundo são as do tipo VIM, IMP, GIM, SPM, SIM e, mais recentemente, NDM [7]. No Brasil foram encontrados três tipos de M β L em isolados de *P. aeruginosa*: SPM, IMP e VIM, sendo predominante a variante brasileira (SPM) [8].

Os principais sistemas de efluxo em *P. aeruginosa* pertencem à família *Resistance-Nodulation-Cell Division* (RND) [6]. O funcionamento destas bombas é baseado na abertura de um canal que atravessa as membranas externa e interna, permitindo que o antimicrobiano seja eliminado para o meio extracelular. Este canal é composto por três proteínas, onde a primeira é a bomba propriamente dita, dependente de energia, localizada na membrana citoplasmática e com função de transporte; a segunda, com função de facilitar a passagem dos antimicrobianos pela membrana externa e a terceira, de localização periplasmática, que faz a ligação entre as outras duas. Os genes que codificam os sistemas de efluxo são organizados em operons, onde o primeiro gene codifica a proteína periplasmática, o segundo a proteína de transporte e o terceiro a proteína da membrana externa [9,10]. Existem 12 tipos de sistemas de efluxo da família RND, sendo que apenas três estão envolvidos na resistência de isolados clínicos de *P. aeruginosa*, são eles: MexAB-OprM, MexEF-OprN e MexXY-OprM [11].

Além da pesquisa de genes de resistência, outro instrumento no controle de infecções é a aplicação de métodos de genotipagem para a determinação das relações genéticas entre os micro-organismos, permitindo assim o mapeamento dinâmico de transmissão da infecção [8]. Um método de genotipagem bacteriana tem se mostrado bastante promissor e é baseado na

amplificação por PCR de sequências de consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR). Esta técnica permite evidenciar diferenças em um grupo fenotipicamente idêntico, tendo impacto na intervenção terapêutica por identificar cadeias de transmissão em surtos hospitalares [12-14].

O presente estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital universitário em Recife-PE, quanto a presença dos genes de resistência (*bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *mexA*, *mexE* e *mexX*) e o seu perfil de similaridade genética, evidenciado pela ERIC-PCR.

Materiais e Métodos

Os 120 isolados de *P. aeruginosa*, coletados durante o período de abril a agosto de 2011 e maio a setembro de 2012, foram previamente identificados pelo sistema automatizado Phoenix™ (BD - Becton Dickinson and Company) do hospital universitário em estudo. Em seguida, foram semeados em tubos contendo ágar Casoy e, após tempo de incubação em estufa foram semeados em placas de ágar Cetrimide, para confirmação da espécie bacteriana.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliado através da técnica de disco-difusão ou método de Kirby-Bauer, utilizando ceftazidima, imipenem, meropenem, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, aztreonam, gentamicina, polimixina B, ticarcilina/ácido clavulânico e amicacina, conforme recomendações do CLSI [15]. Como controle de qualidade para o teste do antibiograma utilizamos a cepa controle de *P. aeruginosa* 27853 da *American Type Culture Collection* (ATCC). Todos os resultados foram comparados com as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) determinadas pelo sistema automatizado Phoenix™ (BD - Becton Dickinson and Company) do hospital em estudo e foi possível verificar a equivalência entre os resultados dos dois métodos.

Para pesquisa de genes de resistência foi extraído o DNA total dos isolados utilizando o kit Brazol (LGC Biotecnologia), conforme instruções do fabricante.

Os isolados resistentes a ceftazidima e imipenem ou meropenem foram selecionados para a pesquisa de MβLs. Estes foram submetidos a PCR para a detecção dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}, cujos iniciadores estão descritos na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1 – Relação dos iniciadores e temperaturas de anelamento para a pesquisa de genes de MβL

Gene	Iniciadores (Primers)	Temperatura de anelamento (°C)	Referências
<i>bla_{IMP}</i>	F(5' GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC 3')	51	[16]
	R(5' GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT 3')		
<i>bla_{VIM}</i>	F(5' CAGATTGCCGATGGTGTGG 3')	57	[16]
	R(5' AGGTGGGCCATTCAGCCAGA 3')		
<i>bla_{SPM-1}</i>	F(5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3')	55	[17]
	R(5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3')		

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 25 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores, Tampão 1x, 100 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo para os genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*. As amplificações destes genes foram realizadas em termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento segundo temperatura dos iniciadores por 1 minuto (conforme a tabela 1), e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos realizou-se uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram corados e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 05x sob voltagem constante de 100V [17].

Os isolados MDR foram submetidos à pesquisa dos genes de resistência *mexA*, *mexE* e *mexX* cujos iniciadores estão descritos na Tabela 2, a seguir:

Tabela 2 – Relação dos iniciadores e temperaturas de anelamento para a pesquisa de genes dos sistemas de efluxo multidroga

Gene	Iniciadores (Primers)	Temperatura de anelamento (°C)	Referências
<i>mexA</i>	F(5' CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC 3')	71°C	[18]
	R(5' GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC 3')		
<i>mexE</i>	F(5' CCAGGACCAGCACGAACCTTCTTGC 3')	69°C	[18]
	R(5' CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCACC 3')		
<i>mexX</i>	F(5' TGAAGGCGCCCTGGACATCAGC 3')	71°C	[18]
	R(5' GATCTGCTCGACGCGGGTCAGCG 3')		

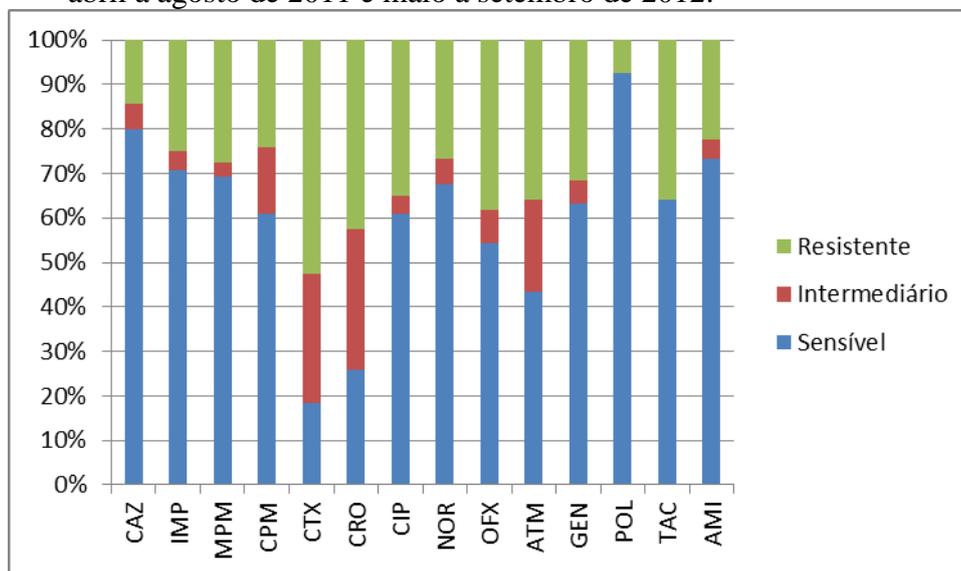
As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 10 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores, Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 2 mM de MgCl₂ e 1U de *Taq* DNA polimerase. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo constituído da cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Os parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento segundo temperatura dos iniciadores (conforme a tabela 2) por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Após os 35 ciclos realizou-se uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram corados e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 05x sob voltagem constante de 100V [18].

A pesquisa da relação genética entre os isolados foi realizada através da técnica de ERIC-PCR. As reações foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase [19]. Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação 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 PCR foram corados e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 05x sob voltagem constante de 100V. A análise dos dados e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software PAST (Copyright Hammer & Harper).

Resultados

Cento e vinte isolados de *P. aeruginosa* foram coletados durante o período de estudo. Os dados de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos estão apresentados na Figura 1. Os maiores percentuais de resistência foram observados frente à cefotaxima (52,5%), ceftriaxona (42,5%) e ofloxacina (38,3%), enquanto que a polimixina B, ceftazidima e ampicilina apresentaram os maiores percentuais de sensibilidade, com 92,5%, 80,0% e 73,3%, respectivamente.

Figura 1 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital universitário em Recife-PE, durante o período de abril a agosto de 2011 e maio a setembro de 2012.



Nota: CAZ = ceftazidima; IMP = imipenem; MPM = meropenem; CPM = cefepime; CTX = cefotaxima; CRO = ceftriaxona; CIP = ciprofloxacina; NOR = norfloxacina; OFX = ofloxacina; ATM = aztreonam; GEN = gentamicina; POL = polimixina B; TAC = ticarcilina/ácido clavulânico; AMI = ampicilina

Entre os 17 isolados resistentes a ceftazidima e imipenem ou meropenem, nenhum foi positivo para a pesquisa dos genes para $M\beta L$, bla_{SPM-1} , bla_{IMP} e bla_{VIM} .

Observou-se também que 57,5% (69/120) dos isolados eram multirresistentes. Destes, 8,7% (6/69) eram sensíveis apenas a polimixina B e 1,45% (1/69) era panresistente. Os isolados de *P. aeruginosa* MDR foram submetidos à pesquisa dos genes *mexA*, *mexE* e *mexX*. Os genes *mexA* e *mexE* foram detectados em 97,1% (67/69) dos isolados MDR e o gene *mexX* foi detectado em 95,6% (66/69) dos isolados. As Figuras 3a, 3b e 3c ilustram os géis de agarose com os produtos de PCR para cada gene dos sistemas de efluxo multidroga. A Tabela 3 mostra o perfil de susceptibilidade deste isolados com as bombas de efluxo encontradas.

Figura 2 – Gel de eletroforese dos produtos de PCR: **a.** Gene *mexA* (amplicon 316pb); **b.** Gene *mexE* (amplicon 114pb); **c.** Gene *mexX* (amplicon 326pb).

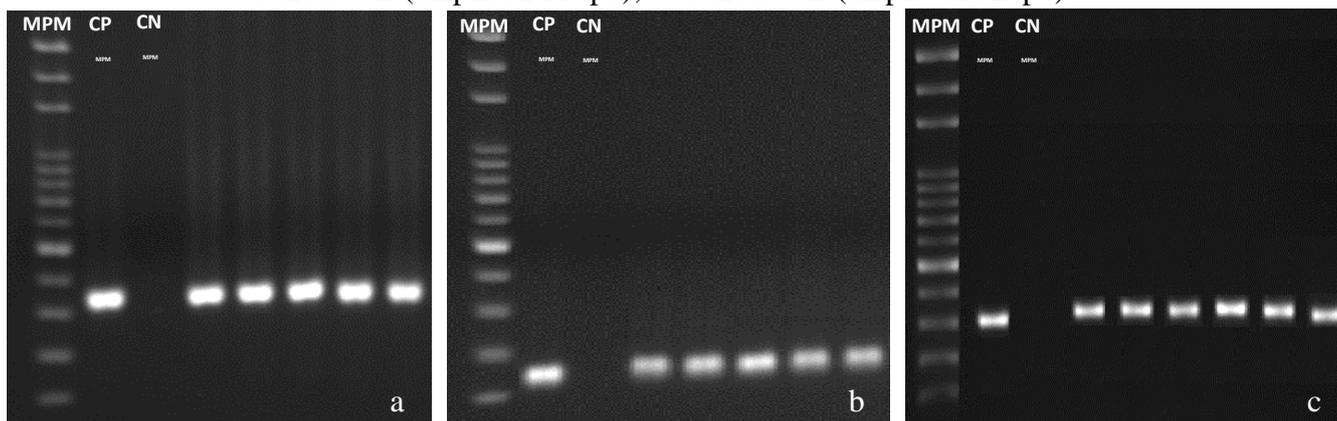


Tabela 3 – Perfil de resistência aos antimicrobianos e genes de bombas de efluxo presentes em isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital universitário em Recife-PE, durante o período de abril a agosto de 2011 e maio a setembro de 2012.

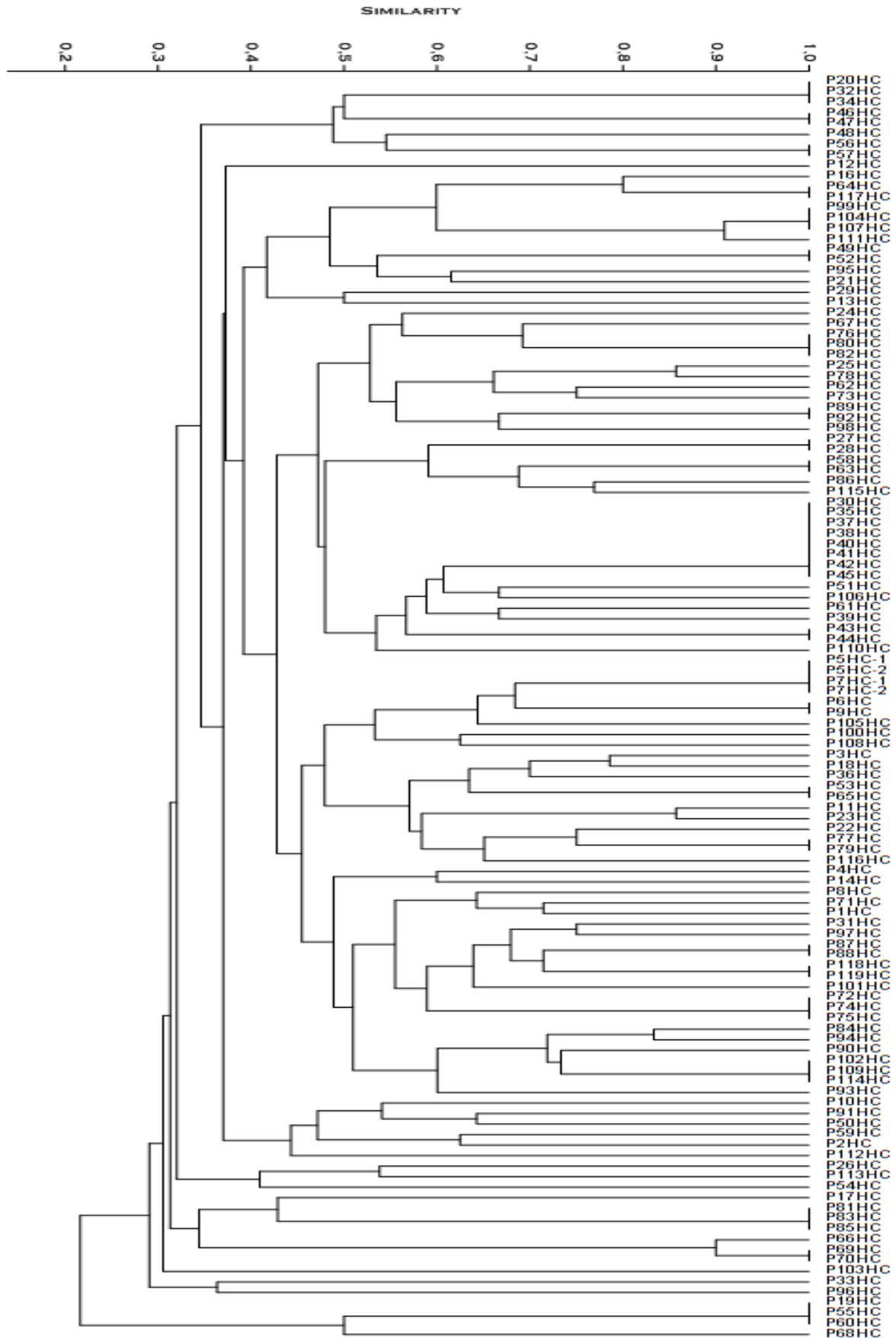
ISOLADO BACTERIANO	PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	GENES DE RESISTÊNCIA
P1HC	CAZ, CTX, CRO, ATM, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P2HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, GEN, AMI,	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P3HC	CTX, CRO, ATM, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P4HC	CTX, CRO, CIP, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P5HC-2	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, ATM, TAC, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P7HC-2	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, ATM, TAC, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P8HC	CTX, CRO, ATM, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P11HC	CTX, CRO, ATM, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P14HC	CTX, CRO, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P17HC	CTX, CRO, ATM, TAC	-
P20HC	CTX, CRO, IMP, ATM, GEN, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P24HC	CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN	<i>mexA, mexE</i>
P30HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P31HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P33HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN, AMI, POL	-
P34HC	CTX, CRO, OFX, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P35HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P36HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P37HC	CTX, CRO, OFX, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P38HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P40HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P41HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, OFX, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P42HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P44HC	CTX, CRO, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P45HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P46HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P47HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P49HC	CPM, CTX, CIP, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P53HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P56HC	CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P57HC	CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P61HC	CIP, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P62HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P63HC	CPM, CTX, CRO, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P64HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P65HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P67HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P71HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, ATM, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P72HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P73HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, OFX, ATM, TAC, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P74HC	CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P75HC	CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P76HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P77HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P78HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P79HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>

P80HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P81HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P82HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P83HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P85HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P90HC	CAZ, CTX, CRO, MPM, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P92HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P93HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, GEN, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P95HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P96HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P97HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P99HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P100HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P102HC	CTX, CRO, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P104HC	CPM, CTX, CRO, IMP, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P105HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P107HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P109HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P111HC	CTX, CRO, IMP, MPM, NOR, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P114HC	CTX, CRO, IMP, MPM, ATM, TAC, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P115HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P118HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P119HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>

Nota: CAZ = ceftazidima; IMP = imipenem; MPM = meropenem; CPM = cefepime; CTX = cefotaxima; CRO = ceftriaxona; CIP = ciprofloxacina; NOR = norfloxacina; OFX = ofloxacina; ATM = aztreonam; GEN = gentamicina; POL = polimixina B; TAC = ticarcilina/ácido clavulânico; AMI = amicacina

A genotipagem dos isolados de *P. aeruginosa* pela ERIC-PCR revelou 82 perfis genéticos distintos, conforme apresentado no dendrograma (Figura 3).

Figura 3 – Dendrograma de similaridade genética, gerado pelo software PAST, entre 120 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital universitário em Recife-PE, estimado pela técnica de ERIC-PCR.



Discussão

O resultado do perfil de susceptibilidade obtido neste estudo revelou que o antimicrobiano mais ativo contra *P. aeruginosa* foi a polimixina B (92,5%), seguido pela ceftazidima (80,0%), amicacina (73,3%), imipenem (70,8%) e meropenem (69,2%). Estudos anteriores foram realizados na cidade do Recife e também encontraram dados semelhantes ao deste estudo. Figueiredo e colaboradores [19] investigaram um total de 304 isolados de *P. aeruginosa*, proveniente de dois hospitais públicos do Recife, dentre eles o Hospital das Clínicas (HC-PE), entre os anos de 2004 e 2006. Foi possível observar que, dentre os antimicrobianos testados, o aztreonam (56,45%), amicacina (55,95%), meropenem (55,7%) e imipenem (51,7%) apresentaram maior atividade contra *P. aeruginosa*. Pires e colaboradores [20] realizaram um estudo no HC-PE durante o ano de 2009 e observaram que os antimicrobianos mais ativos contra *P. aeruginosa* foram amicacina (84,62%), imipenem (81,82%), meropenem (79,31%) e aztreonam (74,39%). Outro estudo realizado por Jácome e colaboradores [8] também avaliou o perfil de susceptibilidade em isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de cinco hospitais do Recife coletados em vários períodos. Este estudo mostrou que os antimicrobianos mais ativos foram polimixina B (82%), ceftazidima (67,2%), imipenem (63,9%) e meropenem (62,3%). Todos os estudos demonstraram que os carbapenêmicos estão entre os antimicrobianos mais ativos contra *P. aeruginosa*, com percentuais variando entre 51,7% a 81,8%.

O percentual de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes observado neste estudo foi de 57,5%, corroborando com achados anteriores de multirresistência observados em hospitais do Recife [8, 19]. Entretanto, em estudos realizados em outros países têm sido observados percentuais de multirresistência bem abaixo dos valores encontrados pelo nosso estudo [21-23].

Observou-se também que, nos 17 isolados resistentes a ceftazidima e imipenem ou meropenem, não houve detecção dos genes *bla_{SPM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*. Os resultados deste trabalho mostram uma importante mudança na epidemiologia da resistência em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, também evidenciada por Cavalcanti e colaboradores. A diminuição da prevalência do clone epidêmico SPM-1 tem sido observada desde o ano de 2008, sugerindo que outros mecanismos de resistência devem estar presentes no hospital em estudo, a exemplo dos sistemas de efluxo multidroga [24].

Relatos de *P. aeruginosa* produtora de M β L tem sido descritos em todo o mundo, com predominância das enzimas IMP e VIM [25]. No Brasil a enzima mais prevalente é a SPM-1

[3], cujos casos permaneceram restritos ao território brasileiro até 2010, quando foi publicado o primeiro relato de SPM-1 na Europa, isolada em 2007 de um paciente suíço que havia sido atendido em um hospital universitário do Recife-PE, Brasil [26].

Dos 69 isolados de *P. aeruginosa* submetidos à pesquisa dos genes *mexA*, *mexE* e *mexX*, 97,1% foram positivos para os genes *mexA* e *mexE*, e 95,6% para o gene *mexX*. A quase totalidade de isolados positivos para a pesquisa dos sistemas de efluxo é bastante interessante e pode explicar a multidroga resistência nestes isolados. Dados que corroboram com os valores encontrados neste estudo foram observados por Pournaras e colaboradores [27], cuja pesquisa evidenciou a presença dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexXY-OprM, respectivamente, em 100% e 91,7%, dos isolados de *P. aeruginosa* negativos para a pesquisa do gene *bla_{VIM}*. Llanes e colaboradores [28] também pesquisaram a ocorrência dos sistemas de efluxo em isolados de *P. aeruginosa*. Os valores obtidos estão bem aquém dos encontrados neste estudo, sendo 36,5%, 11,8% e 45,9% a porcentagem de isolados positivos para a pesquisa dos sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexEF-OprN e MexXY-OprM, respectivamente.

A genotipagem pela ERIC-PCR mostrou 82 perfis genéticos distintos, com variado grau de similaridade, de 45% a 100%, demonstrando uma baixa relação clonal entre os isolados. A heterogeneidade genética encontrada entre linhagens da mesma espécie bacteriana sugere a ocorrência de mutações aleatórias não letais, deleção de genes, substituição de pares de base, aquisição de DNA de outras espécies bacterianas nos isolados estudados [8].

Concluimos, então, que os isolados de *P. aeruginosa* deste estudo apresentaram uma elevada taxa de multirresistência, estando de acordo com outros estudos realizados em Pernambuco. Essa multirresistência parece estar relacionada com a presença dos sistemas de efluxo multidroga MexAB-OprM, MexEF-OprN e MexXY-OprM, identificados por meio da PCR dos genes *mexA*, *mexE* e *mexX*. O acúmulo desses genes de resistência nos isolados estudados impõe limitações na terapia antimicrobiana utilizadas para combater infecções por *P. aeruginosa*. A heterogeneidade genética observada sugere a necessidade de aplicação mais rigorosa de medidas de controle de infecção nos hospitais de Recife, visando reduzir os custos e os danos provocados por este tipo de infecção, principalmente em pacientes graves.

Referências

1. ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; FERNANDES, J.F.; MORO, A.L.D.; GONÇALVES, A.L.S.; GOLDANI, L.Z. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired

pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase mediated multidrug resistance: a prospective observational study. **Critical Care**, v. 10, n. 4, p.100-110, 2006.

2. FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5 p. 470-473, 2008.

3. FIGUEIREDO, D.Q.; CASTRO, L.F.S.; SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; MONDINO, S.S.B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 177-184, 2009.

4. LEE, J-Y; KO, K.S. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2012.

5. WIRTH, F.W.; PICOLI, S.U.; CANTARELLI, V.V.; GONÇALVES, A.L.S.; BRUST, F.R.; SANTOS, L.M.O.; BARRETO, M.F. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, n. 3, p.170-172, 2009.

6. ASKOURA, M.; MOTTAWEA, W.; ALBUJAMEL, T.; TAHER, I. Efflux pumps inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Lybian J. Med.**, v. 6, p. 5870, 2011.

7. AMUDHAN, M.S.; SEKAR, U.; KAMALANATHAN, A.; BALARAMAN, S. *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6, n. 11, p. 757-762, 2012.

8. JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n.6, p. 707-712, 2012.

9. LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Disease**, v. 34, n. 1, p. 634-640, 2002.

10. JO, J.T.H.; BRINKMAN, F.S.L.; HANCOCK, R.E.W. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1101-1111, 2003.

11. POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Ann. Med.**, v. 39, n. 3, p. 162-176, 2007.

12. VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p. 6823-6831, 1991.

13. PFALLER, M.A.; ACAR, J.; JONES, R.N.; VERFHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H.S. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial

resistance surveillance program. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 156-167, 2001.

14. ALVES, M.S.; DIAS, R.C.S.; CASTRO, A.C.D.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella spp.* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3640-3646, 2006.

15. CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement (January 2012). **CLSI document M100-S22**, v.32, n.3, 2012.

16. DONG, F.; XU, X. W.; SONG, W. Q.; LÜ, P.; YU, S. J.; YANG, Y. H.; SHEN, X. Z. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 17, p.1611-1616, 2008.

17. GALES, A.C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 699-702, 2003.

18. OZER, B.; DURAN, N.; ONLEN, Y.; SAVAS, L. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, p. 9-13, 2011.

19. FIGUEIREDO, E.A.P.; RAMOS, H.; MACIEL, M.A.V.; VILAR, M.C.M.; LOUREIRO, N.G.; PEREIRA, R.G. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 19, p. 421-427, 2007.

20. PIRES, E.J.V.C.; SILVA JÚNIOR, V.V.; LOPES, A.C.S.; VERAS, D.L.; LEITE, L.E.; MACIEL, M.A.V. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 21, p. 384-390, 2009.

21. MCGOWAN JR, J.E. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. s29-s37. 2006

22. RAJA, N.S.; SINGH, N.N. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, p. 45-49, 2007.

23. TAM, V.H; CHANG, K.T; ABDELRAOUF, K; BRIOSO, C.G; AMEKA, M; MCCASKEY, L.A; WESTON, J.S; CAEIRO, J.P; GAREY, K.W. Prevalence, resistance mechanisms and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1160–1164, 2010.

24. CAVALCANTI, F.L.S.; ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JUNIOR, M.A. Changing epidemiology of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of SPM-producing isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 27, p. 420-423, 2012.

25. WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, suppl 3, p. S8–S14, 2010.

26. SALABI, A. E.; TOLEMAN, M. A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T; FREI, R.; WALSH, T. R. First Report of the Metallo- β -Lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 582, 2010.

27. POURNARAS, S.; MANIATI, M.; SPANAKIS, N.; IKONOMIDIS, A.; TASSIOS, P.T.; TSAKRIS, A.; LEGAKIS, N.J.; MANIATIS, A.N. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-b-lactamaseproducing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with *bla*_{VIM} endemicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 761–764, 2005.

28. LLANES, C.; KÖHLER, T.; PATRY, I.; DEHECQ, B.; VAN DELDEN, C.; PLÉSIAT, P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.12, p. 5676-5684, 2011.

6. ARTIGO 2

Pseudomonas aeruginosa produtora de KPC: ocorrência de um novo clone em Recife-PE.

Autores:

- (1) Lílian Rodrigues Alves – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Mestranda em Medicina Tropical.
- (2) Jailton da Costa Lobo - Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas. Bacharel em Biomedicina.
- (3) Marcelle Aquino Rabelo – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Doutoranda em Medicina Tropical.
- (4) Ana Catarina de Souza Lopes – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical. Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco.
- (5) Maria Amélia Vieira Maciel – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical. Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco.

Endereços para Correspondência:

Lílian Rodrigues Alves
Rua Coronel João Ribeiro, 844 – Bairro Novo, Olinda-PE / Brasil
CEP: 53030-040
Tel. +55(81)3429-0204
e-mail: lilianalves88@hotmail.com

Maria Amélia Vieira Maciel
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Medicina Tropical.
Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil
CEP: 50670-901
Tel. +55(81)2126-8526
e-mail: amelia57@gmail.com

Revista: A estruturação do artigo procura estar de acordo com os requisitos de publicação do The Brazilian Journal of Infectious Diseases, no formato brief communications.

Resumo: O presente trabalho relata a ocorrência de um novo clone de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de KPC (*Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase) em Recife-PE. Em 2011, foram coletados dois isolados de *P. aeruginosa* oriundos de secreção traqueal de um paciente internado em um hospital universitário em Recife. Estes isolados foram analisados e constataram-se dois fenótipos distintos em cada um deles. Um novo semeio foi realizado até o completo isolamento dos isolados. Após isolamento, obteve-se quatro isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos que foram submetidos à pesquisa do gene *bla*_{KPC} pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com resultados positivos. A heterogeneidade dos isolados de *P. aeruginosa* observada fenotipicamente através da produção de pigmentos e do perfil de susceptibilidade foi analisada por dois métodos de genotipagem: amplificação por PCR de sequências de consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR) e amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). Ambos os métodos de tipagem confirmaram que os quatro isolados de *P. aeruginosa* KPC-positivos apresentavam o mesmo perfil genético, confirmando que os quatro isolados pertenciam à mesma linhagem bacteriana, mesmo apresentando características fenotípicas distintas.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; infecção; KPC;.

Inicialmente descrita em membros da família Enterobacteriaceae, a KPC (*Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase) tem se disseminado em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em todo o mundo, a exemplo da Colômbia, Porto Rico, Trinidad e Tobago, Estados Unidos e Brasil [1-5].

Isolados KPC-positivos são capazes de hidrolisar diversos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, contudo são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam [6-8]. Esta enzima limita as opções terapêuticas e representa uma ameaça com efeitos negativos sobre os desfechos clínicos dos pacientes [9].

Dois isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos foram recuperados e cedidos pelo laboratório do hospital em estudo ao nosso grupo de pesquisa para posteriores análises. Os isolados denominados P5HC e P7HC (ambos isolados de secreção traqueal) foram semeados em ágar cefrimide e, posteriormente, foi realizado antibiograma pela técnica de disco-difusão ou método de Kirby-Bauer. Após realização do antibiograma foi

possível observar que cada isolado apresentava heterogeneidade fenotípica, ou seja, apresentavam dois tipos de pigmentos e crescimento dentro do halo de inibição. Realizou-se um novo isolamento até a completa separação dos isolados. Desta forma, os dois isolados tornaram-se quatro: P5HC-1, P5HC-2, P7HC-1 e P7HC-2. A Tabela 1, a seguir, descreve as principais características fenotípicas de cada isolado.

Tabela 1 – Características fenotípicas de isolados de *P. aeruginosa* provenientes de paciente internado em hospital universitário em Recife-PE.

Isolado	Pigmento	Antibiograma*		MDR
		Sensível	Resistente	
P5HC-1	Fluoresceína	CAZ, MPM, CPM, CIP, NOR, OFX, ATM, GEN, POL, TAC, AMI	IMP, CTX, CRO	Não
P5HC-2	Piocianina; Pioverdina	CIP, NOR, OFX, GEN, POL	CAZ, IMP, MPM, CPM, CTX, CRO, ATM, TAC, AMI	Sim
P7HC-1	Fluoresceína	CAZ, MPM, CPM, CIP, NOR, OFX, ATM, GEN, POL, TAC, AMI	IMP, CTX, CRO	Não
P7HC-2	Piocianina; Pioverdina	CIP, NOR, OFX, GEN, POL	CAZ, IMP, MPM, CPM, CTX, CRO, ATM, TAC, AMI	Sim

* De acordo com critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012 [10].

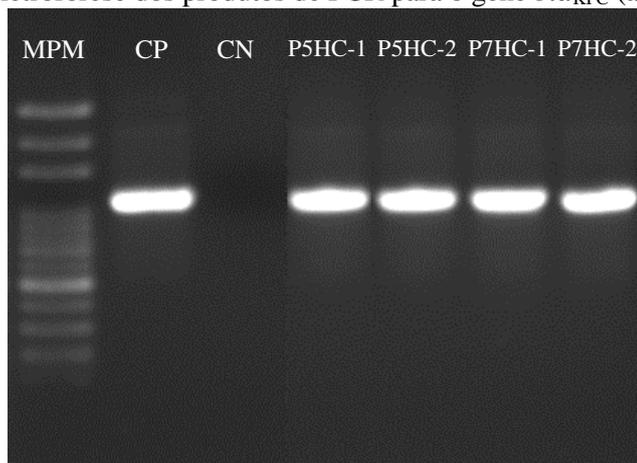
Nota: CAZ = ceftazidima; IMP = imipenem; MPM = meropenem; CPM = cefepime;

CTX = cefotaxima; CRO = ceftriaxona; CIP = ciprofloxacina; NOR = norfloxacina;

OFX = ofloxacina; ATM = aztreonam; GEN = gentamicina; POL = polimixina B;

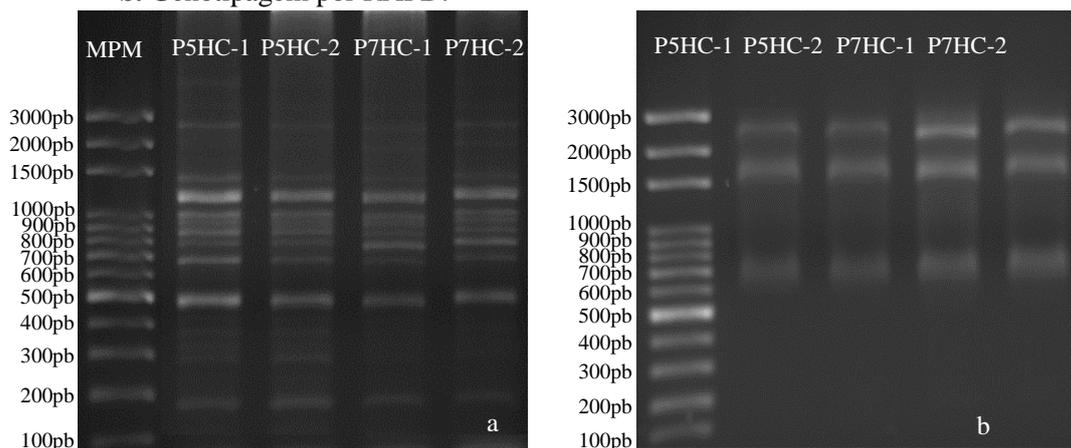
TAC = ticarcilina/ácido clavulânico; AMI = amicacina; MDR = multidroga resistente.

Pela resistência aos carbapenêmicos, os quatro isolados foram submetidos à pesquisa do gene *bla_{KPC}* pela técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de acordo com protocolo previamente descrito [11]. A pesquisa genética resultou na detecção do gene *bla_{KPC}* nos quatro isolados testados (Figura 1).

Figura 1 – Gel de eletroforese dos produtos de PCR para o gene *bla*_{KPC} (amplicon de 1000pb)

Nota: MPM = marcador de peso molecular (Ladder 100pb – Amresco); CP = controle positivo cepa P22A [5]; CN = controle negativo; P5HC-1, P5HC-2, P7HC-1 e P7HC-2 = isolados de *P. aeruginosa* descritos neste artigo.

Em seguida, foi realizada a genotipagem por duas técnicas distintas para avaliar o grau de similaridade genética entre os quatro isolados de *P. aeruginosa* KPC-positivos. A ERIC-PCR e RAPD foram realizadas de acordo com protocolos preestabelecidos na literatura [12; 13]. Os padrões de similaridade genética obtido pela ERIC-PCR e RAPD podem ser visualizados nas Figuras 2a e 2b.

Figura 2 – Gel de eletroforese dos produtos de PCR: **a.** Genotipagem por ERIC-PCR; **b.** Genotipagem por RAPD.

Nota: MPM = marcador de peso molecular (Ladder 100pb – Amresco); CP = controle positivo; CN = controle negativo; P5HC-1, P5HC-2, P7HC-1 e P7HC-2 = isolados de *P. aeruginosa* descritos neste artigo.

A identificação de *P. aeruginosa* produtora de KPC apresenta relevância no Brasil, devido à elevada prevalência deste patógeno envolvido em infecções relacionadas à assistência a saúde, muitas vezes associados às infecções respiratórias em pacientes graves [14; 15]. Esta bactéria apresenta um elevado nível de resistência aos antimicrobianos que, somada a sua capacidade de desenvolver novos mecanismos de resistência por mutação genética ou aquisição de elementos genéticos móveis, dá origem a isolados multidroga resistentes (MDR), cujo tratamento é mais longo e aumentam as chances de morte dos pacientes devido à necessidade de tratamentos utilizando elevadas doses de antimicrobianos, muitas vezes em associações, por longos períodos [16; 17].

Dados que corroboram com os encontrados neste estudo foram observados em 2010, onde dois isolados de *P. aeruginosa*, também recuperados de secreção traqueal, foram recuperados de dois pacientes distintos em um hospital-escola no Recife. Ambos possuíam o gene *bla*_{KPC} e apresentavam sensibilidade apenas a gentamicina e polimixina B. Após genotipagem por ERIC-PCR foi evidenciado que os dois isolados apresentavam o mesmo perfil de similaridade genética, portanto eram geneticamente relacionados [5].

Um dado interessante a ser observado é a presença do gene *bla*_{KPC} em isolados não multidroga resistentes (NMDR), que apresentaram resistência apenas ao imipenem, cefotaxima e ceftriaxona, evidenciando uma possível transferência genética entre os isolados de *P. aeruginosa* multidroga resistente (MDR) e NMDR. Esta transferência já foi evidenciada com outras espécies bacterianas em um relato de caso, cuja paciente realizou um pequeno transplante de intestino e adquiriu uma *K. pneumoniae* produtora de KPC. Posteriormente, verificou-se que o gene *bla*_{KPC} foi transferido para *Escherichia coli* e depois para *Serratia marcescens*, demonstrando a disseminação deste gene entre espécies bacterianas distintas [18].

Mesmo apresentando perfis fenotípicos distintos, os quatro isolados são geneticamente relacionados como é possível observar nas figuras 2a e 2b. As técnicas empregadas são amplamente utilizadas e já demonstraram ser eficientes em genotipagem de isolados de *P. aeruginosa* [5; 13; 19]. Esta heterogeneidade pode ser explicada pela produção de biofilmes da *P. aeruginosa* em infecções que acometem os tecidos pulmonares, pois a produção de biofilmes gera subpopulações fenotipicamente distintas da mesma bactéria alterando, principalmente, a sua fisiologia celular. Esta alteração fisiológica afeta a síntese de metabólitos residuais e secundários, e compostos de sinalização que formam gradientes químicos que se cruzam e sobrepõem, criando vários

micro-ambientes que permitem que as células bacterianas respondam de acordo com as condições locais do ambiente [20].

Diante destes dados conclui-se que ambos os métodos de tipagem confirmaram que os quatro isolados de *P. aeruginosa* KPC-positivos apresentavam o mesmo perfil genético, confirmando que os mesmos pertenciam à mesma linhagem bacteriana, apesar de apresentarem características fenotípicas distintas.

Referências

1. VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J.N.; LOPEZ, J.A.; QUINN, J.P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1553–1555, 2007.
2. WOLTER, D.J.; KURPIEL, P.M.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M.F.; GOERING, R.V.; HANSON, N.D. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 557-562, 2009.
3. AKPAKA, P.E.; SWANSTON, W.H.; IHEMERE, H.N.; CORREA, A.; TORRES, J.A.; TAFUR, J.D.; MONTEALEGRE, M.C.; QUINN, J.P.; VILLEGAS, M.V. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.8 p. 2670–2671, 2009.
4. POIREL, L.; NORDMANN, P.; LAGRUTTA, E.; CLEARY, T.; MUNOZ-PRICE, L. S. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 3072, 2010.
5. JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.
6. ZHANG, R.; YANG, L.; CAI, J. C.; ZHOU, H. W.; CHEN, G. X. High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p.332–337, 2008.
7. PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 265–268, 2009.
8. GOREN, M.G.; CARMELI, Y. SCHWABER, M.J.; CHMELNITSKY, I.; SCHECHNER, V.; NAVON-VENEZIA, S. Carbapenem-Resistant Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in Patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1014-1017, 2010.

9. SCHWABER, M.J.; CARMELI, Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. **JAMA**, v. 300, p. 2911–2913, 2008.
10. CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement (January 2012). **CLSI document M100-S22**, v.32, n.3, 2012.
11. YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.
12. DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J.; ZHANG, X.; QI, C.; GAO, J.; WANG, Y.; CAI, Y.; MIAO, Z.; YAO, M.; SCHLENKER, G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511–517, 2009.
13. FONSECA, A.P.; CORREIA, P.; EXTREMINA, C.I.; SOUSA, J.C.; TENREIRO, R.; BARROS, H. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Portuguese Central Hospital. **Folia Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 540-546, 2008.
14. SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCOLLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5; p. 200-214, 2001.
15. PIRES, E.J.V.C.; SILVA JÚNIOR, V.V.; LOPES, A.C.S.; VERAS, D.L.; LEITE, L.E.; MACIEL, M.A.V. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 21, p. 384-390, 2009.
16. CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; LIVERMORE, D.M. Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 63, p. 426-433, 2009.
17. LAYEUX, B.; TACCONE, F.S.; FAGNOUL, D.; VINCENT, J.L.; JACOBS, F. Amikacin monotherapy for sepsis caused by panresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54:4939-4941.
18. SIDJABAT, H.E.; SILVEIRA, F.P.; POTOSKI, B.A.; ABU-ELMAGD, K.M.; ADAMS-HADUCH, J.M.; PATERSON, D.L.; DOI1, Y. Interspecies spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene in a single patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1736-1738, 2009.
19. JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n.6,

p. 707-712, 2012

20. WILLIAMSON, K.S; RICHARDS, L.A.; PEREZ-OSORIO, A.C.; PITTS, B.; MCINNERNEY, K.; STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2062-2073, 2012.

7. CONCLUSÕES

- A sensibilidade a alguns antimicrobianos como a polimixina, ceftazidima e amicacina indica que estas drogas não estão sendo utilizadas com frequência no hospital estudado. Com isso não houve pressão seletiva destes agentes antimicrobianos nos isolados bacterianos e, conseqüentemente, não ocorreu indução da resistência.
- O elevado percentual de isolados de *P. aeruginosa* multidroga resistentes (MDR) reflete o uso indiscriminado de antimicrobianos, promovendo a expressão e aquisição de mecanismos de resistência contra essas drogas.
- Os sistemas de efluxo multidroga MexAB-OprM, MexEF-OprN e MexXY-OprM foram encontrados em quase 100% dos isolados de *P. aeruginosa* estudados, podendo, assim, explicar a multidroga resistência observada.
- A não detecção por PCR dos genes das metalo- β -lactamases (*bla*_{SPM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}) indica uma mudança no perfil de resistência do hospital estudado, observada desde 2010.
- Entre os isolados resistentes ao carbapenêmicos foi detectada a presença de quatro isolados portadores do gene *bla*_{KPC}. Todos os isolados foram provenientes do mesmo paciente e apresentavam características fenotípicas distintas, embora estejam geneticamente relacionados de acordo com as técnicas de genotipagem empregadas neste estudo (ERIC-PCR e RAPD).
- A genotipagem dos isolados revelou 82 perfis genéticos distintos, apresentando grau de similaridade variando de 45% a 100%.

REFERÊNCIAS

- AIRES, J.R.; KOHLER, T.; NIKAIDO, H.; PLÉSIAT, P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 11, p. 2624-2628, 1999.
- AKPAKA, P.E.; SWANSTON, W.H.; IHEMERE, H.N.; CORREA, A.; TORRES, J.A.; TAFUR, J.D.; MONTEALEGRE, M.C.; QUINN, J.P.; VILLEGAS, M.V. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.8 p. 2670–2671, 2009.
- ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; CAVALCANTI, F.L.S.; MARTINS, W.M.B.S.; MORAIS JUNIOR, M.A.; MORAIS, M.M.C. First description of KPC-2- producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 2205-2206, 2012.
- ALVES, M.S.; DIAS, R.C.S.; CASTRO, A.C.D.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella spp.* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3640-3646, 2006.
- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 289, n.36, p.321-331, 1980.
- AMUDHAN, M.S.; SEKAR, U.; KAMALANATHAN, A.; BALARAMAN, S. *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6, n. 11, p. 757-762, 2012.
- ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1563-1589, 2000.
- ASKOURA, M.; MOTTAWEA, W.; ALBUJAMEL, T.; TAHER, I. Efflux pumps inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Lybian J. Med.**, v. 6, p. 5870, 2011.
- BAUER, A.W.; KIRBY, E.M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45:493-496, 1966.
- BEBRONE, C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic, organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical Pharmacology**. vol.74(12), p.1686-1701, 2007.
- BEGUM, S.; SALAM, M. A.; ALAM, K. F.; BEGUM, N.; HASSAN, P.; HAQ, J. A. Detection of extended spectrum β -lactamase in *Pseudomonas spp.* Isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 7, p. 1-4, 2013.
- BRATU, S.; LANDMAN, D.; ALAM, M.; TOLENTINO, E.; QUALE, J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp.* from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 776-778, 2005.
- BUSH, K. Characterization of β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.33,

n.3, p.259-263, 1989.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, n.6, p.1211-1233, 1995.

BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CABRAL, A.B.; MELO, R.C.A.; MACIEL, M.A.V.; LOPES, A.C.S. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumonia* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. A.; JONES, R. N.; SCHMIDT, F. J.; WALSH, T. R. Molecular characterization of a betalactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n.12, p. 4654-61, 2004.

CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; LIVERMORE, D.M. Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 63, p. 426-433, 2009.

CAVALCANTI, F.L.S.; ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JUNIOR, M.A. Changing epidemiology of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of SPM-producing isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 27, p. 420-423, 2012.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement (January 2012). **CLSI document M100-S22**, v.32, n.3, 2012.

COSTA, M.M; SILVA, M.S; SPRICIGO, D.A; WITT, N.M; MARCHIORO, S.B; KOLLING, L.; VARGAS, A.P.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do Sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 1, p.5-8, 2006.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55(3), p.947-953, 2011.

DONG, F.; XU, X. W.; SONG, W. Q.; LÜ, P.; YU, S. J.; YANG, Y. H.; SHEN, X. Z. Characterization of multidrug-resistant and metallo-betalactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 17, p.1611-1616, 2008.

DORTET, L.; RADU, I.; GAUTIER, V.; BLOT, F.; CHACHATY, E.; ARLET, G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 455–457, 2008.

DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J.; ZHANG, X.; QI, C.; GAO, J.; WANG, Y.; CAI, Y.; MIAO, Z.; YAO, M.; SCHLENKER, G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511–517, 2009.

EL SALABI, A.; BORRA, P.S.; TOLEMAN, M.A.; SAMUELSEN, O.; WALSH, T.R. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2241-2245, 2012.

FALAGAS, M.E; KOLETZI, P.K.; KOPTERIDES, P.; MICHALOPOULOS, A. Risk factors for isolation of strains susceptible only to polymyxin among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2541-2543, 2006.

FIGUEIREDO, E.A.P.; RAMOS, H.; MACIEL, M.A.V.; VILAR, M.C.M.; LOUREIRO, N.G.; PEREIRA, R.G. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 19, p. 421-427, 2007.

FIGUEIREDO, D.Q.; CASTRO, L.F.S.; SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; MONDINO, S.S.B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 177-184, 2009.

FONSECA, A.P.; CORREIA, P.; EXTREMINA, C.I.; SOUSA, J.C.; TENREIRO, R.; BARROS, H. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Portuguese Central Hospital. **Folia Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 540-546, 2008.

FREITAS, A.L.; BARTH, A.L. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 1, p. 77-82, 2004.

FRITSCHÉ, T.R.; SADER, H.S.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Emerging Metallo- β -Lactamase-Mediated Resistances: A Summary Report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Clinical Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p.276-278, 2005.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5 p. 470-473, 2008.

GALES, A.C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 699-702, 2003.

GALLEN, M.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; ROSSOLINI, G.M.; SPENCER, J.; DIDEBERG, O.; FRÈRE, J.M.; THR METALLO-b-LACTAMASE WORKING GROUP.

Standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.3, p.660-663, 2001.

GANTA, S.R.; PERUMAL, S.; PAGADALA, S.R.; SAMUELSEN, O.; SPENCER, J.; PRATT, R.F.; BUYNAK, J.D. Approaches to the simultaneous inactivation of metallo- and serine-betalactamases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, n. 6, p. 1618–1622, 2009.

GARAU, G.; GARCÍA-SÁEZ, I.; BEBRONE, C.; ANNE, C.; MERCURI, P.; GALLEN, M.; FRÈRE, J.M.; DIDEBERG, O. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.7, p.2347-2349, 2004.

GenBank® - *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/451824560>. Acessado em : 06 de maio de 2013.

GEORGHIOU, P.R.; HAMMIL, R.J.; WRIGHT, C.E.; VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; WATSON, D.A.; LUPSKI, J.R. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital-associated strains by molecular techniques. **Clinical Infection Disease**, v. 20, p. 84-94, 1995.

GOOTZ, T. D.; LESCOE, M. K.; DIB-HAJJ, F.; DOUGHERTY, B. A.; HE, W.; DELLA-LATTA, P.; HUARD R. C. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 1998–2004, 2009.

GOREN, M. G.; CARMELI, Y. SCHWABER, M. J.; CHMELNITSKY, I.; SCHECHNER, V.; NAVON-VENEZIA, S. Carbapenem-Resistant Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in Patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1014-1017, 2010.

GRÄF, T.; FUENTEFRÍA, D.B.; CORÇÃO, G. Ocorrência de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 306-308, 2008.

GUNAWARDANA, G.A.; TOWNSEND, K.M.; FROST, A.J. Molecular characterization of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 97-109, 2000.

HIRSCH, E. B; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1119–1125, 2010.

HOCQUET, D.; VOGNE, C.; EI, G.F.; VEJUX, A.; GOTOH, N.; LEE, A.; LOMOVSKAYA, O.; PLÉSIAT, P. MexXY-OprM efflux pump is necessary for an adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1371-1375, 2003.

HOGARDT, M.; HOBOTH, C.; SCHMOLDT, S.; HENKE, C.; BADER, L.; HEESEMANN, J. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. **Journal of**

Infectious Diseases, v. 195, p. 70–80, 2007.

HUSSAIN, M.; CARLINO, A.; MADONNA, M.J.; LAMPEN, J.O. Cloning and sequencing of the metallothioprotein β -lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.164, n.1, p.223-229, 1985.

JACOBY, G.A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n.6, p. 707-712, 2012a.

JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012b.

JELSBAK, L., JOHANSEN, H.K., FROST, A.L., THOGERSEN, R., THOMSEN, L.E., CIOFU, O., YANG, L., HAAGENSEN, J.A.J., HOIBY, N.; MOLIN, S. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2214-2224, 2007.

JO, J.T.H.; BRINKMAN, F.S.L.; HANCOCK, R.E.W. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1101-1111, 2003.

JONES, R. N.; BIEDENBACH, D. J.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Emerging epidemic of metallo- β -lactamase-mediated resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.51, p.77-84, 2005.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

KUWABARA, S.; ABRAHAM, E.P. Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. **Biochemical Journal**, v.103, p.27-30, 1967.

LAHEY CLINIC. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes, **LAHEY CLINIC**, 2011. Disponível em: < [http:// www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)>. Acessado em: 15 jan. 2013.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. M. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-90, 1999.

LAYEUX, B.; TACCONE, F.S.; FAGNOUL, D.; VINCENT, J.L.; JACOBS, F. Amikacin monotherapy for sepsis caused by panresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54:4939-4941.

LEAVITT, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella*

pneumoniae strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 3026–3029, 2007.

LEE, K.; YUM, J. H.; YONG, D.; LEE, H. M., KIM, H. D.; DOCQUIER, J. D.; ROSSOLINI, G. M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485-91, 2005.

LEE, J-Y; KO, K.S. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2012.

LI, X.Z.; POOLE, K.; NIKAIDO, H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 27-33, 2003.

LIPMAN, L.J.A; NIJS, A; LAM, T.J.G.M.; GASTRA, W. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. **Vet. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p.13-19, 1995.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Disease**, v. 34, n. 1, p. 634-640, 2002.

LLANES, C.; KÖHLER, T.; PATRY, I.; DEHECQ, B.; VAN DELDEN, C.; PLÉSIAT, P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.12, p. 5676-5684, 2011.

LOUREIRO, M.M.; MORAES, B.A.; MENDONCA, V.L.; QUADRA, M.R.; PINHEIRO, G.S.; ASENSI, M.D. *Pseudomonas aeruginosa*: Study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 387-394, 2002.

LUBELSKI, J.; KONINGS, W.N.; DRIESSEN, A.J. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 71, n. 3, p. 463-476, 2007.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Diversidade Procariótica: Bactéria. In *Microbiologia de Brock*. **Prentice Hall**, São Paulo, p. 332-421, 2004.

MAGALHÃES, V.; LINS, A.K.; MAGALHÃES, M. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 123-125, 2005.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol.45, p.3375-3380, 2001.

MARTÍNEZ, L.; GÓMEZ, L.; GARAU, J. Infecciones por *Pseudomonas*. En: Auxina V, Moreno S, editores. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*.

Madrid: Médica Panamericana. p. 347-56, 2006.

MASUDA, N.; SAKAGAWA, E.; OHYA, S.; GOTOH, N.; TSUJIMOTO, H.; NISHINO, T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3322-3327, 2000.

MAURER, J.J.; LEE, M.D.; LOBSINGER, C.; BROWN, T.; MAIER, M.; THAYER, S.G. Molecular typing of avian *Escherichia coli* strains isolated by random amplification of polymorphic DNA. **Avian Dis.**, n. 42, p. 431-451, 1998.

MCGOWAN JR, J.E. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. s29-s37. 2006

MCKEEGAN, K.S.; BORGES-WALMSLEY, M.I.; WALMSLEY, A.R. The structure and function of drug pumps: an update. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 1, p. 21-29, 2003.

MENA, A.; SMITH, E.E.; BURNS, J.L.; SPEERT, D.P.; MOSKOWITZ, S.M.; PEREZ, J.L.; OLIVER, A. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p.7910–7917, 2008.

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MESAROS, N.; GLUPCZYNSKI, Y.; AVRAN, L.; CACERES, N.E.; TULKENS, P.M.; BAMBEKE, F.V. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of *mex* efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 378-386, 2007.

MINE, T.; MORITA, Y.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 415-417, 1999.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

MORITA, Y.; KATAOKA, A.; SHIOTA, S.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na(+)-driven multidrug efflux pump. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 23, p. 6694-6697, 2000.

NARITA, S.; EDA, S.; YOSHIHARA, E.; NAKAE, T. Linkage of the efflux-pump expression level with substrate extrusion rate in the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 308, n. 4, p. 922-926, 2003.

NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; SCHWABER, M. J.; RASHEED, J. K.; SRINIVASAN, A.; PATEL, J. B.; CARMELI, Y.; ISRAELI KPC KPN STUDY GROUP. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel

genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 818–820, 2009.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, p. 321-333, 2002.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, p. 228–236, 2009.

NOUÉR, S.A.; NUCCI, M.; DE-OLIVEIRA, M.P.; PELLEGRINO, F.L.P.C.; MOREIRA, B.M. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3663–3667, 2005.

OKAMOTO, K.; GOTOH, N.; NISHINO, T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p.1964-1971, 2001.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p.71-78, 1994.

OZER, B.; DURAN, N.; ONLEN, Y.; SAVAS, L. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, p. 9-13, 2011.

PALLERONI, N.J.R.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, p. 333-339, 1973.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p.265–268, 2009.

PFALLER, M.A.; ACAR, J.; JONES, R.N.; VERFHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H.S. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 156-167, 2001.

PICOLI, S.U. Metallo- β -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 4, p. 273-277, 2008.

PIRES, E.J.V.C.; SILVA JÚNIOR, V.V.; LOPES, A.C.S.; VERAS, D.L.; LEITE, L.E.; MACIEL, M.A.V. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 21, p. 384-390, 2009.

PITT, T.L.; SIMPSON, A.J. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. 2nd Edition, **John Wiley & Sons**, London, p. 427-443, 2006.

POIREL, L.; MAGALHÃES, M.; LOPES, M.; NORDMANN, P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1406-1409, 2004.

POIREL, L.; PITOUT, J. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v. 2, p. 501–512, 2007.

POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; AL, NAIEMI, N. A.; DEBETS-OSSENKOPP, Y. J.; NORDMANN, P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in The Netherlands. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, p. 2420–2424, 2010.

POIREL, L.; NORDMANN, P.; LAGRUTTA, E.; CLEARY, T.; MUNOZ-PRICE, L. S. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 3072, 2010a.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, G.L.; BENNET, J.E.; DOLIN, R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. **Philadelphia: Churchill-Livingstone**, p. 2310-2335, 2000.

POOLE, K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 3, p. 77-98, 2002.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Ann. Med.**, v. 39, n. 3, p. 162-176, 2007.

POURNARAS, S.; MANIATI, M.; SPANAKIS, N.; IKONOMIDIS, A.; TASSIOS, P.T.; TSAKRIS, A.; LEGAKIS, N.J.; MANIATIS, A.N. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-beta-lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with *bla*_{VIM} endemicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 761–764, 2005.

PUTMAN, M.; VAN VEEN, H.W.; KONINGS, W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 672-693, 2000.

QI, Y.; WEI, Z.; LI, L.; JI, S.; DU, X.; SHEN, P, YU, Y. Detection of a common plasmid carrying *bla*_{KPC-2} in Enterobacteriaceae isolates from distinct cities in China. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 4, p. 297-301, 2010.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 440–458, 2007.

RAJA, N.S.; SINGH, N.N. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, p. 45-49, 2007.

RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p.223–232, 1997.

ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTÉ, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEON, C. F.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 1354–1357, 2010.

ROCHE, C.; COTTER, M. O.; CONNELL, N.; CROWLEY, B. First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. **Euro Surveillance**, v. 14, n. 13, p. 1-2, 2009.

ROSSOLINI, G.M. Acquired metallo- β -lactamases: an increasing clinical threat. **Clinical Infectious Disease**, v.41, n. p.1557-1558, 2005.

ROUQUETTE-LOUGHLIN, C.; DUNHAM, S.A.; KUHN, M.; BALTHAZAR, J.T.; SHAFER, W.M. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 3, p. 1101-1106, 2003.

SABATH, L.D.; ABRAHAM, E.P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase form *Bacillus cereus* 569. **Biochemical Journal**, v. 98, p. 11c-13c, 1966.

SADER, H.S; PIGNATARI, A.C.; LEME, I.L.; BURATTINI, M.N; TANCRESI, R.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. 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.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCOLLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5; p. 200-214, 2001.

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBER, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs, SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 1, p. 73–76, 2005.

SAIER JR, M.H. Active transport in communication, protection and nutrition. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, n 3-4, p. 161-164, 2007.

SALABI, A. E.; TOLEMAN, M. A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T; FREI, R.; WALSH, T. R. First Report of the Metallo- β -Lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 582, 2010.

SCHWABER, M.J.; CARMELI, Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. **JAMA**, v. 300, p. 2911–2913, 2008.

SEKIGUCHI, J. I.; MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M. MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KANAMORI, M. KIRIKAE, T. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194–4197, 2008.

SIDJABAT, H.E.; SILVEIRA, F.P.; POTOSKI, B.A.; ABU-ELMAGD, K.M.; ADAMS-HADUCH, J.M.; PATERSON, D.L.; DOI, Y. Interspecies spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene in a single patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1736-1738, 2009.

SILBERT, S.; PFALLER M.A.; HOLLIS, R.J.; BARTH, A.L.; SADER, H.S. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 847-851, 2004.

SOARES, M.C.S.T. Estudo da resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói – Rio de Janeiro. 77f. Rio de Janeiro. **Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)**. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro: UFF. 2001.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1133-1148, 2009.

TAM, V.H; CHANG, K.T; ABDELRAOUF, K; BRIOSO, C.G; AMEKA, M; MCCASKEY, L.A; WESTON, J.S; CAEIRO, J.P; GAREY, K.W. Prevalence, resistance mechanisms and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1160–1164, 2010.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.

TODAR, K. The Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**. 2009. Disponível em <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Pseudomonas.html>. Acessado em: 28 de janeiro de 2013.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-9, 2002.

TYLER, S.D.; STRATHDEE, C.A.; ROZEE, K.R.; JOHNSON, W.M. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 4, p. 448-453, 1995.

URBAN, C.; BRADFORD, P.A.; TUCKMAN, M.; SEGAL-MAURER, S.; WEHBEH, W.; GRENNER, L.; COLON-URBAN, R.; MARIANO, N.; RAHAL, J.J. Carbapenem resistant *Escherichia coli* harboring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase beta-lactamases

associated with long-term care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p.127–130, 2008.

VARDY, E.; STEINER-MORDOCH, S.; SCHULDINER, S. Characterization of bacterial drug antiporters homologous to mammalian neurotransmitter transporter. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 21, p. 7518-7525, 2005.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p. 6823-6831, 1991.

VIEIRA, V.V.; FONSECA, É.L.; VICENTE, A.C.P. Metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2005.

VILA, J.; MARTI, S.; SANCHEZ-CESPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol.59(6), p.1210-1215, 2007.

VILLA, J.; MARCO, F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 20, n. 6, p. 304-312, 2002.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J. N.; LOPEZ, J. A.; QUINN, J. P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1553–1555, 2007.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, suppl 3, p. S8–S14, 2010.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.35, n.1, p.147-151, 1991.

WILLIAMSON, K.S.; RICHARDS, L.A.; PEREZ-OSORIO, A.C.; PITTS, B.; MCINNERNEY, K.; STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2062-2073, 2012.

WILSON, L.A.; SHARP, P.M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 6, p. 1156-1168, 2006.

WINN JR, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G. Koneman Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido. 6ª ed. **Guanabara Koogan**, Brasil; 2008.

WIRTH, F.W.; PICOLI, S.U.; CANTARELLI, V.V.; GONÇALVES, A.L.S.; BRUST, F.R.; SANTOS, L.M.O.; BARRETO, M.F. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, n. 3, p.170-172, 2009.

WOLTER, D. J.; KURPIEL, P. M.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M. F.; GOERING, R. V.; HANSON, N. D. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 557-562, 2009.

WOODFORD, N.; TIerno JR, P. M.; YOUNG, K.; TYSALL, L.; PALEPOU, M. F.; WARD, E.; PAINTER, R. E.; SUBER, D. F.; SHUNGU, D.; SILVER, L. L.; INGLIMA, K.; KORNBLUM, J.; LIVERMORE D. M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A betalactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 4793–4799, 2004.

WU, Q.; LIU, Q.; HAN, L.; SUN, J.; NI, Y. Plasmid-mediated carbapenemhydrolyzing enzyme KPC-2 and ArmA 16S rRNA methylase conferring highlevel aminoglycoside resistance in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 326–328, 2010.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

YONEYAMA, H.; MASEDA, H.; KAMIGUCHI, H.; NAKAE, T. Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA, B-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 7, p. 4628-4634, 2000.

YONG, D.; BELL, J. M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. A novel sub group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 2007.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumonia* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 5046–5054, 2009.

ZAVASCKI, A.P.; GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; GONÇALVES, A.L.; BARTH, A.L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 1148–1151, 2005.

ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; FERNANDES, J.F.; MORO, A.L.D.; GONÇALVES, A.L.S.; GOLDANI, L.Z. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase mediated multidrug resistance: a

prospective observational study. **Critical Care**, v. 10, n. 4, p.100-110, 2006.

ZHANG, R.; ZHOU, H. W.; CAI, J. C.; CHEN, G. X. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 574–576, 2007.

ZHANG, R.; YANG, L.; CAI, J. C.; ZHOU, H. W.; CHEN, G. X. High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p.332–337, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A

ARTICLE 1

Detection of efflux systems (MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexXY-OprM), metallo- β -lactamases (SPM, IMP, VIM) and clonal profile in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a university hospital in Recife, Pernambuco.

Authors:

- (1) Lilian Rodrigues Alves - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine - Postgraduate Program in Tropical Medicine. MSc in Tropical Medicine.
- (2) Jailton da Costa Lobo - Universidade Federal de Pernambuco - Centre for Biological Sciences. Bachelor of Biomedicine.
- (3) Marcelle Aquino Rabelo - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine - Postgraduate Program in Tropical Medicine. Doctorate in Tropical Medicine.
- (4) Armando Monteiro Neto Bezerra - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine - Master of Tropical Medicine.
- (5) Ana Catarina Lopes de Souza - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine. Associate Professor at Universidade Federal de Pernambuco.
- (6) Maria Amelia Vieira Maciel - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine. Associate Professor at Universidade Federal de Pernambuco.

Address for correspondence:

Lilian Rodrigues Alves

Rua Coronel João Ribeiro, 844 - Bairro Novo, Olinda, Pernambuco / Brazil

CEP: 53030-040

Tel +55 (81) 3429-0204

e-mail: lilianalves88@hotmail.com

Maria Amelia Vieira Maciel

Universidade Federal de Pernambuco

Department of Tropical Medicine.

Av Moraes Rego 1235 - University City, Recife, Pernambuco / Brazil

50670-901

Phone 21268526

e-mail: amelia57@gmail.com

Magazine: The structuring of the article seeks to comply with the publication requirements of the Current Microbiology, original article format.

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen associated to healthcare-associated infections, whose main feature is the ability to develop resistance to several antibiotics by producing enzymes metallo- β -lactamase (M β L) and overexpression systems efflux. These two mechanisms contribute to resistance to multiple antibiotics. **Objective:** The aim of this study was to characterize the genetic profile of susceptibility and resistance, and genetic similarity in clinical isolates of *P. aeruginosa* from the University Hospital of Pernambuco (PE-HC) in the period April to August 2011 and from May to September 2012. **Methods:** The isolates of *P. aeruginosa* collected were subjected to disk diffusion technique to determine the susceptibility profile. The search for genes *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} in isolates resistant to ceftazidime (CAZ) and imipenem (IMP) or meropenem (MPM) and the research of genes *mexA*, *mexE* and *mexX* in isolated multidrug-resistant (MDR) were performed by the technique Polymerase Chain Reaction (PCR). All isolates were subjected to molecular typing by PCR of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). **Results:** One hundred twenty isolates of *P. aeruginosa* showed resistance rates ranging from 7.5% to 52.5% for polymyxin and cefotaxime. In none of the 17 isolates resistant to CAZ and IMP or MPM genes were found to M β L. Sixty-nine isolates (57.5%) were considered by MDR exhibit resistance to more than three classes of antibiotics. *MexA* and *mexE* genes were detected in 67/69 MDR isolates and *mexX* in 66/69. The ERIC-PCR showed 82 distinct genetic profiles. **Conclusions:** The efflux systems appear to contribute to resistance of *P. aeruginosa* and the absence of M β Ls indicates a possible change in the epidemiological bacterial resistance in the hospital. Genetic heterogeneity found suggests the occurrence of non-lethal mutations in bacterial isolates.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; infection; resistance; molecular typing.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a major causative agents of healthcare-associated infections (IRAS) for presenting intrinsic resistance to many antibiotics, and can acquire new mechanisms of resistance during treatment of the patient [1-3].

The increasing prevalence of isolates of *P. aeruginosa* multidrug resistant (MDR) is seriously compromising the choice of appropriate treatment, generating high rates of morbidity and mortality [4]. The primary mechanisms involved in multidrug resistance in clinical isolates of *P. aeruginosa* are metallo- β -lactamases enzymes (M β Ls) and multidrug efflux systems [5,6].

The first isolate of *P. aeruginosa* producing M β L described in Japan in 1991 and since then the metallo-enzymes have been spreading worldwide. These enzymes hydrolyze all β -lactams (including carbapenems), with the exception of monobactams. The M β Ls more common around the world are the type VIM, IMP, GIM, SPM, SIM, and more recently, NDM [7]. In Brazil we found three types of M β L in isolates of *P. aeruginosa*: SPM, IMP and VIM, being the predominant variant Brazilian (SPM) [8].

The main efflux system in *P. aeruginosa* belongs to the family RND [6]. The operation of these pumps is based on the opening of a channel which traverses the external and internal membrane, allowing the antimicrobial agent is removed to the extracellular medium. This channel is composed of three proteins, where the first is the pump itself, energy-dependent, localized in the cytoplasmic membrane and transport function, the second function to facilitate the passage of antimicrobials by the outer membrane and the third location periplasmic, which connects the other two. Genes encoding efflux systems are arranged in operons, where the first gene encodes a periplasmic protein, the second transport protein and the third outer membrane protein [9,10]. There are 12 kinds of systems efflux RND family, of which only three are involved in the resistance of clinical isolates of I, they are: MexAB-OprM, MexEF OprN-and MexXY-OprM [11].

Besides the research resistance gene, another tool in controlling infection is to apply genotyping methods for determining the genetic relationship between microorganisms thus enabling dynamic mapping of transmission of infection [8]. A bacterial genotyping method has been shown quite promising and is based on PCR amplification of sequences of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). This technique allows us to highlight differences in a group phenotypically identical, having an impact on therapeutic intervention to identify chains of transmission in hospital outbreaks [12-14].

The present study aimed to genetically characterize clinical isolates of *P. aeruginosa* from a university hospital in Recife-PE, as the presence of resistance genes (*bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *mexA*, *mexE* e *mexX*) and profile of genetic similarity, evidenced by ERIC-PCR.

Methods

The 120 isolates of *P. aeruginosa*, collected during the period from April to August 2011 and from May to September 2012 were identified by the automated Phoenix™ (BD - Becton Dickinson and Company) in the university hospital study. They were plated on tubes containing agar Casoy and, after incubation time were plated on agar Cetrimide, for confirmation of bacterial species.

The profile of antimicrobial susceptibility was evaluated by disk diffusion technique or method of Kirby-Bauer using ceftazidime, imipenem, meropenem, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, aztreonam, gentamicin, polymyxin B, ticarcillin / clavulanic acid and amikacin, as recommended by the CLSI [15]. As a quality control test for susceptibility testing used the control strain of *P. aeruginosa* 27853 from the American Type Culture Collection (ATCC). All results were compared with the minimum inhibitory concentrations (MICs) determined by automated Phoenix™ (BD - Becton Dickinson and Company) hospital study and was able to verify the equivalence between the results of the two methods.

To search resistance gene was extracted from the total DNA isolated using the kit Brazol (LGC Biotechnology) according to the instructions of the manufacturer.

Isolates resistant to ceftazidime and imipenem or meropenem were selected for the survey MβLs. These were subjected to PCR for detection of genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM} *bla*_{IMP} and whose primers are described in Table 1 below:

Table 1. List of primers and annealing temperatures for the detection of genes MβL

Gen	Primers	Annealing temperatures (°C)	References
<i>bla</i> _{IMP}	F(5' GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC 3')	50,6	[16]
	R(5' GTGATGCGTCYCCAAYTTCAC 3')		
<i>bla</i> _{VIM}	F (5'CAGATTGCCGATGGTGTGG 3')	56,8	[16]
	R (5'AGGTGGGCCATTCAGCCAGA 3')		
<i>bla</i> _{SPM-1}	F(5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3')	55,3	[17]
	R(5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3')		

The amplification reactions were prepared in a total volume of 25 µl per tube, comprising: 25 ng of genomic DNA, 10 pmol of primers, 1x Buffer, 100 mM of deoxyribonucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl₂ and 1.0 U of Taq DNA polymerase. In each round of amplification was included a negative control consisting of a tube with all components of the reaction to which no DNA was added, and a positive control for the genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}. Amplifications these genes were performed in a thermocycler under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing second temperature of the primers for 1 minute (according to Table 1) and extension at 72°C for 1 minute. After 30 cycles there was a final elongation step of 10 minutes at 72°C. The PCR products were stained and subjected to gel electrophoresis in 1.0% agarose in TBE buffer 0,5X under constant voltage of 100V [17].

The MDR isolates were tested for resistance genes *mexA*, *mexE* AND *mexX* whose primers are described in Table 2 below:

Table 2. List of primers and annealing temperatures for the detection of genes multidrug efflux systems

Gen	Primers	Annealing temperatures (°C)	References
<i>mexA</i>	F(5' CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC 3') R(5' GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC 3')		[18]
<i>mexE</i>	F (5' CCAGGACCAGCACGAACTTCTTGC 3') R (5' CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCACC 3')		[18]
<i>mexX</i>	F(5' TGAAGGCGGCCCTGGACATCAGC 3') R(5' GATCTGCTCGACGCGGGTCAGCG 3')		[18]

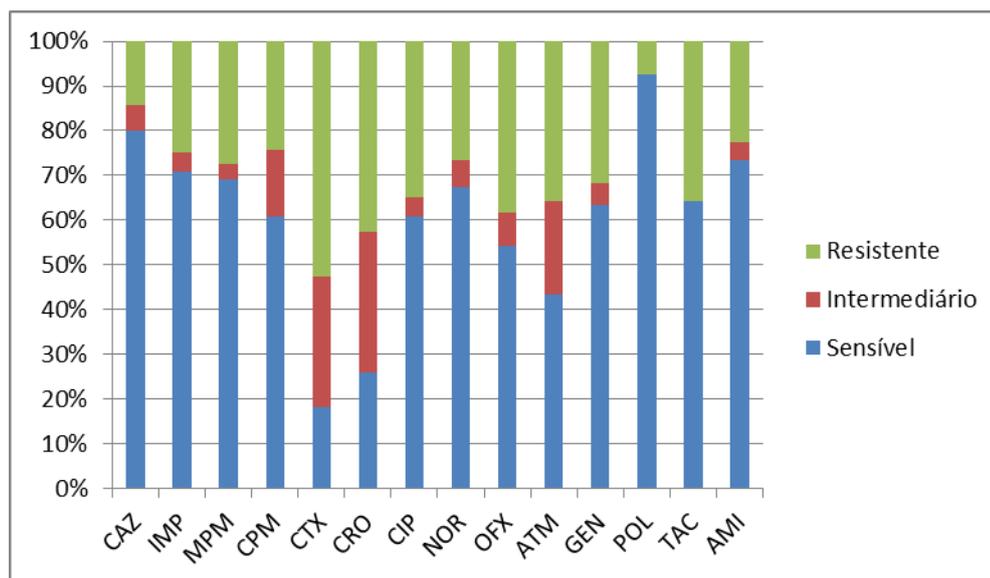
The amplification reactions were prepared in a total volume of 25 µl per tube, comprising: 10 ng of genomic DNA, 10 pmol of primers, 1x Buffer, 200 mM of deoxyribonucleotide triphosphate, 2 mM MgCl₂ and 1U Taq DNA polymerase. In each round of amplification was included a negative control consisting of a tube with all components of the reaction to which no DNA was added, and a positive control consisting of the strain of *P. aeruginosa* PAO1. The amplification parameters were used: initial denaturation at 94°C for 1 minute followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing second temperature of the primers (as shown in Table 2) for 45 seconds and extension at 72°C for 45 seconds. After 35 cycles there was a final elongation step of 10 minutes at 72°C. The PCR products were stained and subjected to gel electrophoresis in 1.5% agarose in TBE buffer 0,5X under constant voltage of 100V [18].

The research of genetic relationship among the isolates was performed by ERIC-PCR technique. Reactions were prepared in a total volume of 25 μ l per tube, comprising: 100 ng genomic DNA, 10 pmol of primers (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), 1X Buffer, 200 mM of deoxyribonucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl₂ and 1.0 U Taq DNA polymerase. The amplification parameters used in ERIC-PCR were: initial denaturing at 95°C for 3 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 1 minute, annealing at 36°C for 1 minute and extension at 72°C for 8 minutes. After 40 cycles there was a final elongation step of 16 minutes at 72°C. The PCR products were stained and subjected to gel electrophoresis in 1.5% agarose in TBE buffer 0,5X under constant voltage of 100V [19]. Data analysis and dendrograms were performed using the software PAST (Copyright Hammer & Harper).

Results

One hundred twenty isolates of *P. aeruginosa* were collected during the study period. The profile data antimicrobial susceptibility are presented in Figure 1. The highest percentages of resistance were observed against cefotaxime (52.5%), ceftriaxone (42.5%) and ofloxacin (38.3%), while polymyxin B, ceftazidime and amikacin had the highest percentages of sensitivity, with 92.5%, 80.0% and 73.3%, respectively.

Figure 1. Profile of antimicrobial susceptibility in isolates of *P. aeruginosa* from Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-PE).



Note: CAZ = ceftazidime; IMP = imipenem, MPM = meropenem; CPM = cefepime; CTX = cefotaxime; CRO = ceftriaxone; CIP = ciprofloxacin; NOR = norfloxacin; OFX = ofloxacin; ATM = aztreonam; GEN = gentamicin; POL = polymyxin B; TAC = ticarcillin / clavulanic acid; AMI = amikacin.

Among the 17 isolates resistant to ceftazidime and imipenem or meropenem, none were positive in the search for genes $M\beta L$, bla_{SPM-1} , bla_{IMP} e bla_{VIM} .

Isolates of *P. aeruginosa* were tested for MDR genes *mexA*, *mexE* and *mexX*. *MexA* and *mexE* genes were detected in 97.1% (67/69) of MDR isolates and *mexX* gene was detected in 95.6% (66/69) of the isolates. Figures 3a, 3b and 3c illustrate the agarose gels with the PCR product for each gene multidrug efflux systems. Table 3 shows the susceptibility profiles of the isolates found efflux pumps.

Figura 2 – Gel electrophoresis of PCR products: **a.** *mexA* gene (amplicon 316pb); **b.** *mexE* gene (amplicon 114pb); **c.** *mexX* gene (amplicon 326pb).

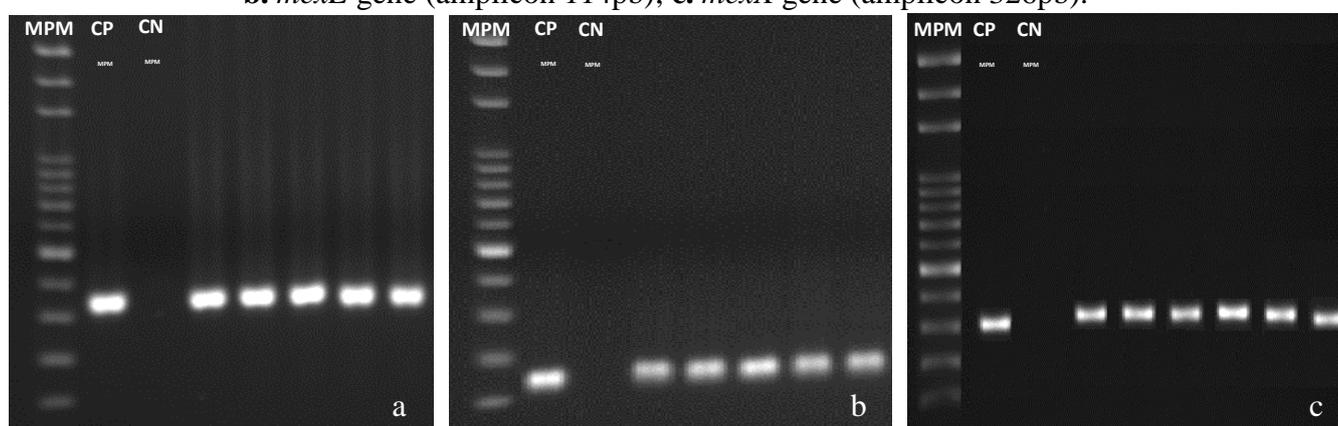


Table 3 - Profile of antimicrobial resistance genes and efflux pumps present in clinical isolates of *P. aeruginosa* from a university hospital in Recife-PE, during the period April to August 2011 and from May to September 2012.

BACTERIA ISOLATED	PROFILE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE	GENES DE RESISTÊNCIA
P1HC	CAZ, CTX, CRO, ATM, GEN	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P2HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, GEN, AMI,	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P3HC	CTX, CRO, ATM, GEN	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P4HC	CTX, CRO, CIP, ATM	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P5HC-2	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, ATM, TAC, AMI	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P7HC-2	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, ATM, TAC, AMI	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P8HC	CTX, CRO, ATM, GEN	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P11HC	CTX, CRO, ATM, GEN	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P14HC	CTX, CRO, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P17HC	CTX, CRO, ATM, TAC	-
P20HC	CTX, CRO, IMP, ATM, GEN, POL	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P24HC	CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN	<i>mexA</i> , <i>mexE</i>
P30HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P31HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P33HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN, AMI, POL	-
P34HC	CTX, CRO, OFX, ATM	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>
P35HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM	<i>mexA</i> , <i>mexE</i> , <i>mexX</i>

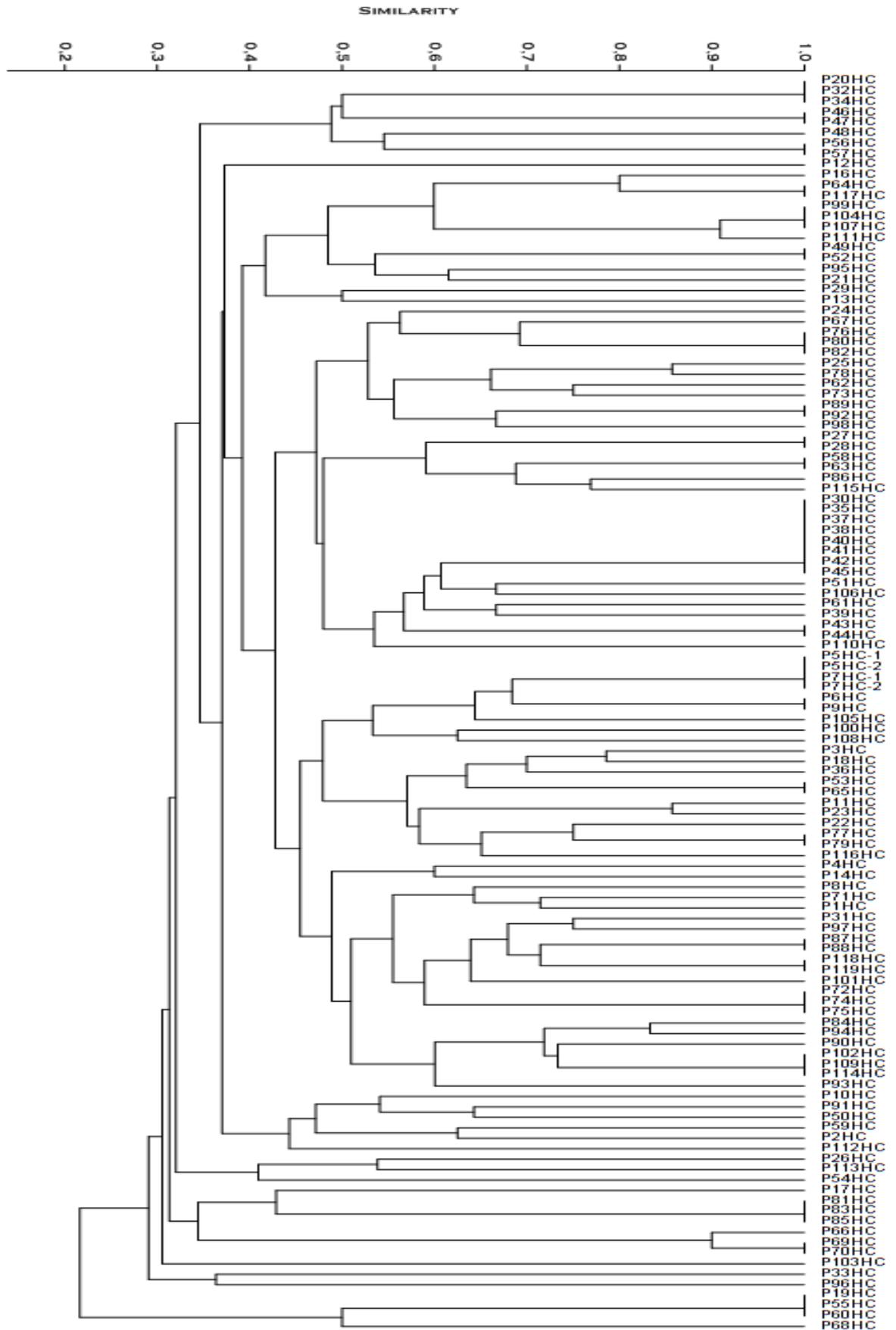
P36HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P37HC	CTX, CRO, OFX, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P38HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P40HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P41HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, OFX, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P42HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P44HC	CTX, CRO, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P45HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P46HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P47HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P49HC	CPM, CTX, CIP, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P53HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P56HC	CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P57HC	CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P61HC	CIP, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P62HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P63HC	CPM, CTX, CRO, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P64HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P65HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P67HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P71HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, ATM, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P72HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P73HC	CPM, CTX, CRO, MPM, CIP, OFX, ATM, TAC, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P74HC	CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P75HC	CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P76HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P77HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P78HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P79HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P80HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P81HC	CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P82HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P83HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P85HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P90HC	CAZ, CTX, CRO, MPM, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P92HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P93HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, GEN, AMI, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P95HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P96HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P97HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P99HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P100HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P102HC	CTX, CRO, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P104HC	CPM, CTX, CRO, IMP, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P105HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P107HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P109HC	CTX, CRO, IMP, MPM, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P111HC	CTX, CRO, IMP, MPM, NOR, OFX, ATM, TAC	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P114HC	CTX, CRO, IMP, MPM, ATM, TAC, POL	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P115HC	CPM, CTX, CRO, CIP, NOR, OFX, GEN	<i>mexA, mexE, mexX</i>
P118HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>

P119HC	CAZ, CPM, CTX, CRO, IMP, MPM, CIP, NOR, OFX, ATM, TAC, GEN, AMI	<i>mexA, mexE, mexX</i>
--------	--	-------------------------

Note: CAZ = ceftazidime; IMP = imipenem, MPM = meropenem; CPM = cefepime; CTX = cefotaxime; CRO = ceftriaxone; CIP = ciprofloxacin; NOR = norfloxacin; OFX = ofloxacin; ATM = aztreonam; GEN = gentamicin; POL = polymyxin B; TAC = ticarcillin / clavulanic acid; AMI = amikacin.

Genotyping of isolates of *P. aeruginosa* by ERIC-PCR showed 82 different genetic profiles, as shown in the dendrogram (Figure 3).

Figure 3 - Dendrogram of genetic similarity, generated by the software PAST, among 120 isolates of *P. aeruginosa* from a university hospital in Recife-PE, estimated by ERIC-PCR technique.



Discussion

The result of the susceptibility profile obtained in this study revealed that the antimicrobial activity against *P. aeruginosa* was polymyxin B (92.5%), followed by ceftazidime (80.0%), amikacin (73.3%), imipenem (70.8%) and meropenem (69.2%). Previous studies were conducted in the city of Recife and also found similar data to this study. Figueiredo and colleagues [19] investigated a total of 304 isolates of *P. aeruginosa* from two public hospitals in Recife, including the Hospital das Clínicas (HC-PE), between the years 2004 and 2006. It was observed that among the tested antibiotics, aztreonam (56.45%), amikacin (55.95%), meropenem (55.7%) and imipenem (51.7%) showed higher activity against *P. aeruginosa*. Pires and colleagues [20] conducted a study on the HC-PE during the year 2009 and found that the antibiotics most active against *P. aeruginosa* were amikacin (84.62%), imipenem (81.82%), meropenem (79.31%) and aztreonam (74.39%). Another study realized by Jácome and colleagues [8] also evaluated the susceptibility profile in clinical isolates of *P. aeruginosa* from five hospitals in Recife collected at various periods. This study showed that the antimicrobial activity was polymyxin B (82%), ceftazidime (67.2%), imipenem (63.9%) and meropenem (62.3%). All studies showed that carbapenems are among the most active antimicrobials against *P. aeruginosa*, with percentages ranging from 51.7% to 81.8%.

The percentage of isolates of *P. aeruginosa* observed in this study was 57.5%, confirming previous findings of multidrug resistance observed in hospitals in Recife [8, 19]. However, in studies conducted in other countries have been observed percentage of multidrug resistance well below the values found in our study [21-23].

It was also observed that the 17 isolates resistant to ceftazidime and meropenem or imipenem, there was no detection of genes *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}. The results of this study show a major change in the epidemiology of resistance in clinical isolates of *P. aeruginosa*, also evidenced by Cavalcanti et al. The decrease in the prevalence of epidemic clone SPM-1 has been observed since 2008, suggesting that other resistance mechanisms must be present in the hospital under study, like the multidrug efflux systems [24].

Reports of *P. aeruginosa* producing M β L has been reported worldwide, with a predominance of enzymes IMP and VIM [25]. In Brazil the enzyme is the most prevalent SPM-1 [3], whose cases remained restricted to Brazil until 2010, when he published the first report of SPM-1 in Europe, isolated in 2007 from a Swiss patient who had been treated at a university hospital in Recife-PE, Brazil. [26]

Of the 69 isolates of *P. aeruginosa* genes undergoing research *mexA*, *mexE* and *mexX*, 97.1% were positive for the genes *mexA* and *mexE*, and 95.6% for the gene *mexX*. Almost all isolates positive for efflux systems research is very interesting and may explain multidrug resistance in these isolates. Data corroborate the values found in this study were observed by Pournaras and colleagues [27], whose research revealed the presence of efflux systems MexAB-OprM and MexXY-OprM, respectively, 100% and 91.7% of isolates *P. aeruginosa* negative for the research of gene *bla_{VM}*. Llanes and colleagues [28] also investigated the occurrence of efflux systems in isolates of *P. aeruginosa*. The values obtained are well below those found in this study, 36.5%, 11.8% and 45.9% the percentage of positive isolates for research efflux systems MexAB-OprM, MexEF OprN-and MexXY-OprM, respectively.

Genotyping by ERIC-PCR showed 82 distinct genetic profiles, with varying degrees of similarity of 45% to 100%, demonstrating a low clonal relationship among the isolates. Genetic heterogeneity observed between strains of the same bacterial species suggests the occurrence of random mutations non-lethal, deletion of genes, base pair substitution, acquisition of DNA from other bacterial species in isolates studied [8].

We conclude that the isolates of *P. aeruginosa* in this study had a high rate of multidrug resistance, which is consistent with other studies in Pernambuco. This multidrug resistance seems to be directly related to the presence of multidrug efflux systems MexAB-OprM, MexEF OprN-and MexXY-OprM, identified by PCR of genes *mexA*, *mexE* and *mexX*. The accumulation of these resistance genes in isolates studied imposes limitations of antimicrobial therapy used to fight infections by *P. aeruginosa*. Genetic heterogeneity was observed, suggesting the need for more rigorous application of infection control measures in hospitals in Recife, to reduce costs and damage caused by this type of infection, especially in severely ill patients.

References

1. ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; FERNANDES, J.F.; MORO, A.L.D.; GONÇALVES, A.L.S.; GOLDANI, L.Z. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase mediated multidrug resistance: a prospective observational study. **Critical Care**, v. 10, n. 4, p.100-110, 2006.
2. FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5 p. 470-473, 2008.
3. FIGUEIREDO, D.Q.; CASTRO, L.F.S.; SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; MONDINO, S.S.B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e

Acinetobacter baumannii. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 177-184, 2009.

4. LEE, J-Y; KO, K.S. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2012.

5. WIRTH, F.W.; PICOLI, S.U.; CANTARELLI, V.V.; GONÇALVES, A.L.S.; BRUST, F.R.; SANTOS, L.M.O.; BARRETO, M.F. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, n. 3, p.170-172, 2009.

6. ASKOURA, M.; MOTTAWEA, W.; ALBUJAMEL, T.; TAHER, I. Efflux pumps inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Lybian J. Med.**, v. 6, p. 5870, 2011.

7. AMUDHAN, M.S.; SEKAR, U.; KAMALANATHAN, A.; BALARAMAN, S. *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6, n. 11, p. 757-762, 2012.

8. JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n.6, p. 707-712, 2012.

9. LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Disease**, v. 34, n. 1, p. 634-640, 2002.

10. JO, J.T.H.; BRINKMAN, F.S.L.; HANCOCK, R.E.W. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1101-1111, 2003.

11. POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Ann. Med.**, v. 39, n. 3, p. 162-176, 2007.

12. VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p. 6823-6831, 1991.

13. PFALLER, M.A.; ACAR, J.; JONES, R.N.; VERFHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H.S. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 156-167, 2001.

14. ALVES, M.S.; DIAS, R.C.S.; CASTRO, A.C.D.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella spp*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3640-3646, 2006.

15. CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement (January 2012). **CLSI document M100-S22**, v.32, n.3, 2012.

16. DONG, F.; XU, X. W.; SONG, W. Q.; LÜ, P.; YU, S. J.; YANG, Y. H.; SHEN, X. Z. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 17, p.1611-1616, 2008.

17. GALES, A.C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 699-702, 2003.
18. OZER, B.; DURAN, N.; ONLEN, Y.; SAVAS, L. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, p. 9-13, 2011.
19. FIGUEIREDO, E.A.P.; RAMOS, H.; MACIEL, M.A.V.; VILAR, M.C.M.; LOUREIRO, N.G.; PEREIRA, R.G. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 19, p. 421-427, 2007.
20. PIRES, E.J.V.C.; SILVA JÚNIOR, V.V.; LOPES, A.C.S.; VERAS, D.L.; LEITE, L.E.; MACIEL, M.A.V. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 21, p. 384-390, 2009.
21. MCGOWAN JR, J.E. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. s29-s37. 2006
22. RAJA, N.S.; SINGH, N.N. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, p. 45-49, 2007.
23. TAM, V.H; CHANG, K.T; ABDELRAOUF, K; BRIOSO, C.G; AMEKA, M; MCCASKEY, L.A; WESTON, J.S; CAEIRO, J.P; GAREY, K.W. Prevalence, resistance mechanisms and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1160–1164, 2010.
24. CAVALCANTI, F.L.S.; ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JUNIOR, M.A. Changing epidemiology of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of SPM-producing isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 27, p. 420-423, 2012.
25. WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, suppl 3, p. S8–S14, 2010.
26. SALABI, A. E.; TOLEMAN, M. A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T; FREI, R.; WALSH, T. R. First Report of the Metallo- β -Lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 582, 2010.
27. POURNARAS, S.; MANIATI, M.; SPANAKIS, N.; IKONOMIDIS, A.; TASSIOS, P.T.; TSAKRIS, A.; LEGAKIS, N.J.; MANIATIS, A.N. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with *bla*_{VIM} endemicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 761–764, 2005.
28. LLANES, C.; KÖHLER, T.; PATRY, I.; DEHECQ, B.; VAN DELDEN, C.; PLÉSIAT, P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.12, p. 5676-5684, 2011.

APÊNDICE B**ARTICLE 2**

KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa*: occurrence of a new clone in Recife-PE.

Authors:

- (1) Lilian Rodrigues Alves - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine - Postgraduate Program in Tropical Medicine. MSc in Tropical Medicine.
- (2) Jailton da Costa Lobo - Universidade Federal de Pernambuco - Centre for Biological Sciences. Bachelor of Biomedicine.
- (3) Marcelle Aquino Rabelo - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine - Postgraduate Program in Tropical Medicine. Doctorate in Tropical Medicine.
- (4) Ana Catarina Lopes de Souza - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine. Associate Professor at Universidade Federal de Pernambuco.
- (5) Maria Amelia Vieira Maciel - Universidade Federal de Pernambuco - Department of Tropical Medicine. Associate Professor at Universidade Federal de Pernambuco.

Address for correspondence:

Lilian Rodrigues Alves
Rua Coronel João Ribeiro, 844 - Bairro Novo, Olinda, Pernambuco / Brazil
CEP: 53030-040
Tel +55 (81) 3429-0204
e-mail: lilianalves88@hotmail.com

Maria Amelia Vieira Maciel
Universidade Federal de Pernambuco
Department of Tropical Medicine.
Av Moraes Rego 1235 - University City, Recife, Pernambuco / Brazil
CEP: 50670-901
Tel +55 (81) 2126-8526
e-mail: amelia57@gmail.com

Magazine: The structure of the article seeks to comply with the publication requirements of The Brazilian Journal of Infectious Diseases, case reports format.

Abstract: This paper reports the occurrence of a new clone of *Pseudomonas aeruginosa* KPC- producing (*Klebsiella pneumonia*-carbapenemase) in Recife-PE. In 2011, we collected two isolates of *P. aeruginosa* originating from trachea of a patient admitted to a university hospital in Recife. These isolates were analyzed and found to two distinct phenotypes in each. A new seeding was done to the complete isolation of the isolates. After isolation there was obtained four strains of *P. aeruginosa* resistant to carbapenems who underwent gene research *bla*_{KPC} technique of Polymerase Chain Reaction (PCR), with positive results. The heterogeneity of isolates of *P. aeruginosa* observed phenotype through the production of pigments and susceptibility profile was analyzed by two methods for genotyping: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences (ERIC-PCR) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Both methods confirmed that the four typing isolates of *P. aeruginosa* KPC-positive had the same genetic profile, confirming that the four isolates belonged to the same bacterial strain, even with distinct phenotypic characteristics.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; infection; KPC.

Initially described in members of the Enterobacteriaceae family, KPC (*Klebsiella pneumonia*-carbapenemase) has spread in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the world, the example of Colombia, Puerto Rico, Trinidad and Tobago, United States and Brazil [1-5].

KPC-positive isolates are able to hydrolyze several β -lactam antibiotics including cephalosporins, carbapenems and monobactams, yet are inhibited by clavulanic acid and tazobactam [6-8]. This enzyme limited therapeutic options and threatens with negative effects on clinical outcomes of patients [9].

Two isolates of *P. aeruginosa* resistant to carbapenems were recovered and disposed of by the hospital laboratory study in our research group for further analysis. Isolates called P5HC and P7HC (both isolated from tracheal aspirates) were plated on ceftrimide agar and later susceptibility testing was performed by disk diffusion technique or method of Kirby-Bauer. After completion of antibiotic susceptibility was observed that each isolate had phenotypic heterogeneity, exhibited two types of pigments and growth within the inhibition zone. We conducted a new isolation until the complete separation of the isolates. Thus, both

strains became four: P5HC-1, P5HC-2, P7HC-1 and P7HC-2. Table 1, below, describes the main phenotypic characteristics of each isolate.

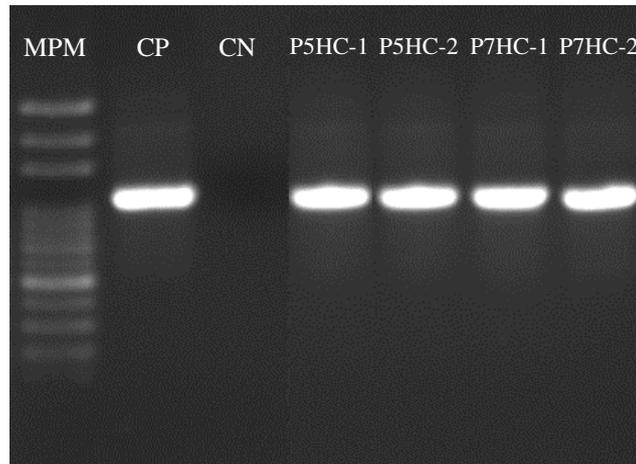
Table 1. Phenotypic characteristics of isolates of *P. aeruginosa* from hospitalized patients in a university hospital in Recife-PE.

Isolate	Pigment	Antibiogram*		MDR
		Sensitive	Resistant	
P5HC-1	Fluorescein	CAZ, MPM, CPM, CIP, NOR, OFX, ATM, GEN, POL, TAC, AMI	IMP, CTX, CRO	No
P5HC-2	Pyocyanin; Pyoverdin	CIP, NOR, OFX, GEN, POL	CAZ, IMP, MPM, CPM, CTX, CRO, ATM, TAC, AMI	Yes
P7HC-1	Fluorescein	CAZ, MPM, CPM, CIP, NOR, OFX, ATM, GEN, POL, TAC, AMI	IMP, CTX, CRO	No
P7HC-2	Pyocyanin; Pyoverdin	CIP, NOR, OFX, GEN, POL	CAZ, IMP, MPM, CPM, CTX, CRO, ATM, TAC, AMI	Yes

* According to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012 [10].

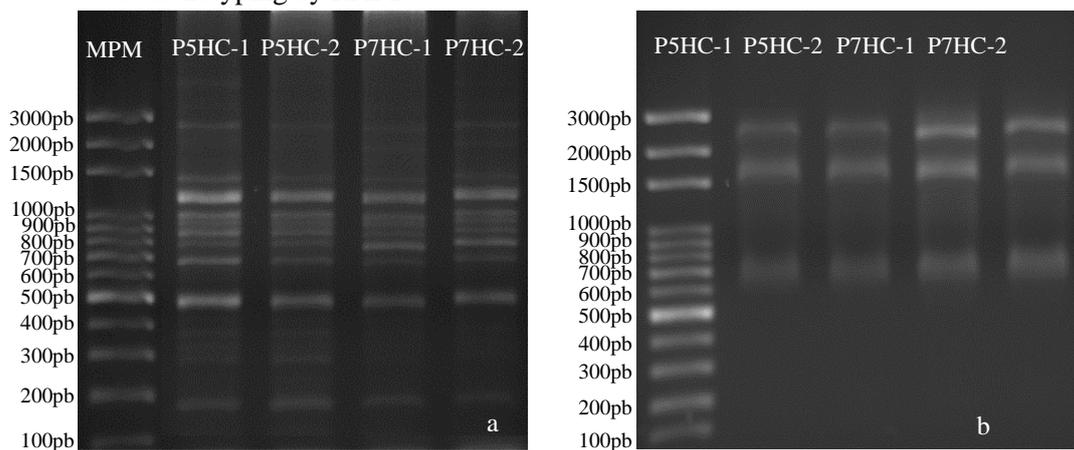
Note: CAZ = ceftazidime; IMP = imipenem, MPM = meropenem; CPM = cefepime;
CTX = cefotaxime; CRO = ceftriaxone; CIP = ciprofloxacin; NOR = norfloxacin;
OFX = ofloxacin; ATM = aztreonam; GEN = gentamicin; POL = polymyxin B;
TAC = ticarcillin / clavulanic acid; AMI = amikacin; MDR = multidrug resistant.

By resistance to carbapenems, the four isolates were submitted to research gene *bla*_{KPC} technique Polymerase Chain Reaction (PCR) according to the protocol previously described [11]. Genetic research has resulted in the detection of the gene *bla*_{KPC} the four tested strains (Figure 1).

Figure 1. Gel electrophoresis of PCR products for gene *bla*_{KPC} (amplicon de 1000pb)

Note: MPM = molecular weight marker (100bp ladder - Amresco) CP = Positive control strain P22A [5]; CN = negative control; P5HC-1, P5HC-2, P7HC-1 and P7HC-2 = isolates of *P. aeruginosa* described in this article.

Then were genotyped by two different techniques to assess the degree of genetic similarity among the four isolates of *P. aeruginosa* KPC-positive. The ERIC-PCR and RAPD analysis were performed according to protocols previously established in the literature [12, 13]. The patterns of genetic similarity obtained by ERIC-PCR and RAPD can be seen in Figures 2a and 2b.

Figura 2 – Gel electrophoresis of PCR products: a. Genotyping by ERIC-PCR; b. Genotyping by RAPD

Nota: MPM = marcador de peso molecular (Ladder 100pb – Amresco); CP = controle positivo; CN = controle negativo; P5HC-1, P5HC-2, P7HC-1 e P7HC-2 = isolados de *P. aeruginosa* descritos neste artigo.

The identification of *P. aeruginosa* KPC-producing has great relevance in Brazil, due to the high prevalence of this pathogen in infections related to health care, often associated with respiratory infections in patients considered severe [14, 15]. This bacteria has a high degree of intrinsic resistance to antimicrobial agents that, in addition to their ability to develop new mechanisms by genetic mutation or the acquisition of mobile genetic elements, affords isolated multidrug resistant (MDR) whose treatment is longer and increasing the chances the death of the patients due to the need for treatments using high doses of antibiotics, often in association for long periods [16, 17].

Data corroborate those found in this study were observed in 2010, where two isolates of *P. aeruginosa*, also of tracheal secretions were recovered from two different patients in a teaching hospital in Recife. Both had the gene *bla*_{KPC} and were sensitive only to gentamicin and polymyxin B. After genotyping by ERIC-PCR, showed that both isolates had the same profile of genetic similarity therefore were genetically related [5].

An interesting fact to note is the presence of the gene in isolates *bla*_{KPC} non-multidrug resistant (NMDR), which showed resistance to imipenem, cefotaxime and ceftriaxone, suggesting a possible genetic transfer among isolates of *P. aeruginosa* multidrug resistant (MDR) and NMDR. This transfer has been demonstrated with other bacterial species in a case whose patient underwent a small bowel transplant and acquired a *K. pneumoniae* producing KPC. Subsequently, it was found that the gene was transferred to *bla*_{KPC} *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* then for demonstrating dissemination of this gene among different bacterial species [18].

Even phenotypic profiles showing the four isolates are genetically related as can be seen in Figures 2a and 2b. The techniques employed are widely used and has proven to be efficient for genotyping isolates of *P. aeruginosa* [5, 13, 19]. This heterogeneity can be explained by production of biofilms of *P. aeruginosa* in infections which affect the lung tissues, for the production of biofilms leads phenotypically distinct subpopulations of the same bacteria by changing mainly to its cellular physiology. This physiological alteration affects the synthesis of secondary metabolites and residuals, and signaling compounds which form chemical gradients that intersect and overlap, creating various micro-environments which allow bacterial cells to respond in accordance with local environmental conditions. [20]

Given these data we conclude that both typing methods confirmed that the four strains of *P. aeruginosa* KPC-positive had the same genetic profile, confirming that they belonged to the same bacterial strain, despite having distinct phenotypic characteristics.

References

1. VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J.N.; LOPEZ, J.A.; QUINN, J.P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1553–1555, 2007.
2. WOLTER, D.J.; KURPIEL, P.M.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M.F.; GOERING, R.V.; HANSON, N.D. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 557-562, 2009.
3. AKPAKA, P.E.; SWANSTON, W.H.; IHEMERE, H.N.; CORREA, A.; TORRES, J.A.; TAFUR, J.D.; MONTEALEGRE, M.C.; QUINN, J.P.; VILLEGAS, M.V. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.8 p. 2670–2671, 2009.
4. POIREL, L.; NORDMANN, P.; LAGRUTTA, E.; CLEARY, T.; MUNOZ-PRICE, L. S. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 3072, 2010.
5. JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.
6. ZHANG, R.; YANG, L.; CAI, J. C.; ZHOU, H. W.; CHEN, G. X. High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p.332–337, 2008.
7. PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 265–268, 2009.
8. GOREN, M.G.; CARMELI, Y. SCHWABER, M.J.; CHMELNITSKY, I.; SCHECHNER, V.; NAVON-VENEZIA, S. Carbapenem-Resistant Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in Patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1014-1017, 2010.
9. SCHWABER, M.J.; CARMELI, Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. **JAMA**, v. 300, p. 2911–2913, 2008.
10. CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement (January 2012). **CLSI document M100-S22**, v.32, n.3, 2012.
11. YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.
12. DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J.; ZHANG, X.; QI, C.; GAO, J.; WANG, Y.; CAI, Y.; MIAO, Z.; YAO, M.; SCHLENKER, G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511–517, 2009.

13. FONSECA, A.P.; CORREIA, P.; EXTREMINA, C.I.; SOUSA, J.C.; TENREIRO, R.; BARROS, H. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Portuguese Central Hospital. **Folia Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 540-546, 2008.
14. SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCOLLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5; p. 200-214, 2001.
15. PIRES, E.J.V.C.; SILVA JÚNIOR, V.V.; LOPES, A.C.S.; VERAS, D.L.; LEITE, L.E.; MACIEL, M.A.V. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 21, p. 384-390, 2009.
16. CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; LIVERMORE, D.M. Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 63, p. 426-433, 2009.
17. LAYEUX, B.; TACCONE, F.S.; FAGNOUL, D.; VINCENT, J.L.; JACOBS, F. Amikacin monotherapy for sepsis caused by panresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54:4939-4941.
18. SIDJABAT, H.E.; SILVEIRA, F.P.; POTOSKI, B.A.; ABU-ELMAGD, K.M.; ADAMS-HADUCH, J.M.; PATERSON, D.L.; DOI, Y. Interspecies spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene in a single patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1736-1738, 2009.
19. JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n.6, p. 707-712, 2012
20. WILLIAMSON, K.S.; RICHARDS, L.A.; PEREZ-OSORIO, A.C.; PITTS, B.; MCINNERNEY, K.; STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2062-2073, 2012.

ANEXOS

ANEXO A



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):

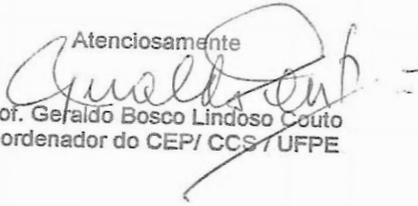
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início 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 8568;
e-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B

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.

Quinto
de Junho
de 2012
De 17/04/12
[Assinatura]

Marcelle Aquino Rabelo
Mestranda Marcelle Aquino Rabelo

[Assinatura]
Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEPICCS/UFPE