



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SUELEN BALERO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE  
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS  
E DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS  
DE *Pseudomonas aeruginosa***

---

Londrina  
2017

SUELEN BALERO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE  
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS  
E DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS  
DE *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada  
Ogatta

Co-orientadora: Profa. Dra. Floristher Elaine  
Carrara Marroni

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Paula, Suelen Balero de .

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* / Suelen Balero de Paula. - Londrina, 2017.  
167 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada-Ogatta.

Coorientador: Floristher Elaine Carrara-Marroni.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* - Tese. 2. Carbapenemases - Tese. 3. Fatores de virulência - Tese. 4. Clones de alto risco - Tese. I. Yamada-Ogatta, Sueli Fumie. II. Carrara-Marroni, Floristher Elaine. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

SUELEN BALERO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE MECANISMOS  
DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E DE FATORES DE  
VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas  
aeruginosa***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada  
Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Renata Cristina Picão  
Universidade Feral do Rio de Janeiro - UFRJ

---

Profa. Dra. Bárbara Gionco  
Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR

---

Prof. Dr. Emerson José Venâncio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de dezembro de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais, Inês e Jessé, pelo constante apoio e amor incondicional. Ao meu amado Plínio, pelo abraço que acolheu nos momentos de incertezas e cansaço, pelo companheirismo e paciência. Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. **Sueli Fumie Yamada Ogatta**, pelo exemplo e confiança. Pelo carinho e atenção que teve comigo ao longo destes anos e por estar sempre disposta a me ajudar.

A minha co-orientadora Profa. Dra. **Floristher Elaine Carrara-Marroni**, pela confiança e exemplo. Por tantas oportunidades. Por sempre acreditar em minhas potencialidades, muitas vezes não reconhecidas por mim. Por, como mãe, me repreender, aconselhar e animar, ultrapassando a simples convivência do laboratório. Sua determinação e intensidade me inspiram.

Ao **Prof. Dr. Emerson José Venâncio**, por participar de muitas etapas deste trabalho. Por me auxiliar na análise das sequências e por sempre oferecer ajuda.

A **Profa. Dra. Bárbara Gionco**, por estar sempre disponível a me ajudar, principalmente na padronização do ERIC-PCR e da microdiluição em caldo. Obrigada por sua amizade e carinho.

A **Profa. Dra. Renata Cristina Picão**, por aceitar o convite de participação na banca. Por sempre ter uma palavra de ânimo e estímulo. Por disponibilizar os experimentos finais do trabalho, pelo grande auxílio na redação do *paper* e por todas as dicas no momento da submissão.

A **Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo**, por prontamente atender ao meu convite de participação na banca de doutorado. Além disso, por sempre me tratar com tanto carinho.

A **Profa. Dra. Ana Cristina Gales**, pela acolhida junto ao laboratório "ALERTA". Ao **Dr. Rodrigo Cayô** por me supervisionar durante os dias de grande aprendizado no laboratório. Pelo auxílio nos experimentos e na redação do artigo. A todos integrantes do laboratório, em especial à **Ana Paula Streling** e **Carolina Silva Nodari** por se dedicarem aos meus experimentos. Por auxiliarem na determinação do contexto genético, mas também por mostrarem como trabalhar em equipe.

A **Profa. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognin**, por sempre ser tão gentil e por permitir a utilização de seu laboratório. Às alunas **Maisa Zago** e **Márcia Maria dos Anjos Szczerepa** por toda ajuda na utilização do Bionumerics e geração dos dendogramas.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey**, pelo auxílio nas análises de

MLST.

A **Dra. Danielle Kian**, pelo auxílio na padronização e realização do *Southern blot*, pela amizade de tantos anos, pela dedicação e palavras de carinho.

Aos estagiários que passaram pelo laboratório, em especial a **Francielle Eleodoro de Oliveira** e **Mayara Bocchi**, pela dedicação e trabalho, pelo auxílio na realização dos experimentos. Além disso, pela agradável convivência, pelas palavras e atitudes de carinho.

As mestrandas **Raquel Lima Palermo** e **Priscila Romanin**, pela convivência, por me ajudarem sempre que foi necessário, pelo apoio e incentivo.

A **Ana Paula Streling** por ter me acolhido em sua casa durante o período que fiquei em São Paulo, pelo carinho, palavras de ânimo e de reconhecimento durante esses anos.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia Clínica do HU e do laboratório de parasitologia do AHC pela agradável convivência e pelos momentos de descontração.

A **CAPES**, pela concessão da bolsa de doutorado.

Não temas, porque eu sou contigo; não te  
assombres porque eu sou teu Deus.  
Eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a  
destra da minha justiça.

Isaías 41:10

PAULA, Suelen Balero de. **Caracterização fenotípica e molecular de mecanismos de resistência aos antimicrobianos e de fatores de virulência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***. 2017. 167 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

**Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo caracterizar, por métodos fenotípicos e moleculares, mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e colistina mediados por plasmídeos e diversos fatores de virulência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. **Artigo científico 1:** Uma coleção de duzentos e dez isolados de *P. aeruginosa* não sensíveis à ceftazidima e/ou aos carbapenêmicos foram incluídos no estudo. Os isolados foram recuperados no Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Londrina (HU) no período de junho de 2012 a maio de 2014. A identificação bacteriana foi realizada pelo Vitek-2® (bioMérieux) e por testes bioquímicos convencionais, seguida pela confirmação por PCR. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão para treze antimicrobianos. A concentração inibitória mínima (CIM) à ceftazidima, aos carbapenêmicos e às polimixinas foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos foram interpretados segundo o documento M100-S27 (CLSI, 2017) e a classificação da resistência foi determinada segundo os critérios de Magiorakos (2012). A produção de carbapenemases foi avaliada pelo *Blue Carba Test* (BCT) e a produção de metalo-beta-lactamases (MBL) foi determinada pelo Teste de Sinergismo de Disco Triplo (TSDT). A presença de genes codificadores de beta-lactamases, carbapenemases, Qnr, 16S rRNA metiltransferases e integrases foi investigada por PCR convencional ou multiplex seguida por sequenciamento. A produção de fatores de virulência produzidos por *P. aeruginosa* foi detectada entre os isolados produtores de carbapenemases utilizando testes fenotípicos. Além disso, a capacidade de formação de biofilme foi avaliada em microplacas de poliestireno e os genes codificadores de fatores de virulência foram pesquisados por PCR. A clonalidade dos isolados produtores de carbapenemases foi avaliada por ERIC-PCR e o *Sequence Type* (ST), de cinco isolados escolhidos aleatoriamente produtores de diferentes genes de carbapenemases e de clones distintos, foi determinado por *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Altas taxas de resistência aos carbapenêmicos foram verificadas (80,9% para o imipenem e 78,0% para o meropenem) e somente as polimixinas apresentaram 100,0% de atividade contra todos os isolados do estudo. Cerca de 54,7% dos isolados foram classificados como multirresistentes (MR) e 31,9% como extensivamente resistentes (ER). A produção de carbapenemases e de MBL foi detectada em 33,3% e 31,9% dos isolados pelo BCT e pelo TSDT, respectivamente. Uma diversidade de genes codificadores de carbapenemases foi verificada entre 70 isolados: *bla*<sub>SPM-1</sub> (63/30,0%), *bla*<sub>KPC-2</sub> (3/1,4%), *bla*<sub>IMP-16</sub> (2/0,9%), *bla*<sub>VIM-1</sub> (1/0,4%) e *bla*<sub>VIM-7</sub> (1/0,4%). Foram detectados genes codificadores de beta-lactamases (*bla*<sub>GES-26</sub>, *bla*<sub>OXA-46</sub> e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) e de resistência aos aminoglicosídeos (*rmtD*). O gene *bla*<sub>IMP-16</sub> foi detectado como o único gene cassete de um integron da classe I nos dois isolados produtores de IMP-16. O contexto genético dos genes *bla*<sub>VIM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-7</sub> foram semelhantes: o gene codificador da MBL como o primeiro cassete gênico, seguido

por uma enzima modificadora de aminoglicosídeos (*aadA1*) e o gene *bla*<sub>OXA-46</sub> anteriormente ao *qac*Δ*E/sulI*. Todos os isolados produtores de carbapenemases formaram biofilme e apresentaram o gene *lasI* codificador de um dos componentes do *quorum sensing*. Um total de 98,6% e 94,3% foram produtores de hemolisinas e proteases, respectivamente. Os genes que codificam a fosfolipase hemolítica (*plcH*), elastase (*lasB*), exotoxina A (*toxA*) e exotoxina S foram detectados em 94,3% dos isolados produtores de carbapenemases. Apenas um e quatro isolados apresentaram os genes que codificam neuraminidase (*nanI*) e a exotoxina U, respectivamente. A tipagem molecular dos isolados produtores de carbapenemases evidenciou grande diversidade clonal com a presença de 18 genótipos distintos, dos quais os isolados portadores de *bla*<sub>SPM-1</sub> foram agrupados em 14 genótipos e os isolados portadores de *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>IMP-16</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-7</sub> foram agrupados em clones únicos. Diferentes STs foram obtidos para os cinco isolados submetidos ao MLST e dentre estes dois foram relacionados à disseminação de determinantes de resistência: o portador de *bla*<sub>SPM-1</sub> pertenceu ao ST277, relacionado à disseminação de SPM-1 no Brasil e o portador de *bla*<sub>KPC-2</sub> ao ST235, um importante clone epidêmico mundial. **Artigo científico 2:** Este estudo relatou a primeira descrição de um isolado de *P. aeruginosa* produtor de VIM-7 no Brasil. O isolado foi recuperado em maio de 2013 da secreção traqueal ( $10^7$  UFC/mL) de um paciente internado no HU que apresentou resistência a todos os antimicrobianos, com exceção das polimixinas. A produção de carbapenemases foi avaliada pelo BCT e a de MBL pelo TDST. O gene *bla*<sub>VIM-7</sub> foi localizado num plasmídeo de 52 Kb como o primeiro gene cassete de um integron da classe I seguido por um gene *aadA1* e o *bla*<sub>OXA-46</sub> situado anteriormente ao *qac*Δ*E/sulI*. O isolado pertenceu ao ST1284, foi um forte produtor de biofilme e apresentou os genes codificadores de fatores de virulência *lasI*, *lasB*, *plcH*, *toxA* e *exoS*. **Artigo científico 3:** O artigo relata a presença de um isolado de *P. aeruginosa* produtor de KPC-2 pertencente ao ST235 em 2008, anteriormente à primeira detecção do gene *bla*<sub>KPC</sub> no Brasil e de um surto de Enterobactérias produtoras de *bla*<sub>KPC</sub> no HU. Este isolado foi recuperado da urina de uma paciente internada no setor de queimados do HU, foi classificado como ER e apresentou sensibilidade apenas às polimixinas. A produção de carbapenemases foi detectada pelo BCT e o resultado negativo no TSDT caracterizou uma carbapenemase não MBL. O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> apresentou localização cromossomal, em um contexto genético idêntico a isolados recuperados no HU em 2010. O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi flanqueado à montante pela sequência de inserção IS*Kpn6*, entretanto à jusante não foram detectadas IS*Kpn7* e IS*Kpn8*. O isolado foi considerado hipervirulento, um forte formador de biofilme, produziu hemolisina e protease e apresentou os genes *lasI*, *lasB*, *plcH*, *toxA*, *exoY* e *exoU*. **Conclusões:** As altas taxas de resistência aos antimicrobianos, a diversidade de genes codificadores de carbapenemases, a produção de importantes fatores de virulência e a detecção de STs relacionados a clones epidêmicos nacional e mundial refletem o problema da resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* no HU. Desta forma o estudo enfatiza a necessidade de medidas estritas de controle de infecção e de programas efetivos para o uso racional dos antimicrobianos neste hospital.

**Palavras-chave:** Carbapenemases. Clones de alto risco. Metallo-beta-lactamases.

PAULA, Suelen Balero de. **Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance mechanisms and virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa***. 2017. 167 pp. Thesis (Doctorate in Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to characterize, by phenotypic and molecular methods, the resistance mechanisms to beta-lactams, quinolones, aminoglycosides and colistin mediated by plasmids and several virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific article 1:** A collection of two hundred and ten *P. aeruginosa* isolates non-susceptible to ceftazidime and/or carbapenems were included in the study. The isolates were recovered in the Clinical Microbiology Laboratory of the University Hospital of Londrina (HU) from June 2012 to May 2014. The bacterial identification was performed by Vitek-2® (bioMérieux) and by conventional biochemical tests, followed by confirmation by PCR. The antimicrobial susceptibility testing for thirteen antimicrobials was performed by the disc-diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) to ceftazidime, carbapenems and polymyxins was determined by the broth microdilution method. Antimicrobial susceptibility profiles were interpreted according to M100-S27 (CLSI, 2017) and the resistance classification was determined according to the criteria of Magiorakos (2012). The carbapenemase production was evaluated by the Blue Carba Test (BCT) and the metallo-beta-lactamase (MBL) production was determined by the Triple Disc Synergy Test (TSDT). The presence of beta-lactamases, carbapenemases, Qnr, 16S rRNA methyltransferases encoding genes and integrases were investigated by standard or multiplex PCR followed by sequencing. The virulence factors produced by *P. aeruginosa* were detected among the carbapenemase-producing isolates using phenotypic tests. In addition, the biofilm formation capacity was evaluated on polystyrene microplates and the virulence factors encoding genes were screened by PCR. The clonality of the carbapenemase-producing isolates was evaluated by ERIC-PCR and the Sequence Type (ST) of five randomly selected isolates harboring different carbapenemases genes and distinct clones were determined by Multilocus Sequence Typing (MLST). High rates of carbapenem resistance were observed (80.9% for imipenem and 78.0% for meropenem) and only polymyxins showed 100.0% activity against all isolates of this study. Around 54.7% of the isolates were classified as multi-drug resistant (MDR) and 31.9% as extensively-drug resistant (XDR). The carbapenemases and MBL production were detected in 33.3% and 31.9% of the isolates by BCT and TSDT, respectively. A variety of carbapenemase encoding genes was found among 70 isolates: *bla*<sub>SPM-1</sub> (63/30.0%), *bla*<sub>KPC-2</sub> (3/1.4%), *bla*<sub>IMP-16</sub> (2/0.9%), *bla*<sub>VIM-1</sub> (1/0.4%) and *bla*<sub>VIM-7</sub> (1/0.4%). Beta-lactamase (*bla*<sub>GES-26</sub>, *bla*<sub>OXA-46</sub> e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) and aminoglycoside resistance (*rmtD*) encoding genes were detected. The *bla*<sub>IMP-16</sub> was detected as the only cassette gene of the class I integron in the two IMP-16-producing isolates. The genetic context of *bla*<sub>VIM-1</sub> and *bla*<sub>VIM-7</sub> genes were similar: the MBL encoding gene was the first gene cassette, followed by an aminoglycoside modifying enzyme (*aadA1*), and the *bla*<sub>OXA-46</sub> gene prior to *qacΔE/sulI*. All the carbapenemase-producing isolates formed biofilm and harbored the *lasI* gene, a component of quorum sensing. A total of 98.6% and 94.3% were hemolysin and

protease producers, respectively. The hemolytic phospholipase (*plcH*), elastase (*lasB*), exotoxin A (*toxA*) and exotoxin S (*exoS*) encoding genes were detected in 94.3% of the carbapenemase-producing isolates. Only one and four isolates harbored the genes encoding for neuraminidase (*nanI*) and exotoxin U, respectively. The molecular typing of the carbapenemase-producing isolates showed a high clonal diversity with the presence of 18 distinct genotypes, of which the *bla*<sub>SPM-1</sub> isolates were grouped in 14 genotypes and the isolates harboring the *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>IMP-16</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> and *bla*<sub>VIM-7</sub> were assigned as single clones. Different STs were obtained for the five isolates submitted to the MLST and among these two were related to resistance determinants spread: the *bla*<sub>SPM-1</sub>-harboring isolate belonged to ST277, related to the dissemination of SPM-1 in Brazil and the *bla*<sub>KPC-2</sub>-harboring isolate to ST235, an important worldwide epidemic clone. **Scientific article 2:** This study reported the first description of a VIM-7-producing *P. aeruginosa* isolate in Brazil. The isolate was recovered in May 2013 from a tracheal secretion (10<sup>7</sup> CFU/mL) of a patient hospitalized in HU. The isolate was resistant to all antimicrobials, with the exception of polymyxins. The production of carbapenemases was evaluated by BCT and MBL by TDST. The *bla*<sub>VIM-7</sub> was located on a 52 Kb plasmid, and was the first cassette gene of a class I integron followed by an *aadA1* gene. The *bla*<sub>OXA-46</sub> was located prior to *qacΔE/sulI*. The isolate belonged to ST1284, was a strong biofilm producer and presented the *lasI*, *lasB*, *plcH*, *toxA* and *exoS* encoding genes. **Scientific article 3:** The article reported the presence of a KPC-2-producing *P. aeruginosa* isolate belonging to ST235 in 2008, prior to the first *bla*<sub>KPC</sub> gene detection in Brazil and an outbreak of Enterobacteria harboring the *bla*<sub>KPC</sub> in HU. This isolate was recovered from the urine of a patient hospitalized in HU. The isolate was classified as XDR and showed susceptibility only to polymyxins. The carbapenemase production was detected by the BCT and the negative result in the TSST characterized a non-MBL carbapenemase. The *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was flanked upstream by the IS*Kpn6* insertion sequence; however, no IS*Kpn7* and IS*Kpn8* were detected downstream. The isolate was considered hypervirulent, a strong biofilm producing. The isolate produced hemolysin and protease and harbored the *lasI*, *lasB*, *plcH*, *toxA*, *exoY* and *exoU* genes. **Conclusions:** High antimicrobial resistance rates, diversity of carbapenemase encoding genes, production of important virulence factors, and detection of STs related to national and global epidemic clones reflect the problem of antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* in the HU. Thus, the study emphasizes the need for strict infection control measures and effective programs for the rational use of antimicrobials in this hospital.

**Keywords:** Carbapenemases. High-risk clones. Metallo-beta-lactamases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Características molecular e funcional dos principais grupos de beta-lactamases (Adaptação de Bush, 2013). Cf: cefalosporinas; Esc: cefalosporinas de espectro estendido; Pn: penicilinas; M: monobactâmico; Cb: carbapenêmicos; CA: ácido clavulânico; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético .....40
- Figura 2** - Contexto genético do gene *bla*<sub>SPM-1</sub>. O gene codificador da enzima SPM-1 encontra-se flanqueado por duas cópias de elementos ISCR-4 .....49
- Figura 3** - Diagrama esquemático das regiões variáveis de integrons de classe I. Os genes cassetes codificadores de resistência aos beta-lactâmicos (*bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>VIM-6</sub> e *bla*<sub>OXA-10</sub>), aminoglicosídeos (*aacA29a*, *aacA29b*, *aacA7*, *aacA5*, *aacA4*, *aadB*), trimetopim (*dfxB5*) e rifampicina (*arr2*) estão indicados pelas setas brancas. As regiões conservadas 5'-CS (*intl*) e 3'-C (*qacΔE/sulI*) comumente detectadas em integrons de classe I estão representadas em V e VI.....56
- Figura 4** - Representação esquemática da regulação de genes que contribuem para a resistência à colistina em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Cinco sistemas de dois componentes são envolvidos na resistência às polimixinas, dois deles são ativados em exposição ao agente antimicrobiano (ParRS e CprRS), os demais (ColRS, PhoPQ e PmrAB) são ativados por alterações ambientais. A ativação destes sistemas leva ao aumento da expressão do operon *arnBCADTEF-ugd*, produzindo L-Ara4N. Além disso, há o aumento de sistemas de efluxo (*mexXY*), concomitantemente com a diminuição da expressão de *oprD* .....60
- Figura 5** - Sistemas de secreção e fatores de virulência secretados em *P. aeruginosa*.....71
- Figura 6** - Diferenças na expressão de fatores de virulência nas fases agudas e crônicas da infecção. Na fase aguda, as células planctônicas secretam grande quantidade de exoproteínas que causam danos no tecido hospedeiro pelos sistemas de secreção

do tipo 1, 2 e 3 (T1SS, T2SS e T3SS). Na fase crônica, há a formação do biofilme e predomínio do sistema de secreção do tipo 6 (T6SS), que favorece a produção do exopolissacarídeo Psl .....72

**Artigo 1**

**Figure 1** - Dendogram of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates .....155

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classes e agentes antimicrobianos usados para definir <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR, ER e PR segundo os critérios propostos por MAGIORAKOS et al., 2012 .....	30
<b>Tabela 2</b> - Clones associados e países de isolamento de variantes de IMP.....	44
<b>Tabela 3</b> - Variantes de VIM encontradas em isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	46
<b>Tabela 4</b> - Estudos que apresentam taxas de isolamento de SPM-1 em diferentes estados brasileiros.....	47
 <b>Artigo 1</b>	
<b>Table 1</b> - Demographic and clinical characteristics of patients infected by ceftazidime / carbapenem non-susceptible <i>P. aeruginosa</i> .....	150
<b>Table 2</b> - Antibiotic resistance patterns of the studied isolates .....	151
<b>Table 3</b> - Clinical characteristics, clonal relationship, virulence and resistance features of five carbapenemase-producing <i>P. aeruginosa</i> isolates .....	152
<b>Table 4</b> - Production of virulence factors by carbapenemases-producing <i>P. aeruginosa</i> isolates .....	153
<b>Table 5</b> - Prevalence of virulence genes in the carbapenemase-producing <i>P. aeruginosa</i> isolates .....	154
 <b>Artigo 3</b>	
<b>Table 1</b> - Clinical and microbiological data of KPC-2-producing <i>P. aeruginosa</i> ST235, isolate Pa1461 .....	165

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
AER	<i>Aeromonas</i>
BEL	<i>Belgium extended-spectrum beta-lactamase</i>
BGN	Bacilo Gram negativo
BGNNF	Bacilo Gram-negativo não fermentador
CARB	<i>Carbenicillin resistance</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFU	Colony forming unit
CHDL	<i>Carbapenem-hydrolyzing class D <math>\beta</math>-lactamase</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CTX	<i>Cefotaxime Munich</i>
CRISPR-Cas	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desorribonucleico)
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etileno-diamino-tetracético)
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substance</i> (Substância Polimérica Extracelular)
ER	Extensivamente resistente aos antimicrobianos
ERIC - PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
ESBL	<i>Extended spectrum beta-lactamase</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration of United States</i>
FIM	<i>Florence imipenemase</i>
GES	<i>Guiana extended spectrum</i>
GIM	<i>Germany imipenemase</i>
HMB	<i>Hamburg metallo-beta-lactamase</i>
HU	Hospital Universitário de Londrina
IH	Infecções hospitalares

IMP	<i>Imipenemase</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LPS	lipossacarídeo
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
Mbp	Mega pares de base para DNA
MBL	metalo-beta-lactamase
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MR	Multirresistente aos antimicrobianos
NDM	<i>New-Delhi metallo-beta-lactamase</i>
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
Pb	pares de base para DNA
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i> (Proteína ligadora de penicilina)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PER	<i>Pseudomonas extended resistant</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
PME	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ESBL
PSE	<i>Pseudomonas specific enzyme</i>
PR	Pan-resistente aos antimicrobianos
OMS	Organização mundial da saúde
OXA	Oxacilinase
QS	<i>Quorum sensing</i>
RA	Resistência antimicrobiana
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
rDNA	Ribossomal DNA
RND	<i>Resistance-Nodulation-Division</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis</i>
SCOPE	<i>Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl-sulphate</i> (Dodecil-sulfato de sódio)

SHV	<i>Sulphydryl-variable beta-lactamase</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
SPM	<i>São Paulo metallo-beta-lactamase</i>
ST	<i>Sequence type</i>
TEM	<i>Temoniera beta-lactamase</i>
T3SS	<i>Type III Secretion System</i>
UTI	Unidade de tratamento intensivo
VEB	<i>Vietnam Extended-Spectrum beta-lactamase</i>
VIM	<i>Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase</i>
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
2.1	Objetivo Geral .....	23
2.2	Objetivos Específicos .....	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
<b>3.1</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	24
3.1.1	Características Morfo-fisiológicas Gerais .....	24
3.1.2	Importância Clínica e Tipos de Infecções Causadas por <i>P. aeruginosa</i> .....	26
<b>3.2</b>	<b>RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>P. aeruginosa</i></b> .....	29
3.2.1	Definições Relacionadas à Resistência .....	29
3.2.2	Impacto Clínico da Resistência aos Antimicrobianos .....	31
3.2.3	Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos em <i>P. aeruginosa</i> .....	33
3.2.3.1	Alterações na permeabilidade da membrana .....	34
3.2.3.2	<i>Hiperprodução dos sistemas de efluxo</i> .....	35
3.2.3.3	<i>Alteração ou modificação do alvo</i> .....	37
3.2.3.3.1	<i>Alterações de PBPs</i> .....	37
3.2.3.4	<i>Produção de enzimas hidrolisadoras</i> .....	38
3.2.4	<i>Resistência Aos Beta-lactâmicos e Produção de Beta-lactamases</i> .....	38
3.2.4.1	<i>Beta-lactamases da Classe A de Ambler</i> .....	41
3.2.4.2	<i>Beta-lactamases da Classe B de Ambler da subclasse B1: metalo-beta lactamases</i> .....	43
3.2.4.2.1	<i>Metallo-beta-lactamase da subclasse IMP</i> .....	43
3.2.4.2.2	<i>Metallo-beta-lactamase da subclasse VIM</i> .....	45
3.2.4.2.3	<i>Metallo-beta-lactamase da subclasse SPM</i> .....	47
3.2.4.2.4	<i>Metallo-beta-lactamase da subclasse NDM</i> .....	50
3.2.4.2.5	<i>Metallo-beta-lactamase da subclasse GIM</i> .....	50

3.2.4.2.6	<i>Metallo-beta-lactamase da subclasse FIM</i> .....	51
3.2.4.2.7	<i>Metallo-beta-lactamase da subclasse HMB</i> .....	51
3.2.4.3	Beta-lactamases da Classe C de Ambler: AmpC ou cefalosporinases cromossomais .....	52
3.2.4.4	Beta-lactamases da Classe D de Ambler .....	53
3.2.4.5	Resistência aos carbapenêmicos .....	54
3.2.5	Resistência aos Aminoglicosídeos .....	57
3.2.6	Resistência às Fluoroquinolonas.....	58
3.2.7	Resistência às Polimixinas .....	59
<b>3.3</b>	<b>Fatores de virulência produzidos por <i>P. aeruginosa</i></b> .....	<b>61</b>
3.3.1	<i>Quorum sensing</i> .....	64
3.3.2	Fatores de Virulência Secretados .....	66
3.3.2.1	Pigmentos piocianina e pioverdina.....	66
3.3.2.2	Sistemas de secreção de proteínas .....	66
3.3.3	Adesão e Formação de Biofilme .....	71
<b>3.4</b>	<b>Tipagem Molecular em <i>P. aeruginosa</i></b> .....	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>78</b>
	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>123</b>
	<b>Artigo 1</b> .....	<b>124</b>
	<b>Artigo 2</b> .....	<b>156</b>
	<b>Artigo 3</b> .....	<b>160</b>
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>166</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos (RA) é um fenômeno biológico natural observado desde a descoberta dos antimicrobianos. Embora no início do século XX tenha sido um problema gerenciável com o desenvolvimento de novos antimicrobianos, na atualidade é considerado um problema de saúde pública mundial devido à emergência e disseminação da mesma em todos os continentes (WHO, 2014).

A dificuldade de tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes associada ao decréscimo no desenvolvimento de novos antimicrobianos reflete a magnitude do problema da RA, reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 como o principal problema de saúde pública do século XXI. De acordo com o relatório *Review on Antimicrobial Resistance - Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis For the Health and Wealth of Nations*, publicado em dezembro de 2014, setecentas mil mortes anuais são atribuídas às infecções causadas por patógenos resistentes aos antimicrobianos. No entanto, estimou-se neste estudo que, se a RA não for efetivamente controlada esta taxa poderá atingir dez milhões de mortes em 2050, superando o número de óbitos atribuídos ao câncer, doenças diarreicas e cardíacas (WHO, 2014, O'NEILL, 2014; 2016).

As infecções hospitalares (IH) são as principais causas de mortalidade e morbidade dos pacientes, afetando milhões de pacientes em todo o mundo a cada ano. Segundo a OMS, de cada cem indivíduos hospitalizados, sete pacientes de países desenvolvidos e dez de países em desenvolvimento adquirirão infecções associadas a instituições de cuidados à saúde (WHO, 2014; ZHU et al., 2016).

Com base nos dados publicados pelo Programa SENTRY de vigilância de resistência aos antimicrobianos (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*), *Pseudomonas aeruginosa* é o terceiro patógeno mais frequentemente isolado no ambiente hospitalar (SADER et al., 2014). Dados do programa SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) relacionam *P. aeruginosa* como o quinto patógeno causador de infecções sanguíneas e a terceira espécie dentre os bacilos Gram negativos (BGN) causadores destas infecções (MARRA et al., 2011; CAMARGO et al., 2015).

*P. aeruginosa* está associada a infecções em pacientes imunocomprometidos, que fazem uso de dispositivos invasivos e/ou submetidos ao uso de antimicrobianos de amplo espectro (ZHU et al., 2016). Este microrganismo é o principal BGN causador de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV) em pacientes hospitalizados (SADER et al., 2014; GUPTA et al., 2017), e está, também, associado a infecções em queimaduras e feridas, pneumonias comunitárias, bacteremias, infecções do trato urinário, foliculites, queratinites, endoftalmites, otites, osteomielites e meningites (OLIVER et al., 2015; FAN et al., 2016).

O genoma de *P. aeruginosa* é composto por aproximadamente 6,2 a 7 mega pares de bases (Mpb) (NASCIMENTO et al., 2016), e apresenta genes que contribuem para a alta diversidade metabólica, um grande repertório de determinantes de virulência e um arsenal de resistência intrínseca e adquirida a diferentes classes de antimicrobianos (WINSOR et al., 2011; BREIDENSTEIN et al., 2011; GELLATLY; HANCOCK, 2013; NASCIMENTO et al., 2016). A associação desses fatores leva a uma vasta versatilidade e adaptabilidade deste microrganismo, o que contribui para a patogênese e dificulta o tratamento de infecções causadas por isolados multirresistentes (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Os carbapenêmicos são beta-lactâmicos amplamente utilizados no tratamento das infecções causadas por isolados multirresistentes de *P. aeruginosa*. No entanto, verifica-se um aumento crescente das taxas de resistência a estes fármacos com importantes mecanismos de resistência detectados nas últimas décadas (LIAKOPOULOS et al., 2013, HONG et al., 2015).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* está relacionada a eventos mutacionais que resultam em perda ou modificações de porinas da membrana externa, com consequente impermeabilidade a estes fármacos, ou à hiperprodução de sistemas de efluxo. Adicionalmente, este microrganismo pode adquirir genes que codificam beta-lactamases inativadoras dos carbapenêmicos, denominadas carbapenemases (CHAVES et al., 2017; ROSTAMI et al., 2017; GOLLE et al., 2017).

A produção de carbapenemases é um importante e preocupante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos uma vez que estas enzimas podem inativar praticamente todas as classes de beta-lactâmicos disponíveis, inviabilizando o uso terapêutico destes fármacos no tratamento de infecções por este

microrganismo. Além disso, estas enzimas são codificadas por genes que podem ser transferidos lateralmente e estão frequentemente associadas a determinantes de resistência de outras classes de antimicrobianos (MELETIS et al., 2016; PAPAGIANNITSIS et al., 2017).

As beta-lactamases são categorizadas em quatro classes segundo a classificação de Ambler (AMBLER, 1980). Dentre as serino beta-lactamases da classe A, variantes de GES (*Guiana extended spectrum*) e KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) apresentam atividade de carbapenemases enquanto OXA-40 e OXA-198 são carbapenemases da classe D detectadas em *P. aeruginosa*. As principais carbapenemases detectadas em *P. aeruginosa* pertencem ao grupo B de Ambler, denominadas metalo-beta-lactamases (MBL) e compreendem enzimas das famílias: IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*), SPM (*São Paulo metallo-beta-lactamase*), GIM (*Germany imipenemase*), FIM (*Florence imipenemase*), NDM (*New-Delhi metallo-beta-lactamase*) e HMB (*Hamburg metallo-beta-lactamase*) sendo a SPM-1 a MBL mais frequente no Brasil (POTRON et al., 2015; HONG et al., 2015).

O aumento no número de isolados de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemases muitas vezes tem levado a impossibilidade do uso de carbapenêmicos na terapia, gerando, por consequência, infecções praticamente intratáveis (MELETIS, 2016). Nestes casos, como última alternativa, tem-se retomado o uso das polimixinas, que apresentam nefrotoxicidade e neurotoxicidade (NORDMANN; POIREL, 2016).

Além de importantes determinantes de resistência, isolados de *P. aeruginosa* apresentam diversos fatores de virulência, dos quais a produção de fatores secretórios (proteases, fosfolipases, citotoxinas) e a capacidade de formação de biofilme se destacam. Desta forma, no hospedeiro, os isolados podem aderir aos tecidos, promover a supressão do sistema imunológico, lesão tecidual e, conseqüente, morte celular (BALASUBRAMANIAN et al., 2013; REINHART; OGLESBY-SHERROUSE, 2016).

A estrutura populacional de *P. aeruginosa* não é clonal, entretanto, grande número de infecções está relacionado a clones epidêmicos considerados hipervirulentos e que apresentam resistência a múltiplos antimicrobianos. Os principais clones epidêmicos mundiais de *P. aeruginosa* pertencem aos ST111, ST175 e ST235. O ST 235 é responsável pela disseminação de mais de cem

determinantes de resistência e, também, associado a um pior desfecho clínico dos pacientes. No Brasil, a disseminação da MBL mais frequentemente detectada, SPM-1 está associada ao ST277 (OLIVER et al., 2015).

Elevadas taxas de resistência aos carbapenêmicos, 43,2% para imipenem e 41,9% para meropenem, têm sido verificadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* no Hospital Universitário de Londrina (HU) nos últimos cinco anos. Estas taxas preocupantes ilustram bem a problemática do tratamento das infecções causadas por estes microrganismos no HU e explicam a necessidade da utilização de fármacos como as polimixinas.

O monitoramento de isolados produtores de carbapenemases vem sendo realizado no HU desde o ano de 2002 quando Gales e colaboradores (2003) descreveram, pela primeira vez, isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 pertencentes ao clone epidêmico brasileiro SP. Desde então, pesquisas constantes foram desenvolvidas para detectar a presença de MBL e de outras carbapenemases em isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados no laboratório de Microbiologia Clínica do HU.

Em um estudo, entre os anos de 2003 e 2005, verificou-se que 33,3% dos isolados de *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos e/ou ceftazidima foram produtores de MBL, dos quais, 96,0% apresentaram o gene *bla*<sub>SPM-1</sub> (CARRARA-MARRONI, 2009). Além disso, também foi detectada a emergência de *bla*<sub>IMP-16</sub> em dois isolados de *P. aeruginosa* sensíveis ao meropenem, o que poderia representar um risco de disseminação silenciosa deste gene (PICÃO et al, 2012).

Após um surto de infecção causada por Enterobactérias produtoras de KPC em 2009, passou-se a monitorar a presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> em isolados de *P. aeruginosa*. Em 2010, isolados clínicos de *P. aeruginosa* carreadores de *bla*<sub>KPC-2</sub> e associados a infecções letais foram detectados (CARRARA-MARRONI et al, 2015). A partir de então, fez-se necessário determinar a prevalência destes determinantes de resistência entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* do HU nos últimos anos e continuar com a vigilância para detecção destes ou de novos genes codificadores de carbapenemases entre esses isolados.

Desta forma, a caracterização de isolados de *P. aeruginosa* produtores de determinantes de resistência aos carbapenêmicos é de grande importância, bem como, monitorar a presença de clones epidêmicos se faz

necessário. Estas informações podem auxiliar o Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do HU na correta implementação de medidas de controle de infecção por *P. aeruginosa* multirresistentes e no estabelecimento seguro de protocolos de terapias adequadas dos antimicrobianos, visando assim a melhoria, de forma indireta, no tratamento médico aos pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar, por métodos fenotípicos e moleculares, os principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e colistina mediados por transferência lateral de genes e de fatores de virulência em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Confirmar a identificação fenotípica dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* por método molecular.
- Estabelecer o perfil de sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados na terapia das infecções causadas por *P. aeruginosa*.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem), ceftazidima, polimixina B e colistina entre os isolados produtores de carbapenemases.
- Avaliar a produção de carbapenemases entre os isolados de *P. aeruginosa*.
- Pesquisar a presença de genes relacionados à resistência aos beta-lactâmicos, carbapenêmicos, quinolonas e colistina associados à transferência lateral de genes.
- Pesquisar a presença de integrases.
- Identificar o contexto genético dos genes codificadores de carbapenemases detectados.
- Estabelecer a relação clonal entre os isolados produtores de carbapenemase.
- Avaliar a produção de fatores de virulência por isolados produtores de carbapenemases.
- Detectar genes codificadores de fatores de virulência nos isolados produtores de carbapenemases.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

##### 3.1.1 Características Morfo-fisiológicas Gerais

O gênero *Pseudomonas* pertence à família Pseudomonaceae e inclui aproximadamente 200 espécies, das quais *P. aeruginosa* é a mais importante. *P. aeruginosa* é amplamente disseminada no solo, na vegetação, na matéria orgânica em decomposição, em ambientes aquáticos e em animais (KLOCKGETHER; TÜMMLER, 2017). A capacidade de persistir em diferentes *habitats* é devido a sua notável versatilidade metabólica que apresenta, em conjunto com seus sistemas regulatórios adaptativos e resistência intrínseca aos antimicrobianos (HUBER et al., 2016). O grande genoma deste microrganismo é composto por aproximadamente 5549 genes distribuídos em 6,2 a 7 Mpb de DNA e pode ter genes adicionados pela aquisição de elementos genéticos por transferência horizontal (YAN; WU et al., 2017; MELETIS; BAGKERI, 2014; NASCIMENTO et al., 2016).

*P. aeruginosa* é um microrganismo reto ou ligeiramente curvado medindo em torno de 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm, podendo ocorrer como bactéria isolada ou em cadeias curtas, entretanto, é tipicamente disposto em pares. Este microrganismo apresenta um flagelo polar monotríqueo (CORNELIS, 2008; BROOKS et al., 2014; MURRAY et al., 2017).

O metabolismo energético ocorre pela oxidação de carboidratos, sendo considerado aeróbio estrito, entretanto, em condições de baixa concentração ou ausência de oxigênio, nitrato ou arginina podem ser utilizados como aceptores de elétrons. Por não ser capaz de utilizar glicose na fermentação é conhecido como um Bacilo Gram-Negativo Não Fermentador (BGNNF). Esta espécie é capaz de utilizar muitos compostos orgânicos de baixo peso molecular como fontes de carbono e nitrogênio e, assim, apresenta necessidades nutricionais simples, crescendo facilmente em muitos tipos de meios de cultura ou até mesmo em água destilada (CORNELIS, 2008; BROOKS et al., 2014; MURRAY et al., 2017).

Quatro pigmentos difusíveis importantes são produzidos por *P. aeruginosa*: piocianina, pioverdina, piomelanina e piorrubina, sendo os dois

primeiros mais frequentemente detectados, conferindo uma coloração azulada e amarelo-esverdeado, respectivamente. Quando estes dois pigmentos são produzidos em conjunto observa-se colônias verde-metálicas. Os pigmentos piomelanina e piorrubina são sintetizados por aproximadamente 2,0% dos isolados e são responsáveis pela cor marrom/preta e vermelha das colônias, respectivamente (CORNELIS, 2008; BROOKS et al., 2014; MURRAY et al., 2017).

Em meios de cultura solidificados, *P. aeruginosa* pode formar três tipos de colônias principais: a morfologia mais comum é composta por colônias grandes, lisas, ovaladas, com bordas planas e centro elevado, esverdeadas com pigmento (brilho) metálico quando geralmente são provenientes de materiais clínicos; colônias pequenas, rugosas e convexas são observadas em isolados ambientais; colônias mucoides são formadas devido à abundância de alginato (um polissacarídeo capsular) e são observadas em isolados provenientes do trato respiratório e urinário (CORNELIS, 2008; BROOKS et al., 2014; MURRAY et al., 2017).

Por ser mesofílico, *P. aeruginosa* apresenta ótimo crescimento a 37°C, no entanto, apresenta a habilidade de crescimento à temperatura de 42°C, a qual é uma característica diferencial de outras espécies do grupo fluorescente (produtoras de pioverdina) do gênero *Pseudomonas*, como *P. fluorescens* e *P. putida* (BROOKS et al., 2014; MURRAY et al., 2017).

A identificação fenotípica das espécies do gênero *Pseudomonas* é realizada levando-se em conta a morfologia das colônias, produção de pigmentos característicos, reação da oxidase positiva e testes bioquímicos utilizando um conjunto complexo de substratos. A necessidade de cultura pura, o tempo de incubação de 24-48 horas e a existência de espécies muito relacionadas dificultam a identificação das mesmas por meio de testes bioquímicos e sistemas automatizados (GHOLAMI et al., 2016, LEE et al., 2017).

Desta forma, metodologias que não dependam do crescimento bacteriano são importantes ferramentas para a identificação bacteriana. O MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry*), que se baseia na espectrometria de massa, é cada vez mais aceito pela Microbiologia Clínica e está substituindo a identificação fenotípica, principalmente por sua acurácia e menor tempo para obtenção dos resultados (PASTERNAK, 2012; CHARRETIER; SCHRENZEL, 2016; LEE et al., 2017).

Uma identificação rápida e confiável de espécies do gênero *Pseudomonas* tem sido realizada por metodologias moleculares como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) convencional ou em tempo real baseados na amplificação de genes conservados em *P. aeruginosa* como os que codificam a lipoproteína *OprL* ou em regiões conservadas do 16S rDNA (JAMI AL-AHMADI; ZAHMATKESH ROODSARI, 2016). Atualmente, estudos do genoma total dos isolados, além de permitir a identificação bacteriana, fornecem informações a respeito de genes de resistência (TALWALKARR; MURRAY, 2016). Ferramentas rápidas de identificação são extremamente importantes para direcionar o tratamento, diminuir o tempo de hospitalização e conseqüentemente, diminuir a mortalidade dos pacientes infectados por *P. aeruginosa* (JAMI AL-AHMADI; ZAHMATKESH ROODSARI, 2016).

### 3.1.2 Importância Clínica e Tipos de Infecções Causadas por *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* apresenta extraordinária habilidade para se desenvolver em uma grande variedade de nichos ecológicos, e pode, também, colonizar áreas úmidas do corpo humano, como orelhas, nariz, axilas, mucosa da garganta e intestino. Entretanto, a prevalência de colonização em indivíduos saudáveis é muito baixa (RUIZ-GARBAJOSA; CANTÓN, 2017; SAFAEI et al., 2017).

Infecções por este patógeno acometem principalmente indivíduos imunossuprimidos, neutropênicos, diabéticos, vítimas de queimaduras e feridas, pacientes com fibrose cística, prematuros, em uso de dispositivos invasivos e/ou submetidos ao uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro (SHI et al., 2013; GELLATLY; HANCOCK, 2013; JAPONI et al., 2014; ANVARINEJAD et al., 2015; CORREA et al., 2015; SERRA et al., 2015; ARIVETT et al., 2016; ZHU et al., 2016; KARIMINIK et al., 2017; DE SILVA et al., 2017).

Uma grande variedade de infecções pode ser causada por este microrganismo como: pneumonia, bacteremia, infecções do trato urinário, meningites, otites, osteomielites, infecções cutâneas e de tecidos moles (THOMSON; BONOMO, 2005; POLOTTO et al., 2012; JAPONI et al., 2014; POBIEGA et al., 2015, GELLATLY; HANCOCK, 2013; ANVARINEJAD et al., 2015; OLIVER et al., 2015; CORREA et al., 2015; KARIMINIK et al., 2017).

Segundo Sader e colaboradores (2014), *P. aeruginosa* é o terceiro patógeno mais frequentemente isolado no ambiente hospitalar nos Estados Unidos (EUA) e na Europa. Em geral, estas infecções resultam em período prolongado de hospitalização, altos custos (€7,0 bilhões na Europa, US\$6,5 bilhões nos EUA e valores maiores nos países em desenvolvimento) e geralmente estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade (ZIMLICHMAN 2013; OLIVER et al., 2015; CAI et al., 2017; CHEN et al., 2017). Nos EUA, estima-se que infecções por *P. aeruginosa* sejam responsáveis por 51 mil mortes por ano (CDC, 2016).

De acordo com levantamento realizado em hospitais europeus, do total de infecções associadas à assistência a saúde, 9,0% foram causadas por *P. aeruginosa*. Alta prevalência de infecções hospitalares causadas por esta bactéria também foi observada na China (9,4%), EUA (7,1%) e Espanha (10,5%) (MAGILL et al., 2014; 2016; CHEN et al., 2016; EPINE-EPPS, 2016; ECDC, 2017). As taxas de infecção aumentam de 10,5% para 23,0% quando avaliada em unidades de tratamento intensivo (UTI), sendo considerado um dos cinco agentes etiológicos mais frequentes nestas unidades (MAGILL et al., 2014; ECDC, 2016; MARAOLO et al., 2017). Além disso, *P. aeruginosa* é um dos patógenos hospitalares mais comuns que colonizam e infectam pacientes internados nas UTI, centros de tratamento de queimados e centros de tratamento de fibrose cística (FAN et al., 2016).

*P. aeruginosa* é um dos principais agentes etiológicos de infecções respiratórias; pneumonias, associadas ou não à ventilação mecânica, são as infecções mais comuns, apresentando maior prevalência nas UTI em diferentes regiões do mundo (JEVŠNIK et al., 2012; SADER et al., 2014; LUCENA et al., 2014; ENVIN-UCI 2016; ECDC, 2017; DJORDJEVIC et al., 2017; CAI et al., 2017; GUPTA et al., 2017; FENG et al., 2017). A prevalência de *P. aeruginosa* nestas infecções pode variar de acordo com os estudos e/ou instituições. Em vários hospitais europeus, este foi o patógeno mais frequentemente isolado em episódios de pneumonias adquiridas em UTI, sendo que, na Espanha, *P. aeruginosa* representa quase 21,0% dos episódios de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV) (ENVIN-UCI 2016; ECDC, 2017). Já na Sérvia e Singapura esta bactéria figura como segundo agente mais frequente dessas infecções (CAI et al., 2017; DJORDJEVIC et al., 2017). Entretanto, outros estudos também reportam *P. aeruginosa* como principal bacilo Gram negativo (BGN) causador de PAV em pacientes hospitalizados, inclusive no Brasil (SADER et al., 2014; LUCENA et al., 2014; GUPTA et al., 2017).

*P. aeruginosa* possui significativo papel em infecções urinárias comunitárias e hospitalares que frequentemente estão associadas ao uso de cateteres ou sondas (POBIEGA et al., 2014, LUCENA et al., 2014). Estas infecções podem levar a complicações, como permanente dano do rim e sepse de foco urinário (POBIEGA et al., 2016). *P. aeruginosa* tem sido o segundo BGN mais isolado neste tipo de infecção no continente europeu e asiático (ECDC, 2017; CHEN et al., 2017, CAI et al., 2017). Estudos realizados no Brasil também ressaltam a alta prevalência de infecções urinárias causadas por isolados de *P. aeruginosa* (LUCENA et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2014; PRESTES-CARNEIRO et al., 2015; FOLGORI et al., 2016).

Elevadas taxas de mortalidade (variando de 20,0 a 38,0%) atribuídas às infecções sanguíneas hospitalares causadas por *P. aeruginosa* tem sido reportadas (SUÁREZ et al., 2010; VUOTTO et al., 2013; FOLGORI et al., 2016). Em UTI de hospitais europeus e asiáticos, *P. aeruginosa* foi o terceiro BGN mais isolado de bacteremias (ECDC, 2017; CAI et al., 2017). De acordo com os dados do programa SCOPE, no Brasil *P. aeruginosa* é o quinto maior patógeno causador de infecções sanguíneas, sendo a terceira principal espécie dentre os BGN (MARRA et al., 2011; CAMARGO et al., 2015). Segundo trabalho realizado com crianças com câncer no Brasil, *P. aeruginosa* configurou como o principal BGN responsável por bacteremias, sendo menos prevalente apenas em relação à *Staphylococcus coagulase-negativo* e *Staphylococcus aureus* (CARLESSE et al., 2016).

*P. aeruginosa* é um importante microrganismo envolvido com infecções em pacientes queimados, muitas vezes considerado o BGN mais frequentemente isolado (RADAN et al., 2016; DE ALMEIDA SILVA et al., 2017; KHOSRAVI et al., 2017). Estas infecções muitas vezes se desenvolvem rapidamente e levam à disseminação sistêmica e à morte em dias ou semanas (TURNER et al., 2014).

Este microrganismo também é um importante patógeno em pacientes portadores de fibrose cística: aproximadamente 80,0% dos pacientes portadores desta patologia são infectados por *P. aeruginosa* no início da idade adulta e a maioria deles sucumbe à infecção (PIER et al., 1985; STEFANI et al., 2017). Esta bactéria também é importante agente de infecções em sítios cirúrgicos (CAI et al., 2017) e queratinite infecciosa, neste último caso sendo uma das

principais causas de deficiência visual e cegueira, muitas vezes afetando populações marginalizadas (AUSTIN et al., 2017).

### **3.2. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *P. aeruginosa***

#### 3.2.1 Definições Relacionadas à Resistência

*P. aeruginosa* é dividida em diferentes fenótipos baseados no padrão de resistência aos antimicrobianos. Desta forma, na literatura médica são encontradas muitas definições diferentes para descrever os padrões de resistência em isolados responsáveis por infecções associadas à assistência a saúde. Os termos mais comumente descritos são: bactérias multirresistentes, extensivamente-resistentes e pan-resistentes (MAGIORAKOS et al., 2012).

Diante desta diversidade, pesquisadores do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) participaram de três grandes encontros, entre os anos de 2008 a 2010, a fim de discutir estes perfis de resistência e as definições utilizadas. Esta iniciativa possibilitou o estabelecimento de um documento internacional para a padronização da terminologia relacionada aos perfis de resistência de diversas espécies comumente encontradas no ambiente hospitalar como *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (MAGIORAKOS et al., 2012).

Neste documento, para cada microrganismo, foi estabelecida uma lista de antimicrobianos para serem utilizados nos testes de sensibilidade e interpretados segundo os critérios vigentes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *United States Food and Drug Administration* (FDA) (MAGIORAKOS et al., 2012).

Para avaliação da resistência em *P. aeruginosa* foram elencados dezessete antimicrobianos pertencentes a oito diferentes classes de antimicrobianos (Tabela 1). Segundo esta padronização, um isolado de *P. aeruginosa* é definido como multirresistente (MR) aos antimicrobianos quando não apresentar sensibilidade a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos. Isolados não sensíveis a pelo menos um agente em todas as

categorias de antimicrobianos com exceção de duas classes, ou seja, se os isolados bacterianos permanecerem sensíveis a uma ou duas categorias estes serão considerados extensivamente resistentes aos antimicrobianos (ER). Pan-resistência (PR) aos antimicrobianos foi definida como não sensibilidade a todos os agentes antimicrobianos, em todas as classes (MAGIORAKOS et al., 2012).

**Tabela 1:** Classes e agentes antimicrobianos usados para definir *Pseudomonas aeruginosa* MR, ER e PR segundo os critérios propostos por MAGIORAKOS et al., 2012.

<b>Classe de Antimicrobianos</b>	<b>Agente antimicrobiano</b>
Aminoglicosídeos	Gentamicina
	Tobramicina
	Amicacina
	Netilmicina
Carbapenênicos	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Cefalosporinas	Ceftazima
	Cefepime
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina
	Levofloxacina
Penicilina + inibidor de beta-lactamase	Ticarcilina + ácido clavulânico
	Piperacilina + tazobactam
Monobactâmico	Aztreonam
Ácido fosfônico	Fosfomicina
Polimixinas	Colistina
	Polimixina B

Critérios para definir *P. aeruginosa* MR, ER e PR: MR: não sensível a  $\geq 1$  antimicrobiano em  $\geq 3$  classes; ER: não sensível a  $\geq 1$  antimicrobiano em todas as classes, exceto 2; PR: não sensível a todos os antimicrobianos listados.

### 3.2.2 Impacto Clínico da Resistência aos Antimicrobianos

A resistência intrínseca e a notável capacidade de *P. aeruginosa* em adquirir genes que codificam resistência são responsáveis pela múltipla resistência a diferentes classes de antimicrobianos como consequência da forte pressão que seleciona fenótipos adaptados a condições específicas do hospedeiro e do ambiente hospitalar (CIOFU et al., 2015; RADAN et al., 2016; RUIZ-GARBAJOSA; CANTÓN, 2017; KAISER et al., 2017; WALKTY et al., 2017).

O aumento da prevalência de infecções hospitalares por *P. aeruginosa* MR e ER é um problema mundial e compromete severamente o tratamento das mesmas, conduzindo a desfechos clínicos adversos incluindo o aumento da mortalidade dos pacientes (PEÑA et al., 2013; PEREIRA et al., 2015).

Sabe-se que as taxas de resistência de *P. aeruginosa* variam entre regiões geográficas e até mesmo entre instituições da mesma região. Em estudo de vigilância de hospitais europeus, os perfis MR e ER foram detectados em 15,0% e 5,0% dos isolados, respectivamente (YUSUF et al., 2017). Entretanto, em um hospital português observou-se taxa superior de isolados MR (39,9%) e menor de isolados ER (2,9%) (PEREIRA et al., 2015). Assim, importantes variações têm sido descritas nos diferentes países europeus, com maiores taxas de resistência no sul e países do leste em comparação com países do norte europeu (ECDC, 2017).

Dados atuais de vigilância de hospitais canadenses relataram que 14,5% e 2,6% dos isolados de *P. aeruginosa* foram considerados MR e ER, respectivamente. A maioria dos isolados (>75,0%) apresentou sensibilidade a colistina, amicacina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, gentamicina, meropenem e ciprofloxacina (WALKTY et al., 2017). Segundo Walkty e colaboradores (2017), no Canadá, a resistência aos antimicrobianos tem se mantido estável ou tem sido observada uma leve queda nas taxas de resistência dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Nos hospitais americanos, ao avaliar isolados recuperados entre 2012 a 2015, foi observada uma frequência de isolados MR entre 13,0 a 15,4% e ER 9,4%. Apesar das variações locais, estes valores estão aumentando consideravelmente nos EUA (CDC, 2016; SADER et al., 2017).

Aproximadamente 27,0% de *P. aeruginosa* isoladas na América Latina são MR (VEGA; DOWZICHY, 2017). Especificamente em pacientes com bacteremias foi observada uma prevalência de 42,7% e 22,3% de isolados MR e ER,

respectivamente (DANTAS et al., 2017). Notadamente, nesta região foram observadas maiores taxas de resistência em relação aos demais continentes, inclusive em relação aos isolados recuperados nos EUA (FEHLBERG et al., 2012; GALES et al., 2012).

Os carbapenêmicos são os antimicrobianos mais comumente utilizados no tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa*. No entanto, a disseminação da resistência a estes fármacos compromete sua eficácia e, conseqüentemente, associa-se ao aumento das taxas de mortalidade (LIU et al., 2015). Isolados clínicos de *P. aeruginosa* são mais resistentes aos carbapenêmicos do que *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (IRONMONGER et al., 2015) e estas taxas têm sido ainda maiores nos isolados recuperados de pacientes hospitalizados nas UTI (taxas de resistência entre 18,9-20,9% em não-UTI e de 28,4-33,0% nas UTI) (SADER et al., 2014).

Em um estudo realizado com mais de oito mil amostras provenientes de 40 países de diferentes regiões geográficas (Ásia-Pacífico, Europa, América Latina, América do Norte e Oriente Médio) verificou-se que 27,7% dos isolados de *P. aeruginosa* foram resistentes ao meropenem (KAZMIERCZAK et al., 2015). Uma meta análise avaliou 17 estudos, publicados entre 1996 e 2014, incluiu 6660 pacientes atendidos em hospitais de países de diferentes continentes, como Eslováquia, Estados Unidos, Coreia, Espanha, Índia, Brasil e China. As taxas de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* variaram entre 8,7% (USA) a 50,4% (Coreia). Além disso, verificou-se que houve uma tendência global de aumento da resistência ao longo do tempo e que a distribuição se alterou entre as diversas regiões (LIU et al., 2015).

As taxas de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* são maiores em hospitais europeus do que em hospitais americanos (SADER et al., 2014). Na Europa, a resistência aos carbapenêmicos chega a 33,7% e os valores aumentam durante o período de hospitalização (YUSUF et al., 2017). Taxas similares foram descritas no Marrocos (36,8% para imipenem e 27,9% para meropenem) e na China (25% para imipenem e 20,7% para meropenem (MAROUI et al., 2016; FENG et al., 2017). Na Lituânia esses valores aumentam significativamente, onde são encontradas taxas de resistência de 97,3% e 83,6% para imipenem e meropenem, respectivamente (MIKUCIONYTE et al., 2016). Entretanto, diferentemente da maioria dos países, no Japão, as taxas de resistência

aos carbapenêmicos tem se mantido estáveis em torno de 22,0% e 18,9% para imipenem e meropenem, respectivamente (YANAGIHARA et al., 2017).

Em relação à América Latina, reportou-se, em média, 27,6% e 34,7% de isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e meropenem, respectivamente. Além disso, observou-se taxas de resistência ao meropenem na Argentina (53,8%), Brasil (46,7%), Chile (33,3%) e México (28,8%) (GALES et al., 2012). Mais recentemente, nesta mesma região, foram observadas elevadas taxas de resistência ao meropenem (36,9%) e esses valores foram ainda maiores em isolados MR (90,0%) (VEGA; DOWZIKHY, 2017). Outro estudo relatou que 24,9% dos isolados foram resistentes aos carbapenêmicos e essas taxas aumentam ainda mais quando avaliadas amostras de UTI (KARLOWSKY et al., 2017). No Brasil há relatos de taxas de resistência aos carbapenêmicos entre 22,9% e 45,8% (TUON et al., 2012; DANTAS et al., 2014; COSTA et al., 2015; DE ALMEIDA SILVA et al., 2017)

### 3.2.3 Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos em *P. aeruginosa*

A combinação de vários mecanismos de resistência permite que *P. aeruginosa* prolifere em ambientes hospitalares mesmo diante de grande pressão seletiva devido ao uso de antimicrobianos. A multirresistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* geralmente ocorre por meio da combinação de mecanismos que atuam sinergicamente: resistência intrínseca aos agentes antimicrobianos, somada à expressão de um vasto repertório de mecanismos de resistência adquiridos entre microrganismos intra ou interespecies (EL ZOWALATY et al., 2015; CAG et al., 2016; DANTAS et al., 2017).

*P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a diversos antimicrobianos, incluindo as cefalosporinas de primeira e segunda geração, macrolídeos, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, cloranfenicol, rifampicina e tigeciclina. Esta resistência é atribuída à baixa permeabilidade da sua membrana externa juntamente com mecanismos de resistência secundários como expressão de sistemas de efluxo e produção de beta-lactamases, cujos genes localizam-se no cromossomo bacteriano (EL ZOWALATY et al., 2015; GANG; JIE, 2016; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; CAG et al., 2016; XIA et al., 2016).

### 3.2.3.1 Alterações na permeabilidade da membrana

*P. aeruginosa*, como uma bactéria Gram-negativa, apresenta uma membrana citoplasmática constituída por bicamada fosfolipídica e uma membrana externa assimétrica. Esta última apresenta uma face interna composta por fosfolipídeos e face externa por lipossacarídeos (LPS), além de numerosas proteínas, incluindo lipoproteínas e canais hidrofílicos (porinas) (REMANS et al. 2010, LEE et al., 2017).

A membrana externa atua como uma barreira semipermeável, a qual diminui a importação de substratos, inclusive de antibióticos. Entretanto, para sua sobrevivência, este microrganismo precisa permitir a importação de nutrientes (açúcares, aminoácidos) pela membrana externa, e para esta finalidade possui um sistema de canais proteicos preenchidos por água denominado porina (CHEVALIER et al., 2017).

Alguns antimicrobianos hidrofílicos, como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas atravessam a membrana externa utilizando as porinas. Desta forma, modificações e/ou deficiência de porinas são associadas à diminuição da entrada destes agentes e, conseqüentemente, responsáveis pelo aumento da resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* (EL ZOWALATY et al., 2015; XIA et al., 2016; GEISINGER; ISBERG, 2017).

Atualmente, em *P. aeruginosa*, são descritas as porinas OprG, OprH, OprF, OprP, OprO, OprB2, OprD (OccD1), OpdC (OccD2), OpdT (OccD4), OprQ (OccD6), OpdF (OccK2) e OprE (OccK8), que apresentam massa molecular entre 21,6 a 53,0 kDa (CHEVALIER et al., 2017).

A porina mais abundante em *P. aeruginosa* é a OprF, a qual está fortemente envolvida na integridade da parede celular, principalmente por meio da interação com o peptidoglicano e outras proteínas da membrana externa como OprL e OprI. Embora seu papel na difusão de nutrientes ainda esteja em discussão, esta porina está associada à virulência deste patógeno, principalmente relacionada à adesão e reconhecimento de células do hospedeiro (HEMAMALINI; SHARE, 2014; CHEVALIER et al., 2017). Além disso, a ausência de OprF resulta em adesão prejudicada às células animais, secreção de citotoxinas T e S e produção de fatores de virulência regulados por *quorum sensing* como piocianina, elastase e exotoxina A (FITO-BONCOMPTE et al., 2011; CHEVALIER et al., 2017).

A OprD, a segunda proteína mais abundante na membrana externa de *P. aeruginosa*, é bastante estudada pelo seu envolvimento na entrada dos carbapenêmicos (e não de outros beta-lactâmicos), principalmente ao imipenem. A resistência mediada pela porina OprD pode resultar da diminuição da transcrição do gene *oprD* e/ou mutações que produzem porinas modificadas, conferindo resistência principalmente ao imipenem (SHEN et al., 2015; CAI et al., 2016; CHALHOUB et al., 2016; HIRABAYASHI et al., 2017).

A OprH é a menor porina descrita em *P. aeruginosa*, e está intimamente relacionada à estabilidade da membrana externa pela interação direta com o LPS. O gene codificador desta porina (*oprH*) forma um operon com *phoP-phoQ*, um sistema de dois componentes que é induzido quando ocorre restrição de íons magnésio, ocasionando alterações do LPS e levando resistência às polimixinas. Desta forma, supõe-se que esta porina se associaria ao LPS para fortalecer e estabilizar a membrana externa (OLAITAN et al., 2014; LEE et al., 2017).

### 3.2.3.2 Hiperprodução dos sistemas de efluxo

A deficiência de porinas é um obstáculo efetivo para a entrada de antimicrobianos na célula, entretanto, baixas concentrações intracelulares dos agentes antimicrobianos também podem ser obtidas por meio da extrusão ativa destes fármacos por meio dos sistemas de efluxo (XIA et al., 2016).

Embora os sistemas de efluxo possam ser específicos a um substrato, também podem transportar diversos substratos incluindo agentes antimicrobianos, detergentes, biocidas, corantes, sais biliares, ácidos graxos. Assim, estes sistemas são considerados como principal mecanismo responsável pela multirresistência aos antimicrobianos (POOLE, 2000; PIDDOCK 2006; NIKAIDO; PAGES, 2012; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; CAG et al., 2016).

Os sistemas de efluxo responsáveis pela extrusão de apenas uma única classe de antibióticos, geralmente são codificados por transposons e plasmídeos transmissíveis. Entretanto, aqueles relacionados com a extrusão de antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação geralmente são codificados no cromossomo bacteriano (EL ZOWALATY et al., 2015; PUZARI; CHETIA, 2017).

Cinco superfamílias de sistemas de efluxo podem estar presentes no envelope celular: ABC (*ATP-Binding Cassette*), SMR (*Small Multidrug Resistance*),

MFS (*Major Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance-Nodulation-Division*) e MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) (SAIER et al., 1998; VAN BAMBEKE et al., 2000; SUN et al., 2014; XIA et al., 2016). Destas, a família RND é a que apresenta especificidade a um maior número de substratos, desempenhando um papel chave para o desenvolvimento do fenótipo de multirresistência (PUZARI; CHETIA, 2017).

O sistema de efluxo da família RND é tripartido, sendo uma estrutura que forma um canal que atravessa desde a membrana celular até a membrana externa da bactéria. O primeiro componente, uma proteína dependente de energia, é o transportador (bomba) localizado na membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF, MexY), o segundo é uma proteína de membrana externa (porina) (OprM, OprJ, OprN, OpmB, OmpG, OmpI) e o terceiro componente é uma proteína localizada no espaço periplasmático que conecta os dois componentes (MexA, MexC, MexE, MexY). Estudos revelam que os transportadores capturam substratos tanto da membrana citoplasmática quanto do espaço periplasmático (PAGÈS; AMARAL 2009; NIKAIDO; PAGÈS 2012; FERNANDO; KUMAR 2013; PHAN et al., 2015; PUZARI; CHETIA, 2017).

*P. aeruginosa* apresenta de 10 a 12 sistemas de efluxo da família RND, os quais são regulados independentemente e compartilham substratos, principalmente as fluoroquinolonas (POOLE 2000; FERNANDO; KUMAR, 2013; EL ZOWALATY ET AL., 2015). Destes, os sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM contribuem fortemente na redução da sensibilidade aos antimicrobianos (MINE et al 1999; LOMOVSKAYA et al. 2001; POOLE, 2001; AESCHLIMANN, 2003; SCHWEIZER, 2003; MOREIRA et al. 2004; NIKAIDO; PAGÈS, 2012; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; PHAN et al., 2015; GEISINGER; ISBERG, 2017).

O sistema MexAB-OprM é altamente conservado em isolados clínicos de *P. aeruginosa* indicando seu papel na resistência intrínseca bacteriana. Este sistema é responsável pela extrusão de diversos substratos como beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, trimetropin, sulfonamidas, macrolídeos, brometo de etídeo, acriflavina, cristal violeta, SDS, hidrocarbonetos aromáticos, homo-serina lactona, cerulenina, tiolactomicina, triclosan (FERNANDO; KUMAR, 2013; EL ZOWALATY et al., 2015; GOLI et al., 2017) Além disso, este sistema é considerado essencial para a sobrevivência,

colonização e virulência de *P. aeruginosa* (EL ZOWALATY et al., 2015; GOLI et al., 2017).

O sistema MexCD-OprJ em *P. aeruginosa* é responsável pela extrusão de cefalosporinas de quarta-geração, fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, trimetropin, macrolídeos, cristal violeta, brometo de etídeo, lincomicina, acriflavina, SDS, hidrocarbonetos aromáticos, triclosan e tetraciclinas (EL ZOWALATY et al., 2015; GOLI et al., 2017). Além disso, o sistema MexEF-OprN aumenta a resistência ao cloranfenicol, quinolonas, trimetropim triclosan e imipenem enquanto que o sistema MexXY-OprM tem como substratos as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e eritromicina (EL ZOWALATY et al., 2015; GOLI et al., 2017).

### 3.2.3.3 Alteração ou modificação do alvo

*P. aeruginosa* apresenta a capacidade de substituir ou modificar moléculas alvo evitando o reconhecimento dos agentes antimicrobianos a fim de evitar os efeitos nocivos destes fármacos. Alterações do alvo são mais frequentemente responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas, entretanto, a ação de 16S rRNA metilases e alteração de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) estão associados a resistência aos aminoglicosídeos e beta-lactâmicos, respectivamente (EL ZOWALATY et al., 2015; CAG et al., 2016; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Estas mudanças de alvo podem consistir em mutações pontuais nos genes que codificam a estrutura alvo, alterações enzimáticas do local de ligação (por exemplo, adição de grupos metil) e/ou substituição do alvo original (MUNITA; ARIAS, 2016).

#### 3.2.3.3.1 Alterações de PBPs

As PBPs são um grupo de enzimas periplasmáticas que funcionam como transpeptidases, carboxipeptidases ou endopeptidases durante a síntese da parede celular bacteriana, desta forma, são responsáveis pela polimerização, ligação cruzada e modificação do peptidoglicano bacteriano. Estas proteínas são classificadas de acordo com sua estrutura molecular e são divididas em 2 grupos: i) PBPs de alta massa molecular (classe A e B) que funcionam como transpeptidases

e são muitas vezes essenciais; ii) PBPs de baixa massa molecular (classe C) que geralmente funcionam como carboxipeptidases e endopeptidases e sua ausência não acarreta em perda da viabilidade celular ou crescimento bacteriano (ROPY et al., 2015; CHEN et al., 2016).

Sabe-se que os beta-lactâmicos se ligam às PBPs impedindo sua ação na síntese do peptidoglicano. Desta forma, alterações em PBPs dificultam a ligação do beta-lactâmico ao sítio ativo da enzima, conseqüentemente, continuam promovendo a síntese da parede mesmo na presença do antimicrobiano (SMITH et al., 2013).

Segundo Ropy e colaboradores (2015) a PBP5 é a PBP mais expressa em *P. aeruginosa*, sendo considerada a principal carboxipeptidase, e quando ausente, sua ação é compensada pelas PBP4 e PBP7, as quais apresentam atividade de endopeptidase. A estrutura cristalizada da PBP5 mostra que esta proteína apresenta atividade de beta-lactamase, implicando também na resistência aos antimicrobianos (SMITH et al., 2013). Além disso, Chen e colaboradores (2016) relataram que a PBP3 é aparentemente a única PBP essencial para o crescimento de *P. aeruginosa* e que a sua deleção resultou em alterações nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs), aumentando a sensibilidade aos beta-lactâmicos cefepime e ceftazidima.

#### 3.2.3.4 Produção de enzimas hidrolisadoras

Outro importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos é a produção de enzimas que, irreversivelmente, modificam e inativam os antimicrobianos, como as beta-lactamases e as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EL ZOWALATY et al., 2015; CAG et al., 2016; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

#### 3.2.4 Resistência Aos Beta-lactâmicos e Produção de Beta-lactamases

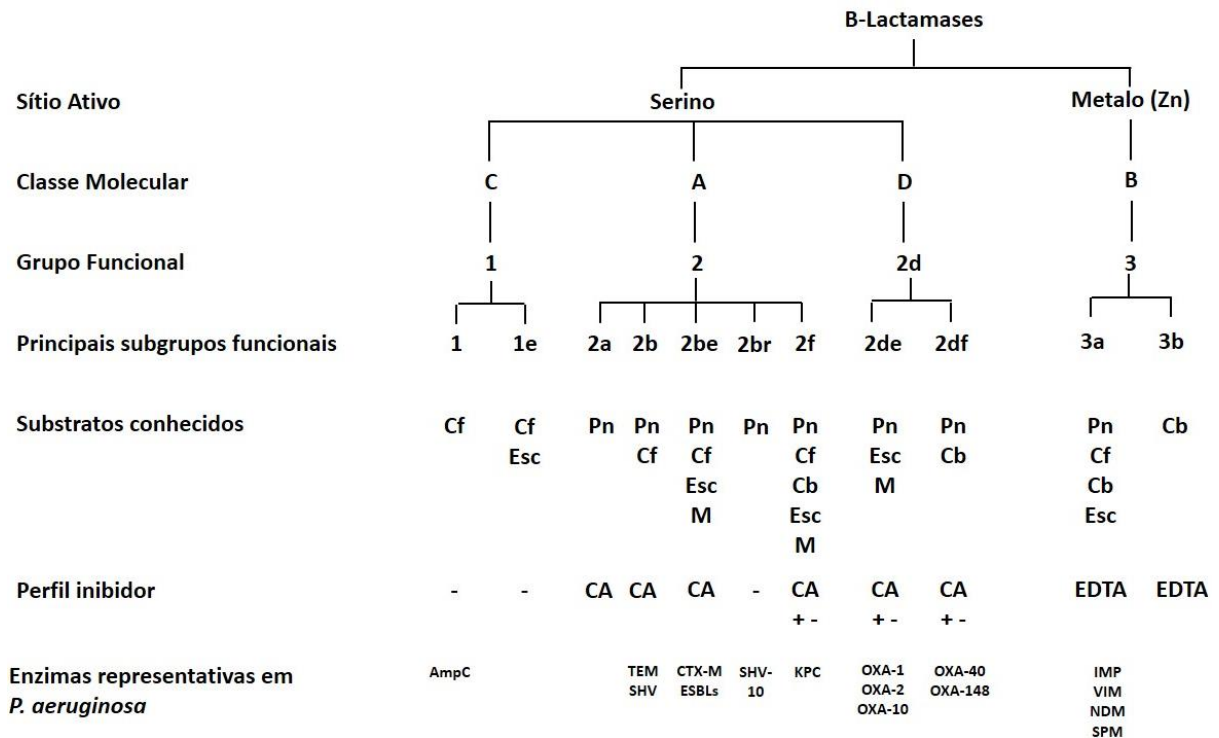
A resistência aos beta-lactâmicos é multifatorial e envolve perda de porinas, hiperexpressão de sistemas de efluxo, alterações de estruturas alvo (PBPs), bem como produção de enzimas inativadoras (beta-lactamases). Destes, a produção

de beta-lactamases é o principal mecanismo envolvido na resistência aos beta-lactâmicos, uma vez que se ligam ao anel beta-lactâmico do antimicrobiano, hidrolisando-o, e tornando o fármaco inativo. Em BGNs, as beta-lactamases concentram-se no espaço periplasmático, onde degradam estes antimicrobianos, antes que se liguem às PBPs (BĂLĂȘOIU et al., 2014; CASTANHEIRA et al., 2014; BOYLE; ZEMBOWER, 2015).

Segundo a classificação proposta por Ambler (1980) as beta-lactamases foram agrupadas em quatro classes (classe A, B, C e D) de acordo com sua estrutura proteica primária (Figura 1). As beta-lactamases das classes A, C e D atuam por um mecanismo serino-dependente, ou seja, necessitam de um aminoácido serina em seu sítio ativo enquanto as beta-lactamases da classe B utilizam o íon zinco ( $Zn^{2+}$ ) como cofator para sua atividade catalítica (BĂLĂȘOIU et al., 2014).

Outro sistema de classificação destas enzimas foi proposto por Bush em 1995 e atualizado em 2010. Este esquema leva em consideração os substratos preferenciais e inibidores de beta-lactamases na tentativa de agrupá-las de maneira que possam ser correlacionadas com seu fenótipo em isolados clínicos. Entretanto, os principais grupos geralmente se correlacionam com a classificação molecular de Ambler (Figura 1) (BUSH; JACOBY, 2010).

De acordo com a Figura 1, primeiramente as beta-lactamases podem ser distinguidas pelo íon/aminoácido presente no sítio ativo da enzima:  $Zn^{2+}$  nas metalo-beta-lactamases e o aminoácido serina nas serino-beta-lactamases. Estas enzimas também podem ser divididas em quatro classes moleculares de acordo com a estrutura proteica primária, segundo a classificação de Ambler. Uma terceira classificação, proposta por Bush-Jacoby é conhecida por classificação funcional (grupos e subgrupos funcionais) que se baseia nos antimicrobianos preferencialmente degradados por estas beta-lactamases e pelas substâncias capazes de inibi-las.



**Figura 1:** Características molecular e funcional dos principais grupos de beta-lactamases (Adaptação de Bush, 2013). Cf: cefalosporinas; Esc: cefalosporinas de espectro estendido; Pn: penicilinas; M: monobactâmico; Cb: carbapenêmicos; CA: ácido clavulânico; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.

Baseado na especificidade do substrato, quatro principais grupos de beta-lactamases podem ser identificadas: penicilinases, beta-lactamases de espectro estendido (*Extended spectrum beta-lactamases* - ESBLs), beta-lactamase cromossomal (AmpC) e carbapenemases (BĂLĂȘOIU et al., 2014; ROOD; LI, 2017).

a) Penicilinases: conferem resistência as carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefoperazona. Ceftazidima, ceftazidima, ceftazidima, ceftazidima, imipenem e inibidores de beta-lactamases não são inativadas por estas enzimas.

b) ESBLs: maior e mais prevalente grupo de beta-lactamases, estas enzimas podem hidrolisar as cefalosporinas de espectro estendido (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), cefepime e aztreonam, apenas não hidrolisam as cefamicinas e carbapenêmicos. São inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Estas enzimas pertencem às classes A e D de Ambler

c) AmpC: são cefalosporinas constitutivas ou induzíveis, pertencentes à classe C de Ambler, que hidrolisam as penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª geração (mas não de 4ª geração) e aztreonam. Estas enzimas não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam.

d) Carbapenemases:

- Classe A de Ambler: hidrolisam as penicilinas (exceto temocilina), cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima, cefamandole, cefoperazona) e metoxicefalosporinas (cefamicinas) e carbapenêmicos. Estas enzimas não são inibidas por EDTA, mas podem ser inibidas por inibidores de beta-lactamase como ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam.

- Classe B de Ambler: conferem resistência a todos os beta-lactâmicos, exceto ao aztreonam.

- Classe D de Ambler: apresentam a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos, contudo, não apresentam atividade sobre o aztreonam e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração.

Além disso, a associação na produção de beta-lactamases pode levar ao aumento de hidrólise dos antimicrobianos, por exemplo, cefalosporinas de 2ª geração não são hidrolisadas por ESBLs, mas são hidrolisadas pela associação ESBL/AmpC (ROPY et al., 2015).

#### 3.2.4.1 Beta-lactamases da Classe A de Ambler

Em *P. aeruginosa*, as beta-lactamases da classe A ou grupo 2 incluem as serino-beta-lactamases, das quais os subgrupos funcionais 2b e 2c, 2be e 2f são conhecidas como beta-lactamases de espectro limitado (LSBLs), beta-lactamases de espectro ampliado/estendido (ESBLs) e serino carbapenemases, respectivamente.

As LSBLs são enzimas que conferem resistência às penicilinas, carbenicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e são inibidas por inibidores de serino-beta-lactamases (ácido clavulânico e tazobactam). Em *P. aeruginosa* as LSBLs mais frequentemente detectadas são TEM-1 (*Temoniera beta-lactamase*), TEM-2, TEM-90, TEM-110, SHV-1 (*Sulphydryl-variable beta-lactamase*). Além disso, PSE-1 (*Pseudomonas specific enzyme*), PSE-4, CARB-3 (*Carbenicillin resistance*), CARB-4 e AER-1 (*Aeromonas*) já foram relatadas (PHILLIPPON et al., 2016).

Inicialmente, as ESBLs eram variantes do grupo 2b (TEM e SHV) que adquiriram a capacidade de hidrolisar cefotaxima ou ceftazidima devido a mutações pontuais. Contudo, atualmente, as ESBLs incluem não apenas variantes

das famílias TEM e SHV (grupo 2be), mas também enzimas da classe A e D (grupo 2de) (PHILLIPPON et al., 2016).

As ESBLs conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas (1<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração) e aztreonam e são, muitas vezes, sensíveis aos inibidores de serino-beta-lactamases. Embora extensivamente identificadas em enterobactérias, têm sido menos relatadas em *P. aeruginosa*. A primeira ESBL detectada em *P. aeruginosa* foi PER-1 (*Pseudomonas extended resistant*) em um isolado clínico recuperado de um paciente turco em 1991 na França, desde então esta enzima tem sido detectada em países europeus. Atualmente, nove variantes desta enzima foram descritas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 07/12/2017), das quais PER-2 foi detectada em *P. aeruginosa* apenas na Bolívia. Desde então outras ESBL foram reportadas em *P. aeruginosa*: TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42, TEM-92, TEM-116, SHV-2a, SHV-5, SHV-12, VEB-1 (*Vietnam Extended-Spectrum beta-lactamase*), VEB-2, VEB-3, GES-1, GES-8, GES-9, GES-13, CTX-M-1 (*Cefotaxime Munich*), CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-43, PME-1 (*Pseudomonas aeruginosa* ESBL), BEL-1 (*Belgium extended-spectrum beta-lactamase*), BEL-2 e BEL-3 foram ESBLs relatadas nesta espécie. (NORDMANN et 1993; POTRON et al., 2015; OLIVER et al., 2015; PHILLIPPON et al., 2016).

As carbapenemases da classe A de Ambler detectadas em *P. aeruginosa* são KPC e GES, estas enzimas apresentam atividade contra penicilinas e cefalosporinas, bem como contra os carbapenêmicos. A família GES apresenta 31 variantes (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 07/12/2017), as quais todas são capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro. Entretanto, algumas apresentam uma habilidade adicional de degradar os carbapenêmicos devido a uma substituição de um aminoácido no sítio ativo da enzima em isolados de *P. aeruginosa* produtores de GES-2 (Glu170Asn), GES-5 e GES-18 (Glu170Ser) (POTRON et al., 2015; OLIVER et al., 2015; PHILLIPPON et al., 2016; ESCANDÓN-VARGAS et al., 2017).

A KPC é uma importante enzima do grupo 2f da classe A de Ambler também encontrada em *P. aeruginosa*. Originalmente descrita em *K. pneumoniae*, esta enzima hidrolisa eficientemente todos os beta-lactâmicos, com exceção das cefamicinas. KPC foi primeiramente detectada em *P. aeruginosa* na Colômbia e após em Porto Rico, Trinidad e Tobago, EUA e China. Tem sido mais

frequentemente identificada em isolados provenientes das Américas e da região do Caribe. No Brasil, foi primeiramente detectado em *P. putida*, em 2008. Em *P. aeruginosa* foi identificada em dois hospitais em 2010, nas cidades de Recife e Londrina e desde então estão cada vez mais frequentes (JACOMÉ et al., 2012; CARRARA-MARRONI et al., 2015; ESCANDÓN-VARGAS et al., 2017). Atualmente 23 diferentes variantes válidas foram descritas e estas enzimas diferem entre 1 a 3 aminoácidos (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 07/12/2017). Os genes que codificam estas enzimas podem ter localização cromossomal ou plasmidial e estes plasmídeos podem carrear outros determinantes de resistência (SHI et al., 2017).

#### 3.2.4.2 Beta-lactamases da Classe B de Ambler da subclasse B1: metalo-beta lactamases

As beta-lactamases mais frequentemente encontradas em *P. aeruginosa* são as MBLs, as quais hidrolisam eficientemente os carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos, com exceção do monobactâmico (aztreonam) e também não são afetadas por inibidores de beta lactamases como ácido clavulânico e tazobactam (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; TADA et al., 2016).

Desde o início da década de 90 foram detectados isolados de *P. aeruginosa* produtores de IMP e VIM, desde então outras enzimas foram detectadas nesta espécie, tais como: SPM, GIM, NDM, FIM e HMB (SANTAJIT; HONG et al., 2015; INDRAWATTANA, 2016; PFENNIGWERTH et al., 2017).

##### 3.2.4.2.1 Metalo-beta-lactamase da subclasse IMP

A primeira MBL descrita em *P. aeruginosa* foi a IMP-1 (*Imipenemase*) em 1988 no Japão, localizada em um integron de classe I em um plasmídeo conjugativo (pMS350). Desde então, 58 variantes foram descritas em isolados de diversas espécies, principalmente de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e enterobactérias, em países de todos os continentes (WATANABE et al., 1991; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 07/12/2017; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). A tabela 2 apresenta as variantes de IMP

detectadas em *P. aeruginosa*, bem como os países onde foram isoladas e os *Sequence Types* (STs) em que foram associadas.

**Tabela 2:** Clones associados e países de isolamento de variantes de IMP.

<b>Variante de IMP</b>	<b>ST frequentemente encontrado</b>	<b>País de Isolamento</b>
IMP-1	111, 175, 186, 235, 244, 277, 308, 360, 357, 593, 645, 964, 1015, 1070, 1162	Japão, Coréia do Sul, Brasil, China, Turquia, Singapura, Tailândia, Irã, Brasil, Líbano, Polônia, Reino Unido
IMP-2	-	Japão, Líbano
IMP-4	-	Malásia, Austrália, China,
IMP-5	-	Portugal
IMP-6	235, 244, 591, 744, 745, 1015, 1162	Coréia do Sul China
IMP-7	235, 357, 744, 745	Canadá, Malásia, Eslováquia, Japão, Singapura, República Checa, Dinamarca, Arábia Saudita
IMP-8	308	Alemanha
IMP-9	-	China, Malásia,
IMP-10	-	Japão, China
IMP-11	-	Japão
IMP-13	111, 308, 621	Áustria, Itália, França, Bélgica, Argentina, Reino Unido
IMP-14	260	Thailândia
IMP-15	606, 654, 1446	México, Espanha, Alemanha
IMP-16	-	Brasil
IMP-18	-	Estados Unidos da América, México, Porto Rico
IMP-19	235	Japão, Itália
IMP-20	-	Japão
IMP-21	-	Japão
IMP-22	175, 620	Áustria, Itália
IMP-25	-	China
IMP-26	235, 654	Malásia, Singapura, Vietnã
IMP-29	235	France
IMP-30	-	Rússia
IMP-31	235	Alemanha
IMP-33	-	Itália

Variante de IMP	ST frequentemente encontrado	País de Isolamento
IMP-35	622	Alemanha
IMP-37	111, 308, 621	França
IMP-40	-	Japão
IMP-41	-	Japão
IMP-43	235, 357	Japão
IMP-44	357	Japão
IMP-45	308	China
IMP-48	-	Estados Unidos da América, Tailândia
IMP-49	-	Brasil
IMP-51	-	Japão

Fonte: HONG et al., 2015, LABARCA et al., 2016, KAZMIERCZAK et al., 2015; TADA et al., 2013; TURTON et al., 2015; SHIMIZU et al., 2015; ABIRI et al., 2015; MOOSAVIAN et al., 2015; TADA et al., 2015; 2016; WOLKOWICS et al., 2016; HAMMOUDI et al., 2017; PAPAGIANNITSIS et al., 2017; AL-AGAMY et al., 2016; -; não determinado.

#### 3.2.4.2.2 Metallo-beta-lactamase da subclasse VIM

VIM-1 foi primeiramente descoberta em um isolado de *P. aeruginosa* em Verona, na Itália, em 1997, em seguida este gene foi detectado em um isolado de *Achromobacter xylosoxidans* recuperado no mesmo hospital (LAURETTI et al., 1999; RICCIO et al., 2001). Desde então, foram descritas 51 variantes, das quais 27 foram reportadas em *P. aeruginosa* (Tabela 3) (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 07/12/2017; HONG et al., 2015; SAFFARI et al., 2016; CAI et al., 2016; KAZMIERCZAK et al., 2015; AL-AGAMY et al., 2016; PFEIFER et al., 2017; MALKOÇOĞLU et al., 2017; PEYMANI et al., 2015; BALERO DE PAULA et al., 2017).

**Tabela 3** - Variantes de VIM encontradas em isolados de *P. aeruginosa*

Variante de VIM	STs frequentemente encontrados	País de isolamento
VIM-1	17, 111, 227, 228, 235	Itália, França, Grécia, Alemanha, Irã, China, Arábia Saudita, Turquia, Bélgica

<b>Variantes de VIM</b>	<b>STs frequentemente encontrados</b>	<b>País de isolamento</b>
VIM-2	17, 111, 155, 175, 179, 229, 233, 235, 244, 309, 364, 639, 640, 654, 773, 811, 973, 1020, 1074, 1699, 1700	Tunísia, Tailândia, Áustria, México, Índia, Quênia, Hungria, Malásia, Coreia do Sul, Japão, Portugal, Espanha, Croácia, Polônia, Colômbia, México, Chile, Argentina, Estados Unidos da América, Venezuela, Bélgica, Turquia, Egito, Irã, Arábia Saudita, Bulgária, Brasil, República Checa, França, Alemanha, Grécia, Romênia, Espanha, Reino Unido, China, Taiwan, Tailândia, Nigéria, África do Sul
VIM-3	298	Taiwan, Kwait
VIM-4	111, 229, 230, 235, 313	Grécia, Suíça, Polônia, Hungria, França, Arábia Saudita, Turquia, Kuwait
VIM-5	85, 534	India, Turquia, Tailândia, Nigéria
VIM-6	85, 746	India, Indonésia, Coreia do Sul, Filipinas, Malásia
VIM-7	1284	Estados Unidos da América, Brasil
VIM-8	-	Colômbia
VIM-9	-	Reino Unido
VIM-10	-	Reino Unido
VIM-11	-	Índia, Argentina, Itália, Malásia, Arábia Saudita
VIM-13	235	Espanha
VIM-14	260	Espanha, Itália
VIM-15	-	Bulgária
VIM-16	-	Alemanha
VIM-17	-	Grécia
VIM-18	-	Índia
VIM-20	-	Espanha
VIM-28	-	Egito, Arábia Saudita
VIM-30	-	França
VIM-36	111	Bélgica
VIM-37	-	Polônia
VIM-38	-	Turquia
VIM-43	-	Estados Unidos da América, Hungria
VIM-44	-	Portugal

<b>Variantes de VIM</b>	<b>STs frequentemente encontrados</b>	<b>País de isolamento</b>
VIM-45		Tailândia
VIM-47	235, 175	Espanha

Fonte: HONG et al., 2015; SAFFARI et al., 2016; CAI et al., 2016; KAZMIERCZAK et al., 2015; AL-AGAMY et al., 2016; PFEIFER et al., 2017; MALKOÇOĞLU et al., 2017; PEYMANI et al., 2015; BALERO DE PAULA et al., 2017; -: não determinado.

#### 3.2.4.2.3 Metallo-beta-lactamase da subclasse SPM

A enzima SPM-1 é composta por 216 aminoácidos e apresenta 35,5% de identidade com IMP-1 (HONG et al., 2015). Esta enzima foi primeiramente identificada em *P. aeruginosa* isolada da urina de uma paciente admitida em um hospital de São Paulo em 1997 e desde então tornou-se a MBL predominante no Brasil (TOLEMAN et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2016). A produção de SPM-1 em *P. aeruginosa* tem sido observada em isolados clínicos e ambientais e a disseminação deste determinante de resistência é restrita ao território brasileiro, sendo relatada em diversos estados (Tabela 4) (CACCI et al., 2016, TURANO et al., 2016; KALLUF et al., 2017).

**Tabela 4** - Estudos que apresentam taxas de isolamento de SPM-1 em diferentes estados brasileiros.

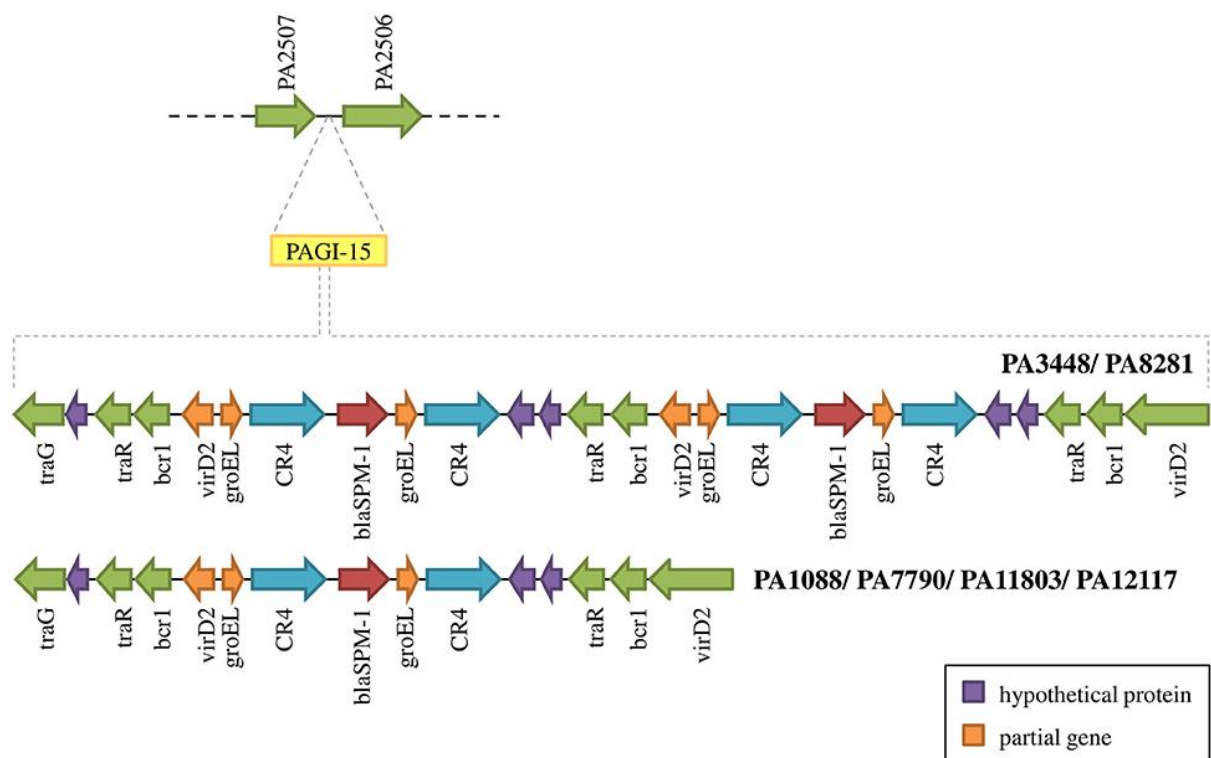
<b>Estado</b>	<b>Taxa de Isolados produtores de SPM-1 (n/N)</b>	<b>Referência</b>
Distrito Federal	4,4% (2/45) <sup>b</sup>	SADER et al., 2005
Goiás	41,9 (26/62) <sup>a</sup>	GONÇALVES et al., 2009
Maranhão	7,5% (6/80) <sup>a</sup>	VIANA-VIEIRA et al., 2005
Minas Gerais	26,3% (5/19) <sup>a</sup>	DIAS et al., 2017
	11,1% (4/36) <sup>a</sup>	DANTAS et al., 2014
	26,7% (4/15) <sup>d</sup>	CEZÁRIO et al., 2009
Paraná	25,5% (41/161) <sup>a</sup>	KALLUF et al., 2017
	31,9% (45/141) <sup>a</sup>	CARRARA-MARRONI, 2009
Pernambuco	83,56% (61/73) <sup>a</sup>	CAVALCANTI et al., 2012
	20,69% (6/29) <sup>a</sup>	JACOMÉ et al., 2012

<b>Estado</b>	<b>Taxa de Isolados produtores de SPM-1 (n/N)</b>	<b>Referência</b>
	35,5% (11/31) <sup>a</sup>	JACOMÉ et al., 2016
Rio de Janeiro	2,86% (1/35) <sup>b</sup>	CACCI et al., 2016
	5,88% (1/17) <sup>b*</sup>	
	20,0% (13/6) <sup>a</sup>	CARVALHO et al., 2006
	82,0% (18/22) <sup>a</sup>	PELLEGRINO et al., 2006
	44,0% (14/32) <sup>a</sup>	NOUÉR et al., 2005
Rio Grande do Sul	19,3% (6/31) <sup>a</sup>	WIRTH et al., 2009
	19,56% (18/92) <sup>a</sup>	MARTINS et al., 2007
	9,21% (14/152) <sup>a</sup>	ZAVASCKI et al., 2005
Santa Catarina	20,7% (6/29) <sup>a</sup>	SCHEFFER et al., 2010
São Paulo	100% (3/3) <sup>a*</sup>	TURANO et al., 2016
	33,33% (43/129) <sup>a</sup>	RIZEK et al., 2014
	6,09% (5/82) <sup>b</sup>	FEHLBERG et al., 2012
	17,86% (10/56) <sup>a</sup>	POLOTTO et al., 2012
	24,63% (17/69) <sup>a</sup>	FRANCO et al., 2010
	56,86% (29/51) <sup>a</sup>	DOI et al., 2007
	5,26% (4/76) <sup>b</sup>	MARRA et al., 2006
	24,39% (20/82) <sup>a</sup>	SADER et al., 2005
	10,93% (20/183) <sup>b</sup>	
	34,9% (15/43) <sup>a</sup>	GALES et al., 2003
Sergipe	2,1% (2/49) <sup>c</sup>	COSTA et al., 2015

Coleção de isolados não sensíveis aos carbapenêmicos; <sup>b</sup> Coleção total de isolados; <sup>c</sup> Coleção de isolados resistentes à ceftazidima; <sup>d</sup> Coleção de isolados positivos para teste fenotípico para a detecção de MBL; <sup>e</sup> Coleção de isolados MR; \* isolados ambientais.

A disseminação deste determinante de resistência está atrelada a um clone endêmico no Brasil primeiramente denominado clone SP pelas análises de PFGE e então ST277 por MLST, o qual é considerado um clone de alto risco (OLIVER et al., 2015; KALLUF et al., 2017).

Recentemente, pesquisadores têm realizado estudos para relacionar possíveis fatores genéticos ao sucesso deste clone em instituições brasileiras. Comparações entre o genoma de isolados produtores de SPM-1 e da PA01 revelou que os isolados produtores de SPM-1 apresentaram variações no tamanho do cromossomo devido à aquisição de ilhas genômicas. Além disso, na ilha genômica PAGI-34 foram identificados genes que codificam um sistema relacionado ao controle da transferência horizontal por elementos móveis como fagos e plasmídeos, denominado *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated* (CRISPR-Cas). Este sistema previne a inserção de elementos móveis que possam causar interrupções de genes ou rearranjos genéticos, sendo em parte, responsável pela estabilidade do genoma nos isolados produtores de SPM-1. (NASCIMENTO et al., 2016).



**Figura 2** - Contexto genético do gene *bla<sub>SPM-1</sub>*. O gene codificador desta enzima encontra-se flanqueado por duas cópias de elementos ISCR-4. Fonte: NASCIMENTO et al., 2016.

Segundo Nascimento e colaboradores (2016), o gene *bla<sub>SPM-1</sub>* foi detectado em outra ilha genômica (PAGI-15), flanqueado por elementos ISCR4. Em alguns isolados este gene estava duplicado, conforme a figura 2. Esta ilha genômica

sem o gene codificador de SPM-1 encontra-se disseminada intra- ou inter-gêneros bacterianos, sugerindo a recente inserção deste transposon e a aquisição de *bla*<sub>SPM-1</sub> em *P. aeruginosa*. (NASCIMENTO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016).

#### 3.2.4.2.4 Metallo-beta-lactamase da subclasse NDM

Em 2009, uma paciente sueca de ascendência indiana viajou para Nova Delhi e adquiriu uma infecção por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. Os testes fenotípicos para a detecção de carbapenemases e metallo-beta-lactamases comprovaram a produção de uma MBL, entretanto nenhum gene para MBL até então conhecido foi detectado por PCR. Análises do integron de classe I mostraram que na terceira parte deste elemento havia um novo gene denominado então de *bla*<sub>NDM</sub>. NDM-1 foi caracterizada como uma enzima monomérica de massa molecular de 28 kDa e capaz de hidrolisar todos os beta-lactâmicos, com exceção do aztreonam (YONG et al., 2009).

Após o primeiro relato, este determinante de resistência foi rapidamente disseminado em outras espécies bacterianas, inclusive em *P. aeruginosa*, e em diversos países. Esta ampla disseminação se justifica por este gene ser carregado, na maioria dos casos, por plasmídeos conjugativos. Em especial, em *P. aeruginosa* este gene foi detectado em isolados pertencentes ao clone epidêmico mundial ST235 (KHAN et al., 2017; HONG et al., 2015).

Dezesseis variantes de NDM foram descritas em enterobactérias, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (KHAN et al., 2017; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 07/12/2017). Contudo, até o momento, somente NDM-1 foi detectada em isolados de *P. aeruginosa* em diversos países como Sérvia, França (paciente da Sérvia), Índia, Itália, Egito, Eslováquia, Colômbia e Kwait (KHAN et al., 2017; KAZMIERCZAK et al., 2015; POTRON et al., 2015, HONG et al., 2015; ESCANDÓN-VARGAS et al., 2017).

#### 3.2.4.2.5 Metallo-beta-lactamase da subclasse GIM

GIM-1 foi primeiramente identificada em isolados clínicos de *P. aeruginosa* na Alemanha em 2002. Em seguida outros relatos foram feitos em isolados provenientes de materiais clínicos e do ambiente hospitalar os quais foram

classificados como ST111, um clone de alto risco (CASTANHEIRA et al., 2004; SKAGSETH et al., 2015; 2017). Outras espécies bacterianas (*Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *P. putida*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Acinetobacter pittii*) isoladas neste país também apresentaram esta enzima, indicando que o gene codificador está presente em elementos genéticos móveis.

Estudos têm mostrado que este gene está localizado, em todos os casos, em integrons de classe I associado a outros determinantes de resistência como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (*aacA4* e *aadA1*) e beta lactamases da classe D (OXA-2) (WENDEL et al., 2013; HONG et al., 2015).

Em 2014, uma nova variante (GIM-2) foi detectada em um isolado de *E. cloacae*, também na Alemanha, sendo que esta nova enzima apresenta uma mutação simples (A290G) (SKAGSETH et al., 2015; WENDEL; MACKENZIE, 2015).

#### 3.2.4.2.6 *Metallo-beta-lactamase da subclasse FIM*

Em 2012, uma nova metallo-beta-lactamase, FIM-1, foi detectada em um isolado clínico de *P. aeruginosa* MDR recuperado na Itália. Esta enzima apresenta maior similaridade (40% de identidade dos aminoácidos) com enzimas do tipo NDM. Este isolado pertence ao clone de alto risco epidêmico (ST235) e as análises do contexto genético mostraram que o gene localiza-se no cromossomo e está associado com *ISCR19*. Além disso, ensaios utilizando a enzima FIM-1 purificada revelou um amplo espectro de hidrólise, apresentando preferência para as penicilinas e carbapenêmicos, entretanto, não foi capaz de hidrolisar o aztreonam (Pollini et al., 2013; Hong et al., 2015; Potron et al., 2015).

#### 3.2.4.2.7 *Metallo-beta-lactamase da subclasse HMB*

Este ano, uma nova metallo-beta-lactamase, HMB-1, foi detectada em *P. aeruginosa* recuperado de um *swab* de um paciente hospitalizado em um hospital na Alemanha. Esta enzima apresentou maior similaridade (74,3% de identidade dos aminoácidos) com a enzima KHM (Kyorin Health Science MBL)-1 detectada em *Citrobacter freundii* no Japão. As análises do contexto genético mostraram que o gene localizou-se no cromossomo, associado ao transposon Tn6345. Além disso, ensaios utilizando a enzima purificada mostrou que a mesma

hidrolizou todos os beta-lactâmicos, com exceção do aztreonam, e as maiores taxas de hidrólise foram observadas para cefoxitina, imipenem e meropenem (PFENNIGWERTH et al., 2017).

#### 3.2.4.3 Beta-lactamases da Classe C de Ambler: AmpC ou cefalosporinases cromossomais

A resistência intrínseca aos beta-lactâmicos ocorre, também, pela produção de beta-lactamases do grupo funcional 1 ou da classe C de Ambler, denominadas AmpC ou cefalosporinases cromossomais. Estas enzimas geralmente são codificadas por genes de localização cromossomal e sua produção confere a hidrólise de ureidopenicilinas (piperacilina), cefamicinas (cefoxitina e cefotetan), monobactâmico (aztreonam), oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de 3ª geração), mas não do cefepime e dos carbapenêmicos (BADER et al., 2017; HAIDAR et al., 2017; LIVERMORE et al., 2017).

Apesar de *P. aeruginosa* produzir AmpC em níveis basais muito baixos, a expressão desta enzima é altamente induzível na presença de beta-lactâmicos, como cefoxitina e imipenem. Vários genes (*ampG*, *ampD* e *ampR*) estão envolvidos na regulação da expressão de *ampC*, um processo intimamente ligado à reciclagem do peptidoglicano. Em *P. aeruginosa*, a inativação de AmpD (N-acetil-anidromuramila-L-alanina amidase) e mutações pontuais em *ampR* (regulador transcricional do tipo LysR) estão associadas ao aumento da produção de AmpC, levando ao fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos (ROPY et al., 2015; PÉREZ-GALLEGO et al., 2016; BERRAZEG et al., 2016; BADER et al., 2017; HAIDAR et al., 2017).

O gene *ampG* codifica uma permease da membrana interna que transporta os anidromuropeptídeos (GlcNAc-1,6-anidromuropeptídeos), os quais são catabólitos do peptidoglicano, que após entrada no citosol, são processados pela N-acetilglucosaminidase para gerar 1,6-anidromuropeptídeos, os quais interagem com AmpG, um regulador negativo de AmpC. Durante o crescimento bacteriano na ausência de indutores, o 1,6 anidromuropeptídeo é hidrolisado por AmpD, evitando a indução de *ampC*. Entretanto, durante o crescimento na presença de forte indutor de beta-lactamase (como os carbapenêmicos), grande quantidade de muropeptídeos

são gerados e acumulados no citoplasma, o qual leva a indução de *ampC* mediado por AmpR (ROPY et al., 2015; PÉREZ-GALLEGO et al., 2016; LI et al., 2016).

A inativação por mutação de AmpD leva ao acúmulo de 1,6 anidromuropeptídeo e a hiperexpressão de *ampC*, mesmo na ausência de indutores de beta-lactamase, resultando em uma desrepressão constitutiva com superprodução de AmpC e consequente fenótipo de resistência. Estudos posteriores mostraram que *P. aeruginosa* possui, além de AmpD, duas amidases (AmpDh2 e AmpDh3). A inativação dos genes que codificam estas enzimas leva a uma regulação positiva da produção de AmpC, conduzindo a níveis muito altos (1000 vezes em relação ao nível do tipo selvagem) de expressão de *ampC* e resistência aos beta-lactâmicos em triplo mutantes (ROPY et al., 2015; PÉREZ-GALLEGO et al., 2016).

Apesar das diferenças em suas sequências de aminoácidos, as beta-lactamases da classe C compartilham a mesma estrutura geral e sequências conservadas no sítio ativo. Entretanto, mutações em regiões específicas de ligação ao substrato aumentam a eficiência catalítica e o espectro de ação, hidrolisando ceftazidima, cefepime e até mesmo imipenem, sendo denominadas de AmpCs de espectro ampliado (ESAC - *Extended-Spectrum AmpC*) (BERRAZEG et al., 2015).

#### 3.2.4.4 Beta-lactamases da Classe D de Ambler

A classe D de Ambler compreende enzimas heterogêneas, denominadas oxacilinases, que degradam oxacilina e cloxacilina e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico. Esta família de enzimas é composta por 518 representantes, as quais são divididas entre os grupos funcionais 2d, 2de e 2df que abrangem oxacilinases de espectro limitado (LS-OXA), de espectro estendido (ES-OXA) e carbapenemases (CHDLs), respectivamente (POIREL et al., 2010).

As principais ES-OXA, derivadas das oxacilinases de espectro limitado, em *P. aeruginosa* são OXA-1 (OXA-31), OXA-2 (OXA-15, OXA-32, OXA-34, OXA-36, OXA-141, OXA-161, OXA-205), OXA-10 (OXA-11, OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-129, OXA-142, OXA-145, OXA-147, OXA-183), OXA-18, OXA-45 e OXA-56 (OXA-128) (POTRON et al., 2015; MALATHI et al., 2016). Entretanto, apenas duas CHDLs são descritas em *P. aeruginosa*: OXA-40 e OXA-198 (SEVILLANO et al., 2009; EL GARCH et al., 2011).

### 3.2.4.5 Resistência aos Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são os beta-lactâmicos mais importantes utilizados na terapia de infecções causadas por *P. aeruginosa* MDR e XDR, uma vez que apresentam um espectro de atividade excepcionalmente amplo sendo menos vulnerável à hidrólise por beta-lactamases, incluindo as ESBLs (MELETIS et al., 2015; 2016; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; ROSTAMI et al., 2017). Embora os carbapenêmicos sejam os antimicrobianos mais efetivos para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo, o aumento no aparecimento de isolados resistentes a altas concentrações deste fármaco tem sido relatado mundialmente (ROSTAMI et al., 2017).

Os mecanismos mais frequentemente relacionados à resistência aos carbapenêmicos são os codificados cromossomalmente como: inativação/alteração da proteína de membrana externa OprD a qual regula a entrada destes antimicrobianos na célula; hiperexpressão de sistemas de efluxo (MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ e MexXY-OprM; além da produção de enzimas que inativam estes antimicrobianos. Em isolados clínicos de *P. aeruginosa* observa-se a combinação destes vários mecanismos que atuam sinergicamente e contribuem para o perfil geral de resistência (DANTAS et al., 2017; ROOD; LI, 2017; ROSTAMI et al., 2017).

As alterações da porina OprD têm sido estudadas e recentemente, Kos e colaboradores (2016) mostraram que mutações no gene *oprD* propiciaram a produção de uma proteína alterada com consequente resistência ao imipenem. Embora meropenem e imipenem possam ser ligados à OprD, mutantes desprovidos desta porina apresentaram resistência ao imipenem e sensibilidade para meropenem, inferindo que a resistência ao meropenem se dê por outro mecanismo (FANG et al., 2014; SHU et al., 2015; 2017). Mais recentemente, Hirabayashi e colaboradores (2017) observaram redução na expressão de OprD com consequente redução da concentração inibitória mínima (CIM) para imipenem, contudo, esta correlação não foi observada para meropenem.

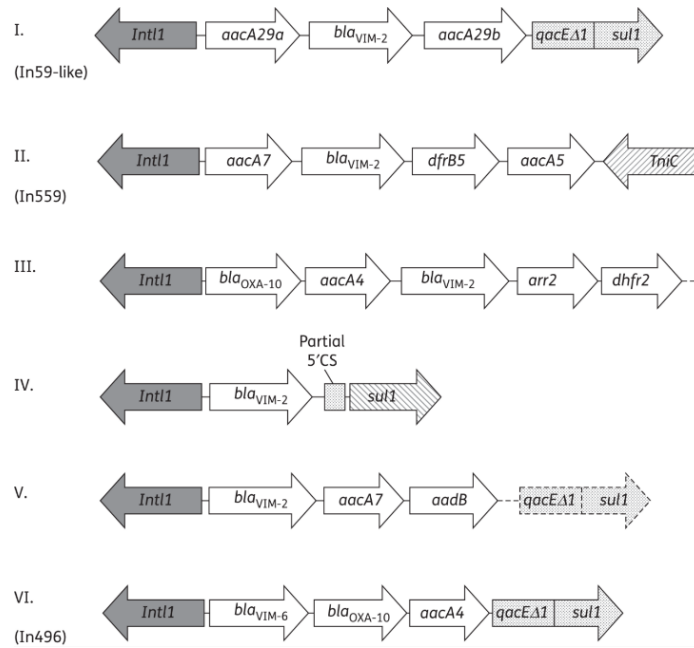
Uma vez que a resistência ao meropenem não tem sido associada a alterações na porina OprD, estudos têm mostrado que a resistência a este antimicrobiano pode ser devido ao aumento da expressão de sistema de efluxo.

Choudhury e colaboradores (2015) mostraram que o sistema MexAB-OprM contribui substancialmente para a resistência ao meropenem em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Foi mostrado também que o uso prévio de meropenem aumenta a expressão de genes associados a este mecanismo e que, conseqüentemente, está ligado a possíveis falhas terapêuticas, contribuindo para a resistência à fluoroquinolonas, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina e meropenem (e não imipenem) (SAITO et al., 2001; CHOUDHURY et al., 2015).

Embora menos frequente, o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é a produção de carbapenemases. Os genes que codificam estas enzimas estão localizados, em muitos casos, em elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons, integrons, ISCR) (Figura 3 e 4) que podem ser mobilizados lateralmente para outros isolados de *P. aeruginosa* e até mesmo para outras espécies bacterianas (ROOD; LI, 2017).

Como descrito anteriormente, diversas carbapenemases têm sido descritas em *P. aeruginosa*, incluindo variantes de KPC e GES da classe A de Ambler, diversas variantes de IMP, VIM, SPM, NDM da classe B de Ambler e algumas variantes de OXA da classe D de Ambler, as quais são codificadas em estruturas genéticas específicas (Figura 2 e 3) e muitas vezes associadas a instituições, regiões e/ou países específicos (PAPAGIANNITSIS et al., 2017).

Os genes codificadores de carbapenemases como GES, IMP, VIM, NDM, e OXA, em sua maioria, são encontrados em cassetes gênicos inseridos em estruturas de integrons (Figura 3), os quais são associados a transposons que podem ser transmitidos a plasmídeos ou cromossomo. Estas estruturas desempenham um papel importante na disseminação destes determinantes de resistência entre os isolados bacterianos, muitas vezes resultando em um perfil de resistência a múltiplos fármacos, uma vez que os integrons frequentemente carregam diversos determinantes de resistência (DI PILATO et al., 2015).



**Figura 3** - Diagrama esquemático das regiões variáveis de integrons de classe I. Os genes cassetes codificadores de resistência aos beta-lactâmicos (*bla<sub>VIM-2</sub>*, *bla<sub>VIM-6</sub>* e *bla<sub>OXA-10</sub>*), aminoglicosídeos (*aacA29a*, *aacA29b*, *aacA7*, *aacA5*, *aacA4*, *aadB*), trimetopim (*dfrB5*) e rifampicina (*arr2*) estão indicados pelas setas brancas. As regiões conservadas 5'-CS (*int1*) e 3'-C (*qacΔE/sul1*) comumente detectadas em integrons de classe I estão representadas em V e VI. Fonte: WRIGHT e al., 2015.

Em adição, estes elementos são transferíveis a outras espécies de Gram-negativos aumentando as taxas de resistência e complicando o tratamento de pacientes com infecções por estes microrganismos (PALZKILL, 2013; HONG et al., 2015).

Existem diversos relatos de *P. aeruginosa* produtoras de MBL em países da América do Norte, América do Sul, América Latina, Sudeste da Ásia e Europa. Dentre as MBL, variantes de VIM e NDM são as mais prevalentes no mundo, entretanto, no Brasil, há predomínio de SPM (ESCANDÓN-VARGAS et al., 2017).

A disseminação destes determinantes de resistência é bastante preocupante, uma vez que estudos relatam que a mortalidade de pacientes infectados por *P. aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases é 20,0% superior em relação aos isolados não produtores desta enzima, aumentando de 11,8 para 17,3/1000 pacientes dia (MAYA et al., 2013). Desta forma, a detecção de *P. aeruginosa* produtoras de MBL, e consequente fornecimento de dados

epidemiológicos é crucial para o sucesso terapêutico e para fomentar medidas para controlar a resistência antimicrobiana (JAPONI et al., 2014).

### 3.2.5 Resistência aos Aminoglicosídeos

Gentamicina, tobramicina e amicacina são aminoglicosídeos utilizados no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, uma vez que, além da atividade bactericida, exibem sinergismo com outros agentes antimicrobianos, principalmente os beta-lactâmicos (EL ZOWALATY et al., 2015; DOI et al., 2016; MOHANAM; MENON, 2017).

*P. aeruginosa* apresenta resistência aos aminoglicosídeos por meio de mecanismos que envolvem a inibição da entrada deste antimicrobiano devido à impermeabilidade da parede celular; alterações no transporte de elétrons que afetam negativamente a entrada do antimicrobiano na célula; diminuição da concentração intracelular por meio de sistemas de efluxo; e alterações ribossomais (EL ZOWALATY et al., 2015). Entretanto, a resistência aos aminoglicosídeos se dá principalmente por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) que medeiam a acetilação, adenilação e fosforilação destes fármacos por meio de acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases, respectivamente. Este mecanismo não confere resistência a todos os aminoglicosídeos devido à especificidade de cada enzima (MOHANAM; MENON, 2017).

Diferentemente das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, as metilases (16S rRNA metilases) conferem elevada resistência a todos os aminoglicosídeos por metilação sítio-específica do RNA ribossômico 16S (LIOY et al., 2014). Até o momento nove 16S rRNA metilases foram descritas (RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH, ArmA, NpmA) entretanto somente RmtA, RmtB, RmtD, RmtF, RmtG foram reportadas em *P. aeruginosa* (JIN et al., 2009; RAHMAN et al., 2015; CORRÊA et al., 2015; CAVALCANTI et al., 2015; SILVEIRA et al., 2016; TADA et al., 2013; 2017). Além disso, a coprodução destas metilases com MBL (SPM-1 e NDM-1) tem sido detectada em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (RAHMAN et al., 2015; DOI et al., 2016; TADA et al., 2017).

Tanto os genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos quanto de 16S rRNA metilases podem ser transferidos

lateralmente, desta forma, podem ser disseminados entre isolados de *P. aeruginosa* (SILVEIRA et al., 2016; DOI et al., 2016; MOHANAM; MENON, 2017).

### 3.2.6 Resistência às Fluoroquinolonas

Ciprofloxacina, levofloxacina e norfloxacina são as fluoroquinolonas que apresentam atividade contra *P. aeruginosa*. Elas inibem a atividade de topoisomerases do tipo II (DNA girase e topoisomerase IV), impedindo a replicação do DNA bacteriano, conseqüentemente, levando à morte celular. A emergência de isolados resistentes a esta classe de antimicrobianos tem sido observada e esta resistência tem se dado por mecanismos intrínsecos e adquiridos a este fármaco (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015; HOOPER; JACOBY, 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2016; ARAUJO et al., 2016; CORREIA et al., 2017).

A resistência às fluoroquinolonas foi inicialmente relacionada a mecanismos cromossômicos como alterações nas subunidades das topoisomerases, diminuição da permeabilidade (perda de porina OprF) e sistemas de efluxo. A alteração da estrutura alvo é o mecanismo mais comum em *P. aeruginosa*. Estas alterações se dão por meio de mutações nos genes *gyrA* e *parC* que codificam subunidades das enzimas DNA girase e DNA topoisomerase IV. Desta forma, estas enzimas alteradas diminuem afinidade ao antimicrobiano, proporcionando a resistência (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015; HOOPER; JACOBY, 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2016; ARAUJO et al., 2016; CORREIA et al., 2017).

A resistência às quinolonas também pode ser codificada por genes localizados em plasmídeos. Estes genes são relacionados à proteção da estrutura alvo (família *qnr*), acetilação do fármaco (AAC(6')-Ib-cr) e sistemas de efluxo (*qepA* e *oqxAB*) (JACOBY et al., 2014; ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015; HOOPER; JACOBY, 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2016; ARAUJO et al., 2016).

Os genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* e *qnrVC*) codificam proteínas que têm por função a proteção da DNA girase, impedindo que estes fármacos se associem à estrutura alvo. Estes genes podem estar associados a outros determinantes de resistência como ESBLs, pAmpC (AmpC plasmidial), carbapenemases, uma vez que foi observado aumento de resistência gradativa e paralela das fluoroquinolonas e beta-lactâmicos (EL ZOWALATY et al., 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2016; ARAUJO et al., 2016).

A resistência às fluoroquinolonas também pode ser associada à alteração (acetilação) do antimicrobiano pela ação da acetiltransferase AAC(6')-Ib-cr, uma variante da enzima envolvida na resistência aos aminoglicosídeos (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015; HOOPER; JACOBY, 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2016; ARAUJO et al., 2016).

As bombas de efluxo QepA e o sistema de efluxo OqxAB são codificadas pelos genes *qepA* e *oqxAB*, respectivamente. QepA confere resistência à quinolonas hidrofílicas como norfloxacin e ciprofloxacina e apresenta-se similar às bombas de efluxo da superfamília MFS. OqxAB é um sistema de efluxo pertencente à superfamília RND que apresenta uma diversidade de substratos, incluindo cloranfenicol, trimetoprimas e quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacin e ácido nalidíxico) (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ ET AL., 2016; CORREIA et al., 2017).

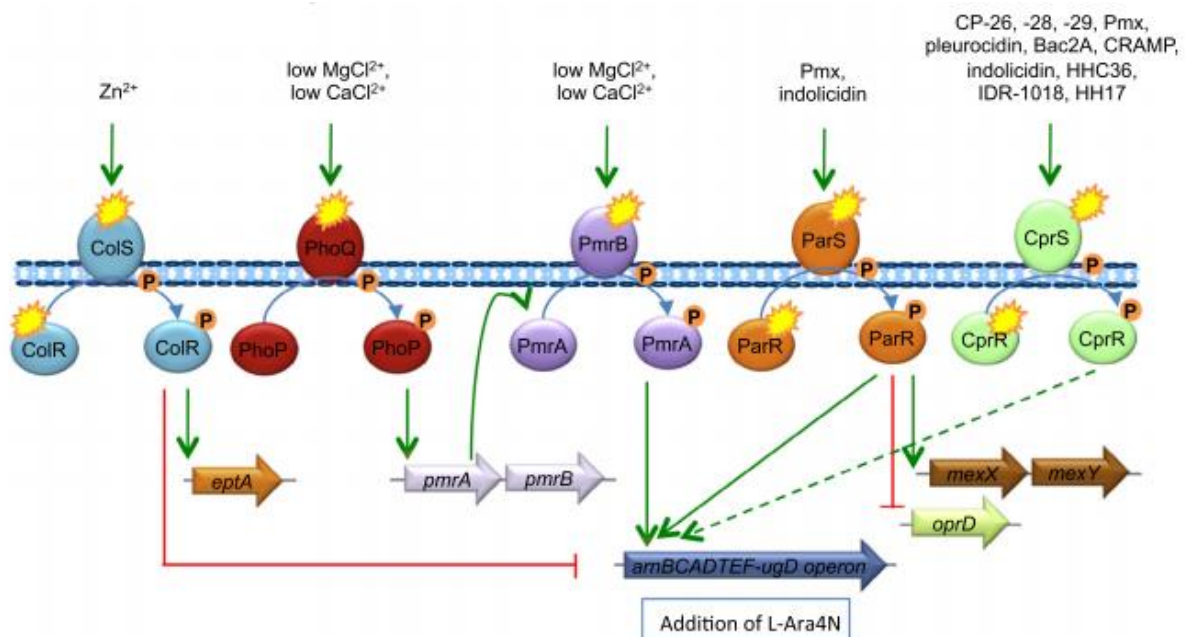
### 3.2.7 Resistência às Polimixinas

As polimixinas têm sido reintroduzidas para combater infecções causadas por *P. aeruginosa*, principalmente por isolados produtores de carbapenemases. Embora a maioria dos estudos tenha relatado a detecção de isolados sensíveis às polimixinas, recentemente tem sido descrito um aumento de isolados resistentes a este fármaco (EL ZOWALATY et al., 2015). As polimixinas, polimixina B e colistina (polimixina E), são peptídeos catiônicos que se ligam ao LPS bacteriano. A interação eletrostática entre as cargas, positiva do antimicrobiano e negativa dos grupos fosfato do lipídeo A, ocasiona o deslocamento de cátions bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ). A alteração da estrutura tridimensional desencadeia a permeabilidade de áreas da membrana externa, facilitando a passagem do antimicrobiano. A polimixina destrói a membrana bacteriana, levando ao vazamento do conteúdo citoplasmático e morte celular (BISWAS et al., 2012; SRINIVAS; RIVARD, 2017; BAKTHAVATCHALAM et al., 2017; DA SILVA et al., 2017).

A resistência a estes antimicrobianos tem se dado por modificações nas porinas (OprD), aumento na expressão de sistemas de efluxo (MexXY-OprM) e alterações na membrana externa, principalmente, associadas à modificações no lipídeo A (BIALVAEI et al., 2015; POOLE et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; SRINIVAS; RIVARD, 2017). A adição covalente de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ao grupamento fosfato do lipídeo A reduz a carga negativa e

consequentemente diminui a atração do fármaco ao LPS da bactéria, levando à resistência (SNITKIN et al., 2013; SRINIVAS; RIVARD, 2017; BAKTHAVATCHALAM et al., 2017).

A regulação da resistência é realizada por cinco sistemas de dois componentes (PhoPQ, PmrAB, ParRS, CprRS e ColRS) (Figura 4). Estes sistemas são constituídos por uma proteína sensora de histidina quinase, que sofre autofosforilação ao perceber estímulos ambientais, acarretando na ativação de uma segunda proteína citoplasmática. Esta, por sua vez, promove a ativação ou repressão dos genes alvo, desencadeando a resistência às polimixinas devido a adição de L-4AraN ao lipídeo A (ARROYO et al., 2011; CHUNG et al., 2017; TORRENS et al., 2017). A ativação destes sistemas está intimamente ligada a estímulos ambientais como: aumento na concentração de ferro ( $Fe^{3+}$ ), concentrações elevadas de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), baixas concentrações de magnésio ( $Mg^{2+}$ ), redução no pH do meio ou excesso de zinco ( $Zn^{2+}$ ) extracelular (Figura 4) (SKIADA et al., 2011; KREAMER et al., 2015; NOWIKI et al., 2015).



**Figura 4** - Representação esquemática da regulação de genes que contribuem para a resistência à colistina em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Cinco sistemas de dois componentes são envolvidos na resistência às polimixinas, dois deles são ativados em exposição ao agente antimicrobiano (ParRS e CprRS), os demais (ColRS, PhoPQ e PmrAB) são ativados por alterações ambientais. A ativação destes sistemas leva ao aumento da expressão do operon *arnBCADTEF-ugd*, produzindo L-

Ara4N. Além disso, há o aumento de sistemas de efluxo (*mexXY*), concomitantemente com a diminuição da expressão de *oprD*. Fonte: EL ZOWALATY et al., 2015.

O primeiro relato de resistência codificada pelo gene *mcr* (*plasmid-mediated colistin resistance*) mediado por plasmídeo foi realizado por Liu e colaboradores em novembro de 2015. Desde então, diversos trabalhos foram realizados com o intuito de descrever a disseminação deste gene dentre os isolados e desvendar os possíveis mecanismos de resistência atrelados à expressão do gene *mcr*. Atualmente foram descritos as variantes *mcr-1* (*mcr-1.2*), *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* e a sequência deduzida dos aminoácidos destes genes apresenta identidade com fosfoetanolamina transferase, uma enzima que catalisa a adição da fosfoetanolamina no lipídeo A, levando a diminuição da afinidade da colistina ao lipopolissacarídeo (LIU et al., 2016; 2017; BOROWIAK et al., 2017; CARATTOLI et al., 2017; BAKTHAVATCHALAM et al., 2017).

O sequenciamento completo do plasmídeo pHNSHP45 de 64015 pares de base (pb) revelou que o gene *mcr-1* é composto por 1626 pb. Além disso, o sequenciamento do plasmídeo IncX4 de 35104 pb mostrou a presença do gene *mcr-2*. Em ambos os casos, investigações a respeito do contexto genético mostram sequências de inserção *ISAp11* e *IS1595* à montante de *mcr-1* e *mcr-2*, respectivamente, sugerindo que estes genes podem ser mobilizados por estas IS (JEANNOT et al., 2017).

Embora os genes *mcr* tenham sido relatados em isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Shigella sonnei*, *Salmonella* spp., foi observada a capacidade de transferência do gene entre isolados clínicos de diferentes gêneros/espécies por ensaios de conjugação e transformação *in vitro*, inclusive em *P. aeruginosa*. Este fato é alarmante devido à facilidade de disseminação deste gene e conseqüente inviabilidade das polimixinas para o uso clínico (LIU et al., 2016; JEANNOT et al., 2017).

### **3.3 Fatores de virulência produzidos por *P. aeruginosa***

A versatilidade, a adaptabilidade, o repertório de determinantes de virulência, bem como a capacidade de evadir-se do sistema imunológico e dos

tratamentos antimicrobianos faz com que *P. aeruginosa* seja um dos patógenos mais temidos. Assim, o potencial patogênico de *P. aeruginosa* se dá tanto pela resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos, quanto pela sua capacidade de formação de biofilme e produção de um arsenal de fatores de virulência que incluem: determinantes associados à célula e a fatores secretórios solúveis como a produção de exotoxinas e proteases (KUNG et al., 2010; BALASUBRAMANIAN et al., 2013; MURAKI et al., 2013); além da motilidade e de produção de pigmentos, fatores bem estabelecidos como determinantes de virulência em *P. aeruginosa* (STOODLEY et al., 2002; LAVERTY et al., 2014; WANG et al., 2014). Os genes que codificam fatores que contribuem para a patogênese de *P. aeruginosa* estão localizados em ilhas patogênicas (PAPI-1 e PAPI-2) e em ilhas genômicas (PAGIs) (BATTLE et al., 2008; HARRISON et al., 2010; SINGH et al., 2014).

Este grande repertório de fatores de virulência e uma rede regulatória complexa de sinais intracelulares e intercelulares permitem que esta espécie se adapte e se multiplique no hospedeiro. Durante o estado patogênico, a bactéria pode aderir aos epitélios, causar rompimento dos tecidos, inativar elementos do sistema imunológico e, conseqüentemente, provocar lesão tecidual, morte celular e necrose (BALASUBRAMANIAN et al., 2013; REINHART; OGLESBY-SHERROUSE, 2016). Entretanto, a expressão de genes relacionados à adaptação e à produção de virulência varia enormemente, conseqüentemente, a virulência de cada isolado está intimamente relacionada ao seu hospedeiro (HILKER et al., 2015; DUBERN et al., 2015). Desta forma, diversos estudos mostram que a expressão de fatores de virulência pode variar inclusive com o curso da infecção, o sítio anatômico, o perfil de sensibilidade dos isolados e até mesmo de acordo com o tratamento das infecções (CROUSILLES et al., 2015; SILVA et al., 2014).

Basicamente, isolados recuperados de diferentes sítios anatômicos apresentam diferenças nos padrões de produção de fatores de virulência e isto é conseqüência das condições ambientais a que estas bactérias são expostas, como, por exemplo, concentrações de oxigênio e impacto do sistema imunológico (RAU et al., 2010). Durante a infecção, a relação entre patógeno e hospedeiro é bastante complexa, envolvendo uma variedade de moléculas bacterianas citotóxicas que prejudicam os processos celulares do hospedeiro e, aquelas que participam da resposta do seu sistema imunológico (MORADALI et al., 2017).

A análise do transcriptoma de *P. aeruginosa* mostrou que 14,0 e 19,0% dos transcritos estavam diferencialmente expressos durante o curso de infecção experimental aguda e crônica, respectivamente. Entre eles, transcritos que codificam a síntese do sideróforo pioquelina, de ramnolipídeos e de protease alcalina foram fortemente regulados positivamente em ambos os modelos. Além disso, outros genes foram diferencialmente regulados em cada caso (CROUSILLES et al., 2015). Outros estudos ressaltam que a expressão de fatores como *pili*, exoenzimas, proteases, exotoxina A, fosfolipase C e pigmentos (pioverdina) são preponderantes na fase aguda enquanto genes relacionados à produção de biofilme e alginato são expressos na fase crônica (GOODMAN et al., 2004; KEITH et al., 2014; TURNER et al., 2014; SERRA et al., 2015; SULEMAN, 2016; DI DOMENICO et al., 2017).

Esta mudança de expressão também pode ser visualizada em isolados de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes com fibrose cística, uma vez que nos estágios iniciais da colonização do pulmão um grande número de fatores de virulência e de resistência intrínseca medeia a sobrevivência do patógeno. Após a infecção, estas bactérias são expostas a respostas inflamatórias e ao tratamento com antibióticos (TURNER et al., 2014). Estes fatores de estresse ambiental induzem a expressão de diferentes genes que permitem a adaptação do microrganismo, mudando para o fenótipo persistente e resistente ao se tornar menos virulento, como na formação de biofilme (POOLE, 2012; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Recentemente, trabalhos mostraram a interferência da resistência na virulência de *P. aeruginosa* e foi observado que a hiperprodução de sistemas de efluxo foi responsável pela redução na produção de fatores de virulência como produção de piocianina, de elastase e de citotoxinas pelo sistema de secreção do tipo III (T3SS). Sabe-se que o gene *ampR* regula diversos genes além de *ampC*, tais como genes codificadores de *quorum sensing*, piocianina e elastase. Desta forma, foi mostrado que isolados deficientes de AmpR apresentam produção de piocianina e elastase diminuída. Além disso, a perda de porina foi relacionada ao aumento da colonização e disseminação em modelos murinos, entretanto a perda de porina não interferiu na produção de exopolissacarídeos e no T3SS (BALASUBRAMANIAN et al., 2013; PÉREZ-GALLEGU et al., 2016; GEISINGER; ISBERG, 2017).

Segundo Sánchez-Diener (2017), há uma correlação inversa entre resistência e virulência em modelos de *Caenorhabditis elegans*, uma vez que a proporção de isolados não virulentos aumenta drasticamente de acordo com o perfil de resistência (de 7,9% nos isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados para 40,0% para isolados ER). Além disso, foi observado que isolados que acumulam múltiplos mecanismos de resistência apresentam diminuição na produção de fatores de virulência, entretanto, com aumento na formação de biofilme (KAISER et al., 2017). Estes resultados reforçam as evidências de que a aquisição de genes de resistência é associada a um custo de *fitness* que resulta na redução da virulência dos isolados (SUN et al., 2013; PEÑA et al., 2015; OLIVARES-PACHECO et al., 2017).

### 3.3.1 *Quorum sensing*

A comunicação entre células usando sinais químicos específicos é um sistema bem conhecido em bactérias, sendo denominado *quorum sensing* (QS). QS controla o comportamento social destas bactérias por múltiplas vias de sinalização interligadas (KARIMINIK et al., 2017). Isto permite que as comunidades bacterianas regulem uma variedade de processos biológicos, inclusive o controle da expressão de fatores de virulência (JIMENEZ et al., 2012; PASSMORE et al., 2015), que propiciam a adaptação e sobrevivência do microrganismo durante a patogênese (MORADALI et al., 2017; MAISURIA et al., 2017).

O progresso da fase aguda para crônica da infecção é altamente influenciado pela expressão de genes dependentes de QS, os quais regulam a expressão de outros genes envolvidos na produção de fatores de virulência e de vias metabólicas de resposta ao estresse (VENTURI, 2006; WILLIAMS; CÁMARA, 2009; BARR et al., 2015). Além disso, o papel do QS na virulência de *P. aeruginosa* foi observado ao detectarem-se mutações em genes de QS em isolados que apresentaram uma produção de fatores de virulência deficiente (CROUSILLES et al., 2015).

Quatro vias principais de sinalização dependentes de QS são descritas em *P. aeruginosa*: Las, Rhl, Pqs e IQS, as quais constituem uma rede hierárquica mediadora da integração de múltiplos sinais. Os sistemas Las, Rhl e Pqs são formados por dois elementos principais: uma proteína reguladora (LasR, RhlR e

PqsR) e por seu autoindutor específico (LasI, RhII e PqsABCDH). Os autoindutores sintetizam moléculas sinalizadoras que são exportadas/importadas e, em seguida, se complexam às proteínas reguladoras que interferem na expressão de genes de virulência (MORADALI et al., 2017). O transporte das moléculas sinalizadoras para o meio extracelular não é bem compreendido, mas é proposto que seja mediado por difusão, transportadores de membrana (sistemas de efluxo) ou vesículas (MASHBURN; WHITELEY, 2005; MARTINEZ et al., 2009; ALCALDE-RICO et al., 2016). Lee e colaboradores (2013) descreveram o isolamento de uma molécula de sinalização, a IQS (2-(2-hidroxyfenil)-tiazol-4-carbaldeído), entretanto seu papel na regulação da expressão de genes ainda precisa ser desvendado. Até o momento evidências sugerem que IQS controla a expressão de muitos genes associados à QS e à virulência (SHANG et al., 2014).

Estudos indicam que os sistemas LasR e RhIR, e não o sistema PQS, desempenham papéis principais na adaptação e resposta ao estresse ambiental, como estresse oxidativo, calor, metal pesado e concentração de sais (GARCÍA-CONTRERAS et al., 2015). LasR reside no topo da cascata de sinalização e, juntamente com RhIR, medeia a sinalização QS em estágios iniciais da fase de crescimento exponencial enquanto a via de sinalização PQS é ativa em fase de crescimento exponencial tardia (CHOI et al., 2011). LasR em *P. aeruginosa* foi inicialmente identificada como uma chave regulatória na expressão do gene *lasB*, que codifica uma elastase. Subsequentemente, foi mostrado que LasR é requerido para a transcrição dos genes *aprA*, *lasA* e *toxA* que codificam proteases, e então, foi considerado um regulador global da virulência de *P. aeruginosa* (LEE; ZHANG, 2015).

Além disso, sistemas de QS, especialmente IQS e PQS, em condições de deficiência de ferro, levam a um aumento na produção de fatores de virulência como ramnolipídeos, exotoxinas, proteases e, conseqüentemente, aumentam a citotoxicidade bacteriana no tecido hospedeiro promovendo a sobrevivência do patógeno (DONG et al., 2008; ZABORIN et al., 2009; BAINS et al., 2012; LEE et al., 2013; NGUYEN et al., 2015). A produção de IQS também é ativada por limitação de fosfato, um estresse que a bactéria comumente encontra enquanto estabelece uma infecção após uma cirurgia maior ou ferimento em um órgão (SHANG et al., 2014).

### 3.3.2 Fatores de Virulência Secretados

#### 3.3.2.1. Pigmentos piocianina e pioverdina

A piocianina é um metabólito secundário regulado por QS produzido por *P. aeruginosa*. Este pigmento (piocianina: 1-hidróxi-5-metil-fenazina) determina a coloração azulada em pH neutro ou alcalino e vermelha em pH ácido. A piocianina é uma toxina que interfere em várias funções celulares da célula hospedeira, incluindo o transporte de elétrons, a respiração celular, o metabolismo energético, a expressão gênica e os mecanismos imunológicos, causando apoptose de neutrófilos (VINCKX et al., 2010; RADA et al., 2013; HEIDARI et al., 2017). Este pigmento desempenha efeitos tóxicos nos tecidos do hospedeiro, principalmente no epitélio respiratório. Estudos mostram que a biossíntese de piocianina é necessária para a virulência de *P. aeruginosa* em casos de sepse e pneumonia em modelos murinos. Além disso, foram detectadas elevadas concentrações deste pigmento em escarros de pacientes com fibrose cística (NOTO et al., 2017).

A pioverdina é o principal sideróforo produzido por *P. aeruginosa*, principalmente em baixas condições de ferro (CORNELIS; DINGEMANS, 2013). Esta molécula apresenta alta afinidade pelo ferro ( $Fe^{3+}$ ) e é extremamente importante na captação deste cátion (SCHALK; GUILLON, 2013), competindo pelo ferro ligado às proteínas transferrina e lactoferrina dos fluidos extracelulares e ferritina e hemoglobina intracelulares (CORNELIS; DINGEMANS, 2013). Em adição, a pioverdina pode regular outros fatores de virulência como a produção de proteases (protease alcalina, exotoxina A) e a formação de biofilme (LLAMAS et al., 2014; WEIGERT et al., 2016).

#### 3.3.2.2 Sistemas de secreção de proteínas

*P. aeruginosa* é capaz de secretar diversas exoenzimas que interagem com alvos específicos e produzem danos aos tecidos do hospedeiro. As proteases desempenham um importante papel na patogênese de *P. aeruginosa*. Dentre as 5568 fases abertas de leitura codificadas no genoma da cepa PA01, 155 (2,8%) foram listadas como proteases no banco de dados MEROPS (HOGE et al., 2010). Atualmente 379 peptidases conhecidas ou prováveis peptidases estão

listadas neste mesmo banco (<https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>, acesso em 07/12/2017). Além disso, produzem fosfolipases, exotoxinas e endotoxinas (CROUSILLES et al., 2015).

Até o momento foram identificados seis tipos de sistemas de secreção, designados do tipo I a VI (T1SS a T6SS) e todos estão presentes em *P. aeruginosa* com exceção do T4SS (FILLOUX, 2011). Por meio destes sistemas, a bactéria secreta uma série de fatores de virulência (na sua maioria toxinas ou enzimas hidrolíticas) para o meio extracelular (sistemas secretórios do tipo 1, 2 e 5) ou para o citosol das células do hospedeiro (sistemas secretórios do tipo 3 e 6) (BLEVES et al., 2010).

Em *P. aeruginosa* os sistemas de secreção do tipo 1 (T1SS), os mais simples descritos, requerem apenas uma proteína de membrana externa, um transportador (que está inserido na membrana interna e que disponibiliza energia para o processo de transporte) e uma proteína adaptadora que conecta os dois componentes (DELEPELAIRE, 2004; HOLLAND et al., 2005; BLEVES et al., 2010). O principal sistema T1SS é o Apr que secreta a protease alcalina e o outro, HasA, secreta uma proteína envolvida na captura de ferro, crucial em estágios iniciais da infecção (BLEVES et al., 2010).

A protease alcalina (AprA) é uma metalo-protease, zinco-dependente, e é um dos fatores de virulência mais estudados em *P. aeruginosa*. A AprA cliva diversas proteínas biologicamente importantes do hospedeiro, incluindo laminina (componente da lâmina basal) e componentes do sistema imunológico como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6), resultando em uma resposta imunológica do hospedeiro prejudicada e consequente sobrevivência bacteriana no tecido humano. Recentemente foi descrito que a AprA contribui para a produção de piocianina, pigmento responsável pelo estresse oxidativo nas células hospedeiras. (POBIEGA et al., 2016; GALDINO et al., 2016; BADAMCHI et al., 2017; IYAMA et al., 2017).

O sistema de secreção do tipo 2 (T2SS) (Figura 5) é um dos mais versáteis sistemas utilizados para secretar proteínas extracelulares no ambiente circundante. Este sistema é composto por 11 a 16 diferentes proteínas formando uma estrutura de três partes: uma base na membrana interna, um canal embebido na membrana externa e uma estrutura fimbriar. Este pseudopilus secreta as proteínas (exotoxina A, elastases, fosfatase alcalina, fosfolipases e lipases) para o

meio extracelular (Figura 5) (BLEVES et al. 2010, FILLOUX, 2011; JYOT et al., 2011). Dois sistemas T2 foram descritos em *P. aeruginosa*, o sistema Xcp (que transporta a maioria das proteínas) e o sistema Hxc que exporta a fosfatase alcalina, LapA (CROUSILLES et al., 2015).

A exotoxina A (ExoA ou ToxA), principal membro do T2SS (Figura 5), é reconhecida pela capacidade de inibição da síntese proteica de células eucarióticas, bem como pela eficiência em causar danos teciduais e diminuição da atividade fagocítica por neutrófilos (FARAJI et al., 2016).

Das proteases, as elastases desempenham um papel importante nas infecções agudas causadas por *P. aeruginosa* e estas enzimas foram detectadas principalmente em isolados de urina e secreção traqueal (GALDINO et al., 2016). A elastase, codificada pelo gene *lasB*, assim como a *AprA*, também é uma metalo-protease que destrói proteínas eucarióticas como colágeno, fibrinogênio, laminina, transferrina e elastina, levando à disrupção das junções aderentes de células do endotélio vascular. Além disso, esta protease também inativa componentes do sistema imunológico (POBIEGA et al., 2014; SULEMAN, 2016; GALDINO et al., 2016) e favorece a formação de biofilme (YU et al., 2014). Outra elastase (*LasA*) potencializa a atividade de *LasB*. No hospedeiro, a elastase induz a destruição da córnea em casos de queratite e reduz a elasticidade do pulmão (MANOS et al., 2013; OKA et al., 2015; SAINT-CRIQ et al., 2017).

Ainda pelo T2SS, *P. aeruginosa* é capaz de secretar dois tipos de fosfolipases, a fosfolipase C e a fosfolipase H (fosfolipase hemolítica) (Figura 5), codificados pelos genes *plcN* e *plcH*, respectivamente. A produção destas fosfolipases, principalmente de *PlcH*, permite a degradação de esfingomielina e fosfatidilcolina, lipídeos de membranas celulares e de surfactantes pulmonares. Consequentemente, a produção deste fator de virulência causa o aumento da permeabilidade celular e de danos teciduais, assim como, propicia o aumento de atividades pró-inflamatórias e inibição de neutrófilos (JACKSON et al., 2013; ULLAH et al., 2017; ELLAPPAN et al., 2017).

Tanto T2SS quanto T5SS secretam as substâncias em duas etapas: primeiramente as proteínas são sintetizadas como precursores, o peptídeo terminal da proteína é usado como sinal para os translocadores da membrana interna da célula, que enviam a molécula para o espaço periplasmático os quais, por sua vez, usarão os sistemas (T2SS ou o T5SS) para atravessar a membrana externa e

alcançar o espaço extracelular (BLEVES et al., 2010). O sistema T5SS pode ser dividido em T5aSS e T5bSS (Figura 5) que secretam a esterase (EstA) associada a superfície celular e a exoprotease (LepA), respectivamente. A esterase (EstA) é uma proteína autotransportadora produzida por *P.aeruginosa* e requerida para produção de ramnolipídeos, na motilidade celular e na formação de biofilme (WILHELM et al., 2007). O papel da exoprotease (LepA) tem sido pouco estudado, entretanto sabe-se que esta protease induz a resposta inflamatória e degrada a hemoglobina para adquirir ferro nesta espécie bacteriana (KIDA et al., 2011).

Entre todos os sistemas de secreção, o T3SS é de extrema relevância para a virulência de *P. aeruginosa*, devido a sua ubiquidade entre os diferentes isolados. Além disso, tem sido mostrada uma associação entre a presença de citotoxinas deste sistema com o desfecho clínico desfavorável e maiores taxas de mortalidade em humanos (EL-SOLH et al., 2012; PEÑA et al., 2013). Este sistema é composto por 43 genes, que codificam proteínas estruturais (envolvidas com translocação e secreção) e regulatórias (FRANK, 1997). T3SS é uma estrutura altamente conservada em bactérias Gram-negativas e consiste em uma estrutura complexa semelhante a uma “seringa” que injeta proteínas (efetoras) presentes no citoplasma bacteriano diretamente no compartimento citosólico da célula hospedeira (ROY et al., 2010; HUBER et al., 2016; BERUBE et al., 2017).

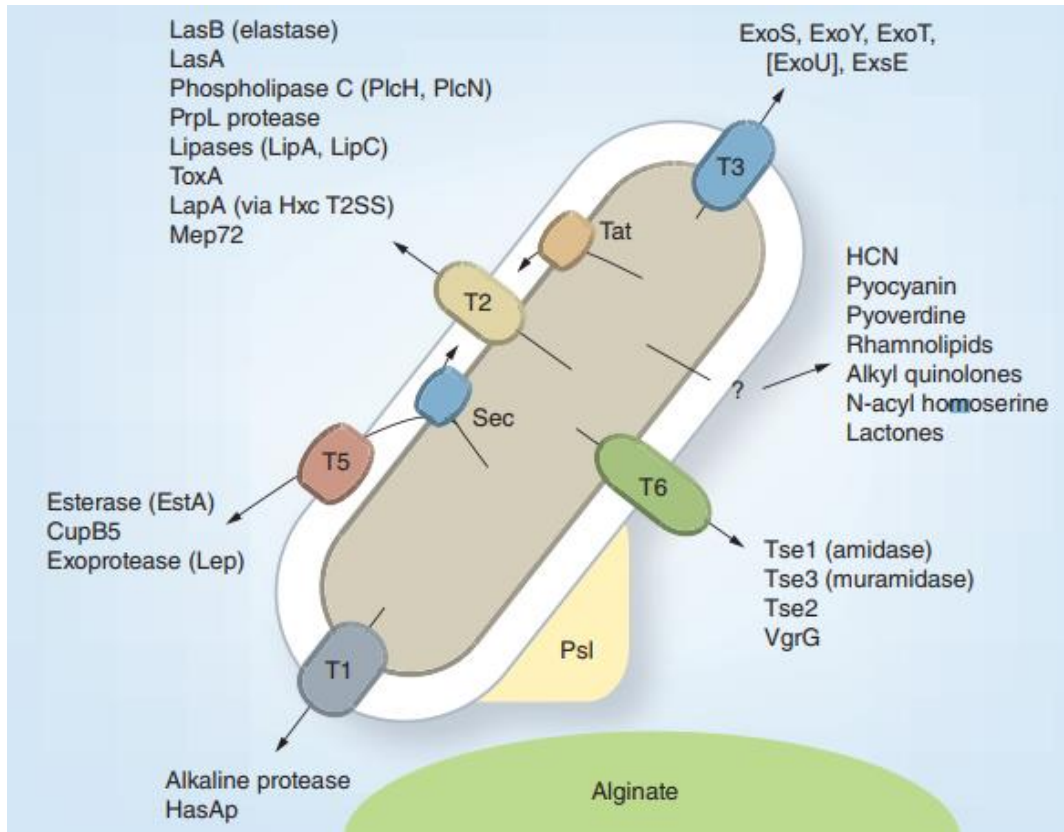
Existem quatro citotoxinas efetoras do sistema III de secreção conhecidas: ExoT, ExoY, ExoS e ExoU (Figura 5). A produção de cada uma destas diferentes exoenzimas determina injúrias distintas no tecido hospedeiro (BLEVES et al., 2010; PEÑA et al., 2015). Entretanto, este sistema é, basicamente, responsável pelo dano tecidual, evasão e supressão do sistema imunológico, indução de apoptose de neutrófilos e supressão do sistema imunológico, permitindo a disseminação bacteriana (ZHANG et al., 2014).

As exotoxinas T e Y são encontradas basicamente em todos os isolados de *P. aeruginosa*, enquanto as exotoxinas S e U são menos prevalentes (JUAN et al., 2017). As citotoxinas ExoT, menos potente que a ExoS, é relacionada à modulação da internalização bacteriana por células eucarióticas. Sabe-se que ExoY tem atividade de adenilato ciclase (converte ATP em AMPc) e causa o arredondamento das células do hospedeiro, entretanto, não tem sido implicada diretamente nos efeitos tóxicos na célula (FELTMAN et al., 2001; BERUBE et al., 2017).

A ExoS, uma toxina bifuncional codificada pelo gene *exoS*, tem sido detectada em 58,0-80,0% dos isolados de *P. aeruginosa*, sendo associada a um fenótipo invasivo (HAUSER, 2009; BERUBE et al., 2017). Esta exotoxina rompe a actina do citoesqueleto da célula hospedeira inibindo a fagocitose, causa morte da célula hospedeira e conseqüentemente aumenta a disseminação bacteriana no tecido hospedeiro, bem como, promove a ativação de linfócitos levando à inflamação (ULLAH et al., 2016; BERUBE et al., 2017).

ExoU (também chamada de PepA) é menos frequente (28,0-42,0% dos isolados) e associada a um fenótipo altamente citotóxico e invasivo, sendo o determinante de maior impacto na virulência bacteriana (HAUSER, 2009; BERUBE et al., 2017). Isolados *exoU* positivos induzem resposta inflamatória que resulta em apoptose e necrose em macrófagos, células epiteliais e fibrócitos (ZHANG et al., 2014; PARK et al., 2016; 2017). Um recente estudo mostrou que o genótipo TTSS é o principal fator diferencial a ser considerado no desfecho clínico de bacteremia causada por *P. aeruginosa* (DUBERN et al., 2015). Diferenças no repertório de genes que codificam efetores do T3SS entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* conduzem à produção de diferentes fatores de virulência e, conseqüentemente, no desenvolvimento da doença (WAREHAM; CURTIS, 2007; FERREIRA et al., 2015; BERUBE et al., 2017).

O sistema T6SS (Figura 5), assim como o T3SS é um "injectisoma", ou seja, exporta proteínas diretamente da bactéria para o citoplasma da célula do hospedeiro. Este é um sistema altamente complexo, com uma maquinaria constituída por 12 a 25 proteínas acessórias (BLEVES et al., 2010). Em *P. aeruginosa* foram descritos três sistemas de T6SS (FILLOUX, 2011), entretanto, a secreção de Hcp1 (uma proteína formadora de nanotubos) é o único exemplo descrito deste sistema que foi detectada no escarro de pacientes com fibrose cística (SPÍNOLA-AMILIBIA, 2016).



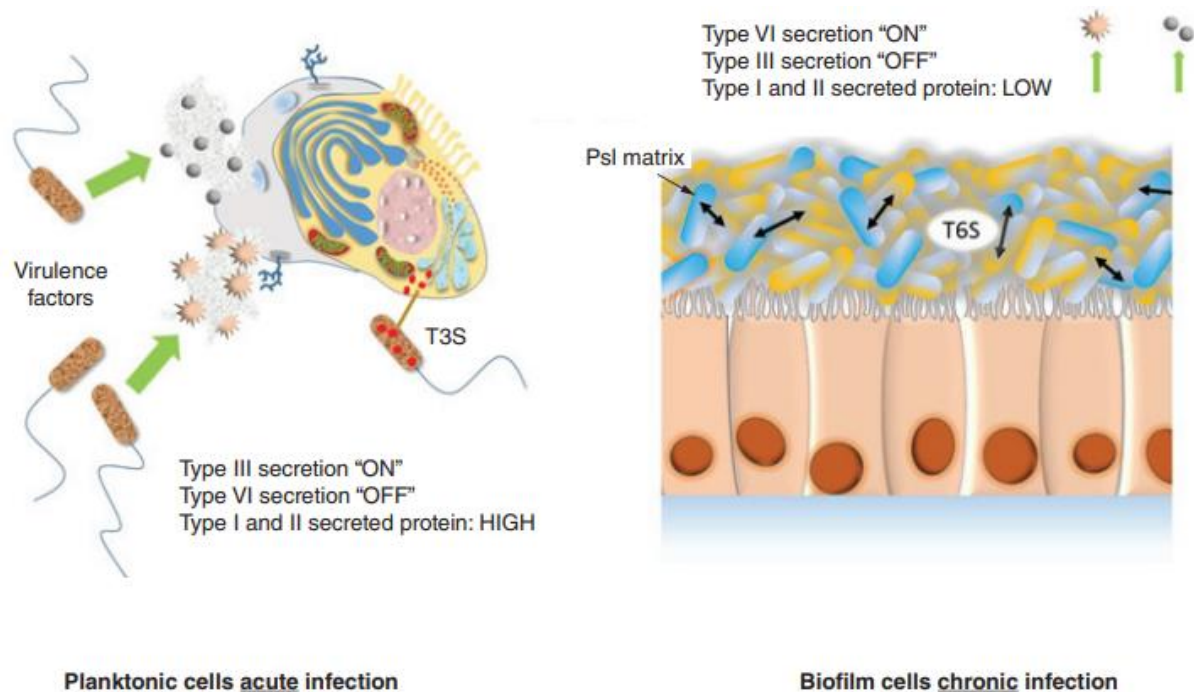
**Figura 5** - Sistemas de secreção e fatores de virulência secretados em *P. aeruginosa*. Fonte: CROUSILLES, 2015.

### 3.3.3 Adesão e Formação de Biofilme

Células móveis são facilmente detectadas pelo sistema imunológico do hospedeiro, desencadeando resposta inflamatória e fagocitose (AMIÉL et al., 2010). Desta forma, perder a mobilidade é uma vantagem de sobrevivência de bactérias patogênicas, inclusive *P. aeruginosa*. As células se fixam a uma superfície, ficam imóveis e agregadas formando microcolônias embebidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS: *extracellular polymeric substance*) que protege as bactérias do estresse ambiental (MORADALI et al., 2017).

O biofilme é considerado um importante fator de virulência em diversos casos de infecção por *P. aeruginosa* (MORADALI et al., 2017), sendo responsável por infecções crônicas e persistentes (WEI; MA, 2013). Essencialmente, as infecções crônicas são associadas a isolados sésseis (em biofilme), enquanto as infecções agudas envolvem células planctônicas (GOODMAN et al., 2004; VENTRE et al., 2006; LEE; YOON, 2017). A natureza aparentemente mais agressiva de

infecções agudas se dá pelo fato de células planctônicas secretarem fatores de virulência em maior quantidade do que células sésseis (CROUSILLES et al., 2015). Além disso, segundo Passmore e colaboradores (2015) nas diferentes condições (sésil/biofilme) os exoprodutos secretados são diferentes (Figura 6).



**Figura 6** - Diferenças na expressão de fatores de virulência nas fases agudas e crônicas da infecção. Na fase aguda, as células planctônicas secretam grande quantidade de exoproteínas que causam danos no tecido hospedeiro pelos sistemas de secreção do tipo 1, 2 e 3 (T1SS, T2SS e T3SS). Na fase crônica, há a formação do biofilme e predomínio do sistema de secreção do tipo 6 (T6SS), que favorece a produção do exopolissacarídeo Psl. Fonte: CROUSILLES et al., 2015

Diante da habilidade de formar biofilme, *P. aeruginosa* é capaz de sobreviver em condições adversas, locais contaminados e ambientes hospitalares (RADÓ et al., 2017). Desta forma, a capacidade de formação de biofilme é um determinante crucial para a persistência e, portanto, para a disseminação de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar (KAISER et al., 2017).

Devido ao revestimento polissacarídico e fisiologia alterada, os biofilmes são conhecidos por serem altamente resistentes às substâncias bactericidas, como desinfetantes e antibióticos, ao sistema imunológico (fagocitose, estresse oxidativo), às restrições de nutrientes e oxigênio, bem como pela proteção

contra os efeitos da radiação ultravioleta (DONLAN; COSTERTON, 2002; FLEMMING; WINGENDER, 2010; OLSEN, 2015; FLEMMING et al., 2016; DI DOMENICO et al., 2017). Além disso, a transferência horizontal de genes é aumentada no biofilme, sendo responsável pela aquisição de genes que codificam resistência aos antimicrobianos (MADSEN et al., 2012; LEBEAUX et al., 2014; STALDER; TOP, 2016). A baixa difusão dos antimicrobianos na matriz do biofilme também está associada ao desenvolvimento da resistência antimicrobiana, uma vez que pode selecionar células tolerantes expostas a concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos (PATEL, 2005; LEBEAUX et al., 2014).

A matriz do biofilme é constituída basicamente por exopolissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular (eDNA) e pode representar mais de 90,0% do peso seco da biomassa do biofilme (WEI; MA, 2013; KIM; LEE, 2016). Esta matriz cria um ambiente que propicia a comunicação entre as bactérias, bem como funciona como um reservatório de fontes nutritivas e energéticas para promover o crescimento microbiano enquanto protege estas células de condições desfavoráveis (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Os exopolissacarídeos Psl, Pel e alginato são os maiores constituintes da matriz do biofilme e juntamente com o eDNA determinam a arquitetura do biofilme (GHAFFOR et al., 2011). A composição dos exopolissacarídeos pode variar nos biofilmes e nos estágios do mesmo. Enquanto Psl e Pel são característicos nas fases iniciais do biofilme, o alginato passa a ser produzido durante a maturação conferindo um aspecto viscoso ou mucoide e garantindo a estabilidade estrutural, a proteção e a persistência do biofilme (MORADALI et al., 2017). Estes exopolissacarídeos desempenham um papel importante na resistência à resposta imunológica do hospedeiro e aos antimicrobianos (GHAFFOR et al., 2011; GELLATLY E HANCOCK, 2013; STREMPPEL et al., 2013).

O eDNA apresenta diversos papéis na formação de biofilme, dentre eles pode-se ressaltar: a contribuição para a formação de gradientes de cátions ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ), pode servir como fonte de nutrientes, e pode coordenar movimentos celulares e conferir resistência aos antimicrobianos (ALLESEN-HOLM et al., 2006; MULCAHY et al., 2008; GLOAG et al., 2013).

Assim como acontece com muitas bactérias, a adesão às células do hospedeiro é crítica para o estabelecimento da infecção. O flagelo e os *pili* são

estruturas motoras que permitem o movimento chamado *swimming* e *twitching*, respectivamente. Estas estruturas, principalmente *pili* do tipo IV, estão associadas a isolados virulentos (WINSTANLEY et al., 2016). Tanto o flagelo quanto os *pili* não são considerados constituintes clássicos do biofilme, entretanto, são extremamente importantes para a maturação do biofilme, uma vez que conferem a adesão inicial para o desenvolvimento do mesmo (MANN; WOZNIAK, 2012). A adesão, principalmente no epitélio respiratório, é favorecida pela produção de uma neuraminidase extracelular, codificada pelo gene *nanI* (DAVIES et al., 1999). Pouco se sabe da função desta enzima e quais condições favorecem sua produção em *P. aeruginosa*. Entretanto, foi relatado que a frequência desse gene foi menor em isolados sensíveis quando comparados com isolados ER (KAISER et al., 2017).

A expressão de fatores de virulência pode variar de acordo com o sítio anatômico, progressão da doença, perfil de resistência dos isolados e tratamento das infecções. Desta forma, isolados de *P. aeruginosa* ER são fortemente formadores de biofilme, diferindo significativamente de isolados clínicos não-ER (KAISER et al., 2017). Além disso, a capacidade de formação de biofilme pode ser aumentada quando a bactéria é submetida à concentrações dentro da faixa terapêutica de antibióticos. Isto foi recentemente verificado por Kaiser e colaboradores (2017) onde dentro do grupo de isolados ER, uma grande subpopulação de células foi capaz de aumentar a formação de biofilme em resposta à exposição ao meropenem. Esta habilidade parece ser vantajosa para sobrevivência e persistência de *P. aeruginosa* no hospedeiro.

### **3.4. Tipagem Molecular em *P. aeruginosa***

Técnicas de tipagem molecular, como *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis* (RFLP), *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST) facilitam o entendimento a respeito das rotas de transmissão de infecções hospitalares por *P. aeruginosa*, bem como, definem os efeitos das intervenções (SUZUKI et al., 2016; AUDA et al., 2017). Contudo, apesar do desenvolvimento de diversas ferramentas moleculares para fornecer dados da epidemiologia hospitalar,

ainda restam dificuldades para a implementação destas técnicas, principalmente em relação à estrutura laboratorial, profissionais e custos (YUN et al., 2016).

O PFGE é um método baseado na digestão do DNA genômico bacteriano por enzima de restrição e tem sido considerado “padrão-ouro” para o fornecimento de dados a respeito de surtos hospitalares, inclusive em *P. aeruginosa*. Esta técnica é altamente discriminativa, entretanto, requer muitas etapas laboratoriais, demandando tempo e profissionais treinados, limitando a utilização em laboratórios clínicos. Além disso, os padrões de bandas podem variar, o que torna difícil comparar resultados de diferentes estudos e/ou hospitais (YUN et al., 2016; SUZUKI et al., 2016).

Desta forma, outras metodologias mais simples foram desenvolvidas, buscando o mesmo poder de discriminação e resultados contundentes (BROSSIER et al., 2015). Destes, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence* (ERIC)-PCR tem sido amplamente utilizado em BGN, principalmente enterobactérias, entretanto o seu uso tem aumentado em *P. aeruginosa*. Esta técnica se baseia na amplificação de regiões repetidas do genoma bacteriano, formando padrões de bandas. Recentemente mostrou-se que o ERIC-PCR parece ser mais confiável em relação aos demais métodos baseados em PCR (AUDA et al., 2017). Tanto PFGE quanto ERIC-PCR geram padrões de bandas que precisam ser analisados por softwares e estes sistemas costumam ser onerosos, o que dificulta ainda mais a utilização destas técnicas em laboratórios clínicos de rotina.

A análise por MLST se baseia na amplificação e sequenciamento de sete genes que compõem o metabolismo (genes *housekeeping*) de *P. aeruginosa* (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, *trpE*) (CURRAN et al., 2004). Esta metodologia demanda muitas etapas, inclusive a análise de sequências, e a complexidade torna difícil sua utilização em laboratórios de microbiologia clínica (AUDA et al., 2017). Contudo, esta metodologia apresenta altos níveis de concordância com o PFGE, e ainda possibilita a comparação entre isolados de diversas regiões no mundo em seu banco de dados ([pubmlst.org/paeruginosa](http://pubmlst.org/paeruginosa)) (WATERS et al., 2012; ANNEAR et al., 2017).

Atualmente, o banco de dados MLST apresenta 2758 *Sequence Types* (STs), em muitos casos, um ST apresenta um ou poucos isolados, entretanto alguns poucos STs estão associados a muitos isolados

(<http://pubmlst.org/paeruginosa>, acesso em 07/12/2017). Recentemente, foram apresentadas evidências da existência de isolados de *P. aeruginosa* MR/ER associados a clones disseminados em hospitais de todo o mundo e estes clones são denominados clones de alto risco, os quais tem desempenhado um papel principal na disseminação da resistência mundial. Os ST235, ST111 e ST175 são os ST mais difundidos mundialmente e em adição a estes três clones, o ST277 tem tido relevância devido a alta prevalência no Brasil, geralmente associado à disseminação de SPM-1 (SILVA et al., 2011; OLIVER et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2016).

Dos clones de alto risco, o ST235 é o mais disseminado mundialmente, sendo denominado por clone internacional de alto risco. Aproximadamente 100 diferentes determinantes de resistência já foram reportados em isolados de *P. aeruginosa* pertencentes a este clone, incluindo genes de resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, rifampicina e cloranfenicol. Diversos genes codificadores de carbapenemases têm sido associados a este clone sendo *bla*<sub>VIM-2</sub> o mais frequente, seguido pelos genes codificadores de variantes de IMP, OXA, GES, KPC e NDM (OLIVER et al., 2015; TREEPONG et al., 2017).

Mulet e colaboradores (2013) avaliaram potenciais marcadores biológicos que possibilitam o sucesso destes clones e foi observado que os mesmos apresentaram maior formação de biofilme e frequência de mutação espontânea. Em contrapartida, produziram menos pigmentos (pioverdina e piocianina) e reduziram a motilidade, características observadas em infecções crônicas e persistentes.

O sistema de secreção do tipo III (T3SS) é um importante fator diferencial dentre os três clones de alto risco de *P. aeruginosa*, uma vez que isolados pertencentes ao ST235 apresentam a produção da citotoxina ExoU (e não de ExoS) enquanto que os demais (ST111 e ST175) produzem ExoS (e não ExoU). ExoU é um determinante de grande impacto na virulência bacteriana uma vez que a produção desta citotoxina leva a uma injúria maior no tecido hospedeiro. Desta forma, a produção de ExoU por isolados pertencentes ao ST235 tem sido relacionada a um pior desfecho clínico dos pacientes, inclusive, foi associada ao aumento da mortalidade em casos de bacteremias por *P. aeruginosa* (EDELSTEIN et al., 2013; POBIEGA et al., 2015; PEÑA et al., 2015).

Estudos com modelos murinos infectados por isolados pertencentes aos três clones de alto risco mostraram que a infecção pelo isolado pertencente ao

ST235 foi responsável por maior taxa de mortalidade, bem como maior contagem de *P. aeruginosa* no fluido peritoneal dos animais (GÓMEZ-ZORRILLA et al., 2016). Recentemente, em modelos de *C. elegans*, o ST235 mostrou-se mais virulento em relação aos demais, o que mais uma vez foi atribuído à produção de ExoU (SÁNCHEZ-DIENER et al., 2017).

Compreender a interação entre clones de alto risco, resistência antimicrobiana e virulência é de grande relevância para inferir o desfecho clínico das infecções por *P. aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

- ABIRI, R.; MOHAMMADI, P.; SHAVANI, N.; REZAEI, M. Detection and Genetic Characterization of Metallo- $\beta$ -Lactamase IMP-1 and VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Strains From Different Hospitals in Kermanshah, Iran. **Jundishapur J Microbiol**, v. 9, p. e22582, 2015.
- AESCHLIMANN, J.R. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. **Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Pharmacotherapy.**, v. 23, p. 916-24, 2003
- AL-AGAMY, M.H.; JEANNOT, K.; EL-MAHDY, T.S.; SAMAHA, H.A.; SHIBL, A.M.; PLÉSIAT, P.; COURVALIN, P. Diversity of Molecular Mechanisms Conferring Carbapenem Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Saudi Arabia. **Can J Infect Dis Med Microbiol**. 2016:4379686, 2016.
- ALBUQUERQUE, S.E.; CAVALCANTE, R.D.E.S; PONCE, D.; FORTALEZA, C.M. Epidemiology of healthcare-associated infections among patients from a hemodialysis unit in southeastern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 18, p. 327-30, 2014.
- ALCALDE-RICO M, HERNANDO-AMADO S, BLANCO P, MARTÍNEZ JL. Multidrug Efflux Pumps at the Crossroad between Antibiotic Resistance and Bacterial Virulence. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1483, 2016.
- ALLESEN-HOLM M, BARKEN KB, YANG L, KLAUSEN M, WEBB JS, KJELLEBERG S, MOLIN S, GIVSKOV M, TOLKER-NIELSEN T. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Mol Microbiol**, v. 59, p. 1114-28, 2006.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ DA, GARZA-MAYÉN GS, VÁZQUEZ-LÓPEZ R. Quinolones. Nowadays perspectives and mechanisms of resistance. **Rev Chilena Infectol.**, v. 32, p. 499-504, 2015.
- AMBLER RP. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, p. 321-31, 1980.
- AMIEL, E.; LOVEWELL, R.R.; O'TOOLE, G.A.; HOGAN, D.A.; BERWIN, B. *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming

motility and is independent of flagellum expression. **Infect Immun.**, v. 78, p. 2937-45, 2010.

ANNEAR, D.; BLACK, J.; GOVENDER, S. Multilocus Sequence Typing of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients presenting at Port Elizabeth Hospitals, South Africa. **Afr J Infect Dis.**, v. 11, p. 68-74, 2017.

ANVARINEJAD, M.; POULADFAR, G.; JAPONI, A.; BOLANDPARVAZ, S.; SADIQI, Z.; ABBASI, P.; MARDANEH, J. Isolation and Antibiotic Susceptibility of the Microorganisms Isolated from Diabetic Foot Infections in Nemazee Hospital, Southern Iran. **J Pathog**, v. 2015, p. 328796, 2015.

ARAUJO, B.F.; FERREIRA, M.L.; CAMPOS, P.A.; ROYER, S.; BATISTÃO, D.W.; DANTAS, R.C.; GONÇALVES, I.R.; FARIA, A.L.; BRITO, C.S.; YOKOSAWA, J.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* Carrying aac(6)-Ib-cr, qnrS1 and blaSPM Genes in Brazil. **PLoS One.**, v. 11, p. e0155914, 2016.

ARIVETT, B.A.; REAM, D.C.; FIESTER, S.E.; KIDANE, D.; ACTIS, L.A. Draft Genome Sequences of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Wounded Military Personnel. **Genome Announc**, v. 4, p. e00829-16, 2016.

ARROYO, L.A.; HERRERA, C.M.; FERNANDEZ, L.; HANKINS, J.V.; TRENT, M.S.; HANCOCK, R.E. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, p. 3743-51, 2011.

AUDA, I.G.; AL-KADMY, I.M.; KAREEM, S.M.; LAFTA, A.K.; A'AFFUS, M.H.; KHIT, I.A.; AL KHERAIF, A.A.; DIVAKAR, D.D.; RAMAKRISHNAIAH, R. RAPD- and ERIC-Based Typing of Clinical and Environmental *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. **J AOAC Int.**, v. 100, p. 532-536, 2017.

AUSTIN, A.; LIETMAN, T.; ROSE-NUSSBAUMER, J. Update on the Management of Infectious Keratitis. **Ophthalmology.**, v. 124, p. 1478-89, 2017.

BADAMCHI, A.; MASOUMI, H.; JAVADINIA, S.; ASGARIAN, R.; TABATABAEE, A. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. **Microb Pathog**, v. 107, p. 44-7, 2017.

- BADER, M.S.; LOEB, M.; BROOKS, A.A. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. **Postgrad Med**, v. 129, p. 242-258, 2017.
- BAINS, M.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R.E. Phosphate starvation promotes swarming motility and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, p. 6762-8, 2012.
- BAKTHAVATCHALAM, Y.D.; PRAGASAM, A.K.; BISWAS, I.; VEERARAGHAVAN, B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanism: an update. **J Glob Antimicrob Resist**. pii: S2213-7165(17)30177-7, 2017.
- BĂLĂȘOIU, M.; BĂLĂȘOIU, A.T.; MĂNESCU, R.; AVRAMESCU, C.; IONETE, O. *Pseudomonas aeruginosa* resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods. **Curr Health Sci J**, v. 40, p. 85-92, 2014.
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Res**, v. 41, p. 1-20, 2013.
- BALERO DE PAULA, S.; CAYÔ, R.; STRELING, A.P.; SILVA NODARI, C.; PEREIRA MATOS, A.; ECHES PERUGINI, M.R.; GALES, A.C.; CARRARA-MARRONI, F.E.; YAMADA-OGATTA, S.F. Detection of *bla*<sub>VIM-7</sub> in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 89, p. 80-82, 2017.
- BATTLE, S.E.; MEYER, F.; RELLO, J.; KUNG, V.L.; HAUSER, A.R. Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. **J Bacteriol**, v. 190, p. 7130-40, 2008.
- BARR, H.L.; HALLIDAY, N.; CÁMARA, M.; BARRETT, D.A.; WILLIAMS, P.; FORRESTER, D.L.; SIMMS, R.; SMYTH, A.R.; HONEYBOURNE, D.; WHITEHOUSE, J.L.; NASH, E.F.; DEWAR, J.; CLAYTON, A.; KNOX, A.J.; FOGARTY, A.W. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. **Eur Respir J.**, v. 46, p. 1046-54, 2015.
- BERRAZEG, M.; JEANNOT, K.; NTSOGO-ENGUÉNÉ, V.Y., BROUTIN, I.; LOEFFERT, S.; FOURNIER, D.; PLÉSIAT, P. Mutations in  $\beta$ -Lactamase AmpC

Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 6248-55, 2015.

BERUBE, B.J.; MURPHY, K.R.; TORHAN, M.C.; BOWLIN, N.O.; WILLIAMS, J.D.; BOWLIN, T.L.; MOIR, D.T.; HAUSER, A.R. Impact of Type III Secretion Effectors and of Phenoxyacetamide Inhibitors of Type III Secretion on Abscess Formation in a Mouse Model of *Pseudomonas aeruginosa* Infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, p. e01202-17, 2017.

BIALVAEI, A.Z.; SAMADI KAFIL H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. **Curr Med Res Opin.**, v. 31, p. 707-21, 2015.

BISWAS, S.; BRUNEL JM, DUBUS JC, REYNAUD-GAUBERT M, ROLAIN JM. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 10, p. 917-34, 2012.

BLEVES, S.; VIARRE, V.; SALACHA, R.; MICHEL, G.P.; FILLOUX, A.; VOULHOUX, R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. **Int J Med Microbiol.**, v. 300, p. 534-43, 2010.

BOROWIAK, M.; FISCHER, J.; HAMMERL, J.A.; HENDRIKSEN, R.S.; SZABO, I.; MALORNY, B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 3317-24, 2017.

BOYLE, D.P.; ZEMBOWER, T.R. Epidemiology and Management of Emerging Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and Beyond. **Urol Clin North Am.**, v. 42, p. 493-505, 2015.

BREIDENSTEIN EB, DE LA FUENTE-NÚÑEZ C, HANCOCK RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends Microbiol**, v. 19, p. 419–26, 2011.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2014, 872p.

BROSSIER, F.; MICAELO, M.; LUYT, C.E.; LU, Q.; CHASTRE, J.; ARBELOT, C.; TROUILLET, J.L.; COMBES, A.; ROUBY, J.J.; JARLIER, V.; AUBRY, A. Could the DiversiLab® semi-automated repetitive-sequence-based PCR be an acceptable

technique for typing isolates of *Pseudomonas aeruginosa*? An answer from our experience and a review of the literature. **Can J Microbiol**, v. 61, p. 903-12, 2015.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 54, p. 969-76, 2010.

BUSH, K. The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature. **J Infect Chemother.** v. 19, p. 549-59, 2013.

CACCI, L.C.; CHUSTER, S.G.; MARTINS, N.; CARMO, P.R.; GIRÃO, V.B.; NOUÉR, S.A.; FREITAS, W.V.; MATOS, J.A.; MAGALHÃES, A.C.; FERREIRA, A.L.; PICÃO, R.C.; MOREIRA, B.M. Mechanisms of carbapenem resistance in endemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates after an SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase producing strain subsided in an intensive care unit of a teaching hospital in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 111, p. 551-8, 2016.

CAG, Y.; CASKURLU, H.; FAN, Y.; CAO, B.; VAHABOGLU, H. Resistance mechanisms. **Ann Transl Med.**, v. 4, p. 326, 2016.

CAI, S.; CHEN, Y.; SONG, D.; KONG, J.; WU, Y.; LU, H. Study on the resistance mechanism via outer membrane protein OprD2 and metal  $\beta$ -lactamase expression in the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. **Exp Ther Med.**, v. 12, p. 2869-2872, 2016.

CAI, Y.; VENKATACHALAM, I.; TEE, N.W.; TAN, T.Y.; KURUP, A.; WONG, S.Y.; LOW, C.Y.; WANG, Y.; LEE, W.; LIEW, Y.X.; ANG, B.; LYE, D.C.; CHOW, A.; LING, M.L.; OH, H.M.; CUVIN, C.A.; OOI, S.T.; PADA, S.K.; LIM, C.H.; TAN, J.W.C.; CHEW, K.L.; NGUYEN, V.H.; FISHER, D.A.; GOOSSENS, H.; KWA, A.L.; TAMBYAH, P.A.; HSU, L.Y.; MARIMUTHU, K. Prevalence of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Among Adult Inpatients in Singapore Acute-Care Hospitals: Results From the First National Point Prevalence Survey. **Clin Infect Dis.** 2017;64(S2):S61-7.

CAMARGO, L.F.; MARRA, A.R.; PIGNATARI, A.C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P.P.; MEDEIROS, E.A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C.A.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; SOUZA, M.A.; BARATA, C.U.; EDMOND, M.B.; BRAZILIAN SCOPE STUDY GROUP. Nosocomial bloodstream infections in a nationwide study: comparison between solid organ transplant patients and the general population. **Transpl Infect Dis.** v. 17, p. 308-13, 2015.

CARATTOLI, A.; VILLA, L.; FEUDI, C.; CURCIO, L.; ORSINI, S.; LUPPI, A.; PEZZOTTI, G.; MAGISTRALI, C.F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro Surveill.**, v. 22, p. 30589, 2017.

CARLESSE, F.; CAPPELLANO, P.; QUILES, M.G.; MENEZES, L.C.; PETRILLI, A.S.; PIGNATARI, A.C. Clinical relevance of molecular identification of microorganisms and detection of antimicrobial resistance genes in bloodstream infections of paediatric cancer patients. **BMC Infect Dis.**, v. 16, p. 462, 2016.

CARRARA-MARRONI, F.E. Caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo-beta-lactamases. Tese de doutorado. 2009.

CARRARA-MARRONI, F.E.; CAYÔ, R.; STRELING, A.P.; DA SILVA, A.C.; PALERMO, R.L.; ROMANIN, P.; VENÂNCIO, E.; PERUGINI, M.R.; PELISSON, M.; GALES, A.C. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 3, p. 304-6, 2015.

CARVALHO, A.P.; ALBANO, R.M.; DE OLIVEIRA, D.N.; CIDADE, D.A.; TEIXEIRA, L.M.; MARQUES EDE, A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microb Drug Resist.**, v. 12, p. 103-8, 2006.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHMIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 48, p. 4654-61, 2004.

CASTANHEIRA, M.; DESHPANDE, L.M.; COSTELLO, A.; DAVIES, T.A.; JONES, R.N. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, p.1804-14, 2014.

CAVALCANTI, F.L.; ALMEIDA, A.C.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.; MORAIS JUNIOR, M.A. Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 107, p. 420-3, 2012.

CAVALCANTI, F.L.; MIRONES, C.R.; PAUCAR, E.R.; MONTES, L.A.; LEAL-BALBINO, T.C.; MORAIS, M.M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; OCAMPO-SOSA, A.A. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 110, p, 1003-9, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2016.

CEZÁRIO, R.C.; DUARTE DE MORAIS, L.; FERREIRA, J.C.; COSTA-PINTO, R.M.; DA COSTA DARINI, A.L.; GONTIJO-FILHO, P.P. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enferm Infecç Microbiol Clin.**, v. 27, p. 269-74, 2009.

CHARRETIER, Y.; SCHRENZEL, J. Mass spectrometry methods for predicting antibiotic resistance. **Proteomics Clin Appl.**, v. 10, p. 964-81, 2016.

CHALHOUB, H.; SÁENZ, Y.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; DENIS, O.; KAHL, B.C.; TULKENS, P.M.; VAN BAMBEKE, F. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 48, p. 740-3, 2016.

CHAVES, L.; TOMICH, L.M.; SALOMÃO, M.; LEITE, G.C.; RAMOS, J.; MARTINS, R.R.; RIZEK, C.; NEVES, P.; BATISTA, M.V.; AMIGO, U.; GUIMARAES, T.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. **J Med Microbiol.** 2017. doi: 10.1099/jmm.0.000631.

CHEN, W.; ZHANG, Y.M.; DAVIES, C. Penicillin-Binding Protein 3 Is Essential for Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, p. e01651-16, 2016.

CHEN, C.Y.; TIEN, F.M.; SHENG, W.H.; HUANG, S.Y.; YAO, M.; TANG, J.L.; TSAY, W.; TIEN, H.F.; HSUEH, P.R. Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections among patients with haematological malignancies with and

without neutropenia at a medical centre in northern Taiwan, 2008-2013. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 49, p. 272-281, 2017.

CHEVALIER, S.; BOUFFARTIGUES, E.; BODILIS, J.; MAILLOT, O.; LESOUHAITIER, O.; FEUILLOLEY, M.G.J.; ORANGE, N.; DUFOUR, A.; CORNELIS, P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 41, p. 698-722, 2017.

CHOI, Y.; PARK, H.Y.; PARK, S.J.; PARK, S.J.; KIM, S.K.; HA, C.; IM, S.J.; LEE, J.H. Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Cells.**, v. 32, p. 57-65, 2011.

CHOUDHURY, D.; DAS TALUKDAR, A.; DUTTA CHOUDHURY, M.; MAURYA, A.P.; PAUL, D.; DHAR CHANDA, D.; CHAKRAVORTY, A.; BHATTACHARJEE, A. Transcriptional Analysis of MexAB-OprM Efflux Pumps System of *Pseudomonas aeruginosa* and Its Role in Carbapenem Resistance in a Tertiary Referral Hospital in India. **PLoS One.**, v. 10, p. e0133842, 2015.

CHUNG, E.S.; LEE, J.Y.; RHEE, J.Y.; KO, K.S. Colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* that is not linked to *arnB*. **J Med Microbiol.**, v. 66, p. 833-41, 2017.

CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T.; JENSEN, P.Ø.; WANG, H.; HØIBY, N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 85, p.7-23, 2015.

CORNELIS, P. **Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology**. 1 ed. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2008, 244 p.

CORNELIS, P.; DINGEMANS, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 3, p. 75, 2013.

CORREA, A.; DEL CAMPO, R.; PERENGUEZ, M.; BLANCO, V.M.; RODRÍGUEZ-BAÑOS, M.; PEREZ, F.; MAYA, J.J.; ROJAS, L.; CANTÓN, R.; ARIAS, C.A.; VILLEGAS, M.V. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 2421-5, 2015.

CORRÊA, L.L.; WITEK, M.A.; ZELINSKAYA, N.; PICÃO, R.C.; CONN, G.L. Heterologous Expression and Functional Characterization of the Exogenously

Acquired Aminoglycoside Resistance Methyltransferases RmtD, RmtD2, and RmtG. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, p. 699-702, 2015.

CORREIA, S.; POETA, P.; HÉBRAUD, M.; CAPELO, J.L.; IGREJAS, G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **J Med Microbiol.**, v. 66, p. 551-559, 2017.

COSTA, L.M.; FLEMING, M.E.; PAULA, G.R.; TEIXEIRA, L.A.; MONDINO, P.J.; DE MONDINO, S.S.; MENDONÇA-SOUZA, C.R. Production of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the State of Sergipe, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 48, p. 212-5, 2015.

CROUSILLES, A.; MAUNDERS, E.; BARTLETT, S.; FAN, C.; UKOR, E.F.; ABDELHAMID, Y.; BAKER, Y.; FLOTO, A.; SPRING, D.R.; WELCH, M. Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? **Future Microbiol.**, v. 10, p. 1825-36, 2015.

CURRAN, B.; JONAS, D.; GRUNDMANN, H.; PITT, T.; DOWSON, C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol.**, v. 42, p. 5644-9, 2004.

DANTAS, R.C.; FERREIRA, M.L.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. **J Med Microbiol.**, v. 63, p. 1679-87, 2014.

DANTAS, R.C.C.; SILVA, R.T.E.; FERREIRA, M.L.; GONÇALVES, I.R.; ARAÚJO, B.F.; CAMPOS, P.A.; ROYER, S.; BATISTÃO, D.W.D.F.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. **PLoS One.**, v. 12, p. e0176774, 2017.

DAVIES, J.; DEWAR, A.; BUSH, A.; PITT, T.; GRUENERT, D.; GEDDES, D.M.; ALTON, E.W. Reduction in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to native cystic fibrosis epithelium with anti-asialoGM1 antibody and neuraminidase inhibition. **Eur Respir J.**, v. 13, p. 656-70, 1999.

DA SILVA, G.J.; DOMINGUES, S. Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics (Basel)**, v. 6, p. pii: E28, 2017.

DE ALMEIDA SILVA, K.C.F.; CALOMINO, M.A.; DEUTSCH, G.; DE CASTILHO, S.R.; DE PAULA, G.R.; ESPER, L.M.R.; TEIXEIRA, L.A. Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. **Burns.**, v. 43, p. 137-43, 2017.

DELEPELAIRE, P. Type I secretion in gram-negative bacteria. **Biochim Biophys Acta.**, v 1694, p. 149-61, 2004.

DE SILVA, N.; JACKSON, J.; STEER, C. Infections, Resistance Patterns and Antibiotic Use in Patients at a Regional Cancer Centre. **Intern Med J.** 2017. doi: 10.1111/imj.13646.

DIAS, V.C.; RESENDE, J.A.; BASTOS, A.N.; DE ANDRADE BASTOS, L.Q.; DE ANDRADE BASTOS, V.Q.; BASTOS, R.V.; DINIZ, C.G.; DA SILVA, V.L. Epidemiological, Physiological, and Molecular Characteristics of a Brazilian Collection of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb Drug Resist.**, v. 23, p. 852-863, 2017.

DI DOMENICO, E.G.; FARULLA, I.; PRIGNANO, G.; GALLO, M.T.; VESPAZIANI, M.; CAVALLO, I.; SPERDUTI, I.; PONTONE, M.; BORDIGNON, V.; CILLI, L.; DE SANTIS, A.; DI SALVO, F.; PIMPINELLI, F.; LESNONI LA PAROLA, I.; TOMA, L.; ENSOLI, F. Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype. **Int J Mol Sci.**, v 18, p. E1077, 2017.

DJORDJEVIC, Z.M.; FOLIC, M.M.; JANKOVIC, S.M. Distribution and antibiotic susceptibility of pathogens isolated from adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in intensive care unit. **J Infect Public Health.**, v. 10, p. 740-4, 2017.

DI PILATO, V.; POLLINI, S.; ROSSOLINI, G.M. Tn6249, a new Tn6162 transposon derivative carrying a double-integron platform and involved with acquisition of the *bla<sub>VIM-1</sub>* metallo- $\beta$ -lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 1583-7, 2015.

DOI, Y.; GHILARDI, A.C.; ADAMS, J.; DE OLIVEIRA GARCIA, D.; PATERSON, D.L. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 51, p. 3388-90, 2007.

DOI, Y.; WACHINO, J.I.; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 30, p. 523-537, 2016.

DONG, Y.H.; ZHANG, X.F.; AN, S.W.; XU, J.L.; ZHANG, L.H. A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependent biofilm decay in *Pseudomonas aeruginosa*. **Commun Integr Biol.**, v. 1, p. 88-96, 2008.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.**, v. 15, p. 167-93, 2002.

DUBERN, J.F.; CIGANA, C.; DE SIMONE, M.; LAZENBY, J.; JUHAS, M.; SCHWAGER, S.; BIANCONI, I.; DORING, G.; EBERL, L.; WILLIAMS, P.; BRAGONZI, A.; CAMARA, M. Integrated whole-genome screening for *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes using multiple disease models reveals that pathogenicity is host specific. **Environ Microbiol.**, v. 17, p. 4379–4393, 2015.

EDELSTEIN, M.V.; SKLEENOVA, E.N.; SHEVCHENKO, O.V.; D'SOUZA, J.W.; TAPALSKI, D.V.; AZIZOV, I.S.; SUKHORUKOVA, M.V.; PAVLUKOV, R.A.; KOZLOV, R.S.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. **Lancet Infect Dis.**, v. 13, p. 867-76, 2013.

EL GARCH, F.; BOGAERTS, P.; BEBRONE, C.; GALLEN, M.; GLUPCZYNSKI, Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, p. 4828-33, 2011.

ELLAPPAN, K.; BELGODE NARASIMHA, H.; KUMAR, S. Coexistence of multidrug resistance mechanisms and virulence genes in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a tertiary care hospital, South India. **J Glob Antimicrob Resist.** 2017. pii: S2213-7165(17)30166-2.

EL-SOLH, A.A.; HATTEMER, A.; HAUSER, A.R.; ALHAJHUSAIN, A.; VORA, H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Crit Care Med.**, v. 40, p. 1157-63, 2012.

EL ZOWALATY, M.E.; AL THANI, A.A.; WEBSTER, T.J.; EL ZOWALATY, A.E.; SCHWEIZER, H.P.; NASRALLAH, G.K.; MAREI, H.E.; ASHOUR, H.M.

*Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. **Future Microbiol.**, v. 10, p. 1683-706, 2015.

ESCANDÓN-VARGAS, K.; REYES, S.; GUTIÉRREZ, S.; VILLEGAS, M.V. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 15, p. 277-297, 2017.

ESTUDIO NACIONAL DE VIGILANCIA DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL EN SERVICIOS DE MEDICINA INTENSIVA (ENVIN-UCI). **Informe 2016**. Disponível em [http://hws.vhebron.net/envinhelics/ Help/Informe%20ENVIN-UCI% 202016.pdf](http://hws.vhebron.net/envinhelics/Help/Informe%20ENVIN-UCI%202016.pdf).

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Annual Epidemiological Report 2016 – Healthcare-associated infections acquired in intensive care units**. Stockholm: ECDC; 2016. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-acquired-intensive-care-units-annual>

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet)**. Stockholm: ECDC; 2017.

FAN, X.; WU, Y.; XIAO, M.; XU, Z.P.; KUDINHA, T.; BAZAJ, A.; KONG, F.; XU, Y.C. Diverse Genetic Background of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Mainland China, and Emergence of an Extensively Drug-Resistant ST292 Clone in Kunming. **Sci Rep.**, v. 6, p. 26522. 2016.

FANG, Z.L.; ZHANG, L.Y.; HUANG, Y.M.; QING, Y.; CAO, K.Y.; TIAN, G.B.; HUANG, X. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. **Infect Genet Evol.**, v. 21, p. 124-8, 2014.

FARAJI, F.; MAHZOUNIEH, M.; EBRAHIMI, A.; FALLAH, F.; TEYMOURNEJAD, O.; LAJEVARDI, B. Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. **Microb Pathog.**, v. 99, p. 1-4, 2016.

FEHLBERG, L.C.; XAVIER, D.E.; PERARO, P.P.; MARRA, A.R.; EDMOND, M.B.; GALES, A.C. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*

strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microb Drug Resist.**, v. 18, p. 402-7, 2012.

FELTMAN, H.; SCHULERT, G.; KHAN, S.; JAIN, M.; PETERSON, L.; HAUSER, A.R. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology.**, v. 147, p. 2659-69, 2001.

FENG, W.; SUN, F.; WANG, Q.; XIONG, W.; QIU, X.; DAI, X.; XIA, P. Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 8, p. 142-7, 2017.

FERNANDO, D.M.; KUMAR, A. Resistance-Nodulation-Division Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: Role in Virulence. **Antibiotics (Basel).**, v. 2, p. 163-81, 2013.

FERREIRA, M.L.; DANTAS, R.C.; FARIA, A.L.; GONÇALVES, I.R.; SILVEIRA DE BRITO, C.; QUEIROZ, L.L.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Molecular epidemiological survey of the quinolone- and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol.**, v. 64, p. 262-71, 2015.

FILLOUX, A. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. **Front Microbiol.**, v. 2, p. 155, 2011.

FITO-BONCOMPTE, L.; CHAPALAIN, A.; BOUFFARTIGUES, E.; CHAKER, H.; LESOUHAITIER, O.; GICQUEL, G.; BAZIRE, A.; MADI, A.; CONNIL, N.; VÉRON, W.; TAUPIN, L.; TOUSSAINT, B.; CORNELIS, P.; WEI, Q.; SHIOYA, K.; DÉZIEL, E.; FEUILLOLEY, M.G.; ORANGE, N.; DUFOUR, A.; CHEVALIER, S. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. **Infect Immun.**, v. 79, p. 1176-86, 2011.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol.**, v. 8, p. 623-33, 2010.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S.A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol.**, v. 14, p. 563-75, 2016.

FOLGORI, L.; BERNASCHI, P.; PIGA, S.; CARLETTI, M.; CUNHA, F.P.; LARA, P.H.; DE CASTRO PEIXOTO, N.C.; ALVES GUIMARÃES, B.G.; SHARLAND, M.;

ARAUJO DA SILVA, A.R.; CIOFI DEGLIATTI, M. Healthcare-Associated Infections in Pediatric and Neonatal Intensive Care Units: Impact of Underlying Risk Factors and Antimicrobial Resistance on 30-Day Case-Fatality in Italy and Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 37, p. 1302-9, 2016.

FONSECA, E.L.; MARIN, M.A.; ENCINAS, F.; VICENTE, A.C. Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>SPM-1</sub> and bicyclomycin *bcr1* resistance genes found in the pandemic *Pseudomonas aeruginosa* clone SP/ST277. **J Antimicrob Chemother.**, v. 70, p. 2547-50, 2015.

FRANCO, M.R.; CAIAFFA-FILHO, H.H.; BURATTINI, M.N.; ROSSI, F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. **Clinics (São Paulo)**, v. 54, p. 825-9, 2010.

FRANK, D.W. The exoenzyme S regulation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol.**, v. 26, p. 621-9, 1997.

GHAFOOR, A.; HAY, I.D.; REHM, B.H. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **Appl Environ Microbiol.**, v. 77, p. 5238-46, 2011.

GALDINO, A.C.; VIGANOR, L.; ZICCARDI, M.; NUNES, A.P.; DOS SANTOS, K.R.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L. Heterogeneous production of proteases from Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 2016. pii: S0213-005X(16)30182-3.

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-beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother.**, v. 52; p. 699-702, 2003.

GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 73, p. 354-60, 2012.

GANG, Z.; JIE, F. The intrinsic resistance of bacteria. **Yi Chuan.**, v. 38, p. 872-880, 2016.

GARCÍA-CONTRERAS, R.; NUÑEZ-LÓPEZ, L.; JASSO-CHÁVEZ, R.; KWAN, B.W.; BELMONT, J.A.; RANGEL-VEJA, A.; MAEDA, T.; WOOD, T.K. Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. **ISME J.**, v. 9, p. 115-25, 2015.

GELLATLY, S.L.; HANCOCK, R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathog Dis.**, v. 67, p. 159–73, 2013.

GEISINGER, E.; ISBERG, R.R. Interplay Between Antibiotic Resistance and Virulence During Disease Promoted by Multidrug-Resistant Bacteria. **J Infect Dis.**, v. 215, p. S9-S17, 2017.

GHOLAMI, A.; MAJIDPOUR, A.; TALEBI-TAHER, M.; BOUSTANSHENAS, M.; ADABI, M. PCR-based assay for the rapid and precise distinction of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from burns patients. **J Prev Med Hyg.**, v. 57, p. E81-5, 2016.

GLOAG, E.S.; TURNBULL, L.; HUANG, A.; VALLOTTON, P.; WANG, H.; NOLAN, L.M.; MILILLI, L.; HUNT, C.; LU, J.; OSVATH, S.R.; MONAHAN, L.G.; CAVALIERE, R.; CHARLES, I.G.; WAND, M.P.; GEE, M.L.; PRABHAKAR, R.; WHITCHURCH, C.B. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 110, p. 11541-6, 2013.

GLOAG, E.S.; JAVED, M.A.; WANG, H.; GEE, M.L.; WADE, S.A.; TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C.B. Stigmergy: A key driver of self-organization in bacterial biofilms. **Commun Integr Biol.**, v. 6, p. e27331, 2013.

GOLI, H.R.; NAHAEI, M.R.; AHANGARZADEH REZAEI, M.; HASANI, A.; SAMADI KAFIL, H.; AGHAZADEH, M.; NIKBAKHT, M.; KHALILI, Y. Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Infect Public Health.** 2017. pii: S1876-0341(17)30250-2.

GOLLE, A.; JANEZIC, S.; RUPNIK, M. Low overlap between carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotypes isolated from hospitalized patients and wastewater treatment plants. **Plos One.**, v. 12, p. e0186736, 2017.

GONÇALVES, D.C.; LIMA, A.B.; LEÃO, L.S.; FILHO, J.R.; PIMENTA, F.C.; VIEIRA, J.D. Detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from

hospitalized patients in Goiânia, State of Goiás. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 42, p. 411-4, 2009.

GÓMEZ-ZORRILLA, S.; JUAN, C.; CABOT, G.; CAMOEZ, M.; TUBAU, F.; OLIVER, A.; DOMINGUEZ, M.A.; ARIZA, J.; PEÑA, C. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 47, p. 368-74, 2016.

GOODMAN, A.L.; KULASEKARA, B.; RIETSCH, A.; BOYD, D.; SMITH, R.S.; LORY, S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Dev Cell.**, v. 7, p. 745–754, 2004.

GUPTA, R.; MALIK, A.; RIZVI, M.; AHMED, M.; SINGH, A. Epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative pathogens isolated from ventilator-associated pneumonia in ICU patients. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 9, p. 47-50, 2017.

HAMMOUDI HALAT, D.; MOUBARECK, C.A.; SARKIS, D.K. Heterogeneity of Carbapenem Resistance Mechanisms Among Gram-Negative Pathogens in Lebanon: Results of the First Cross-Sectional Countrywide Study. **Microb Drug Resist.**, v. 23, p. 733-743, 2017.

HARRISON, E.M.; CARTER, M.E.; LUCK, S.; OU, H.Y.; HE, X.; DENG, Z.; O'CALLAGHAN, C.; KADIOGLU, A.; RAJAKUMAR, K. Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. **Infect Immun.**, v. 78, p. 1437–46, 2010.

H Aidar, G.; Philips, N.J.; Shields, R.K.; Snyder, D.; Cheng, S.; Potoski, B.A.; Doi, Y.; Hao, B.; Press, E.G.; Cooper, V.S.; Clancy, C.J.; Nguyen, M.H. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. **Clin Infect Dis.**, v. 65, p. 100-120, 2017.

HAUSER AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. **Nat Rev Microbiol.**, v. 7, p. 654–65, 2009..

HEIDARI A, NOSHIRANZADEH N, HAGHI F, BIKAS R. Inhibition of quorum sensing related virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by pyridoxal lactohydrazone. **Microb Pathog.**, 2017. pii: S0882-4010(17)30298-X.

- HEMAMALINI, R.; KHARE, S. A Proteomic Approach to Understand the Role of the Outer Membrane Porins in the Organic Solvent-Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **PLoS ONE.**, v. 9, p. e103788, 2014.
- HILKER, R.; MUNDER, A.; KLOCKGETHER, J.; LOSADA, P.M.; CHOUVARINE, P.; CRAMER, N.; DAVENPORT, C.F.; DETHLEFSEN, S.; FISCHER, S.; PENG, H.; SCHONFELDER, T.; TURK, O.; WIEHLMANN, L.; WOLBELING, F.; GULBINS, E.; GOESMANN, A.; TUMMLER, B. Interclonal gradient of virulence in the *Pseudomonas aeruginosa* pangenome from disease and environment. **Environ Microbiol.**, v., 17, p. 29–46, 2015.
- HIRABAYASHI, A.; KATO, D.; TOMITA, Y.; IGUCHI, M.; YAMADA, K.; KOUYAMA, Y.; MORIOKA, H.; TETSUKA, N.; YAGI, T. Risk factors for and role of OprD protein in increasing minimal inhibitory concentrations of carbapenems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol.**, v. 66, p. 1562-72, 2017.
- HOGUE, R.; PELZER, A.; ROSENAU, F.; WILHELM, S. Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.**, v. 2, p. 383-395, 2010.
- HOLLAND, I.B.; SCHMITT, L.; YOUNG, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). **Mol Membr Biol.**, v. 22, p. 29-39, 2005.
- HONG, D.J.; BAE, I.K.; JANG, I.H.; JEONG, S.H.; KANG, H.K.; LEE, K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Chemother.**, v. 47, p. 81-97, 2015.
- HOOPER, D.C.; JACOBY, G.A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1354, p. 12-31, 2015.
- HUBER, P.; BASSO, P.; REBOUD, E.; ATTREE, I. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. **Environmental Microbiology Reports.**, v. 8, p. 564-71, 2016.
- IYAMA, K.; TAKAHASHI, E.; LEE, J.M.; MON, H.; MORISHITA, M.; KUSAKABE, T.; YASUNAGA-AOKI, C. Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 364, 2017.

IRONMONGER, D.; EDEGHERE, O.; BAINS, A.; LOY, R.; WOODFORD, N.; HAWKEY, P.M. Surveillance of antibiotic susceptibility of urinary tract pathogens for a population of 5.6 million over 4 years. **J Antimicrob Chemoth.**, v. 70, p. 1744–50, 2015.

JACKSON, A.A.; GROSS, M.J.; DANIELS HAMPTON, T.H.; HAMMOND, J.H.; VALLET-GELY, I. Anr and Its Activation by PlcH Activity in *Pseudomonas aeruginosa* Host Colonization and Virulence. **J Bacteriol.**, v. 195, p. 3093-104, 2013.

JACOBY, G.A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D.C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiol Spectr.**, v. 2, 2014.

JÁCOME, P.R.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.; MACIEL, M.A. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 45, p. 707-12, 2012.

JÁCOME, P.R.; ALVES, L.R.; JÁCOME-JÚNIOR, A.T.; SILVA, M.J.; LIMA, J.L.; ARAÚJO, P.S.; LOPES, A.C.; MACIEL, M.A. Detection of *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **J Med Microbiol.**, v. 65, p. 658-65, 2016.

JAMI AL-AHMADI, G.; ZAHMATKESH ROODSARI, R. Fast and specific detection of *Pseudomonas aeruginosa* from other pseudomonas species by PCR. **Ann Burns Fire Disasters.**, v. 29, p. 264-267, 2016.

JAPONI, A.; ANVARINEJAD, M.; FARSHAD, S.; GIAMMANCO, G.M.; RAFAATPOUR, N.; ALIPOUR, E. RAntibiotic Susceptibility Patterns and Molecular Epidemiology of Metallo- $\beta$ -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Burn Patients. **Iran ed Crescent Med J.**, v. 16, p. e10916, 2014.

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 49, p. 526-535, 2017.

JEVŠNIK, M.; URŠIČ, T.; ZIGON, N.; LUSA, L.; KRIVEC, U.; PETROVEC, M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. **BMC Infect Dis.**, v. 12, p. 365, 2012.

JIMENEZ, P.N.; KOCH, G.; THOMPSON, J.A.; XAVIER, K.B.; COOL, R.H.; QUAX, W.J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 76, p. 46–65, 2012.

JIN, J.S.; KWON, K.T.; MOON, D.C.; LEE, J.C. Emergence of 16S rRNA methylase *rmtA* in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. **Int J Antimicrob Agents.**, v.33, p, 490-1, 2009.

JUAN, C.; PEÑA, C.; OLIVER A. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **J Infect Dis.**, v. 215, p. S44-S51, 2017.

JYOT, J.; BALLOY, V.; JOUVION, G.; VERMA, A.; TOUQUI, L.; HUERRE, M.; CHIGNARD, M.; RAMPHAL, R. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. **J Infect Dis.**, v. 203, p. 1369-77, 2011.

KAISER, S.J.; MUTTERS, N.T.; DEROSA, A.; EWERS, C.; FRANK, U.; GÜNTHER, F. Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 36, p. 243-35, 2017.

KALLUF, K.O.; AREND, L.N.; WUICIK, T.E.; PILONETTO, M.; TUON, F.F. Molecular epidemiology of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* by rep-PCR in hospitals in Parana, Brazil. **Infect Genet Evol.**, v. 49, p. 130-3, 2017.

KUNG, V.L.; OZER, E.A.; HAUSER, A.R. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 74, p. 621-41, 2010.

KARIMINIK, A.; BASERI-SALEHI, M.; KHEIRKHAH, B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. **Immunol Lett.**, v. 190, 1-6, 2017.

KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D.J.; HACKEL, M.A.; LOB, S.H.; SAHM, D.F. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013-2015. **J Med Microbiol.**, v. 66, p. 61-9, 2017.

KAZMIERCZAK, K.M.; RABINE, S.; HACKEL, M.; MCLAUGHLIN, R.E.; BIEDENBACH, D.J.; BOUCHILLON, S.K.; SAHM, D.F.; BRADFORD, P.A. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- $\beta$ -

Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, p. 1067-78. 2015.

KEITH, H.; TURNER, JE.; URVISH, T.; KENDRA, P.R.; MARVIN, W. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. **PLoS Genet.**, v. 10, p. e1004518, 2014.

KHAN, A.U.; MARYAM, L.; ZARRILLI, R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM): a threat to public health. **BMC Microbiol.**, v. 17, p. 101, 2017.

KHOSRAVI, A.D.; MOTAHAR, M.; ABBASI MONTAZERI, E. The frequency of class1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. **PLoS One.**, v. 12, p. e0183061, 2017.

KIDA, Y.; SHIMIZU, T.; KUWANO, K. Cooperation between LepA and PlcH contributes to the in vivo virulence and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. **Infect Immun.**, v. 79, p. 211-9, 2011.

KIM, S.K.; LEE, J.H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Microbiol.**, v. 54, p. 71-85, 2016.

KLOCKGETHER, J.; TÜMMLER, B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. **F1000Res.**, v. 6, p. 1261, 2017.

KOS, V.N.; MCLAUGHLIN, R.E.; GARDNER, H.A. Identification of unique in-frame deletions in OprD among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathog Dis.**, v. 74, p. ftw031, 2016.

KREAMER, N.N.; COSTA, F.; NEWMAN, D.K. The ferrous iron-responsive BqsRS two-component system activates genes that promote cationic stress tolerance. **MBio.**, v. 6, p. e02549, 2015.

LABARCA, J.A.; SALLES, M.J.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Crit Rev Microbiol.**, v. 42, p. 276-92, 2016.

LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 1584-1590, 1999.

- LAVERTY, G.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. **Pathogens.**, v. 3, p. 596–632, 2014.
- LEBEAUX, D.; GHIGO, J.M.; BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 78, p. 510-43, 2014.
- LEE, J.; WU, J.; DENG, Y.; WANG, J.; WANG, C.; WANG, J.; CHANG, C.; DONG, Y.; WILLIAMS, P.; ZHANG, L.H. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. **Nat Chem Biol.**, v. 9, p. 339-43, 2013.
- LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein Cell.**, v. 6, p. 26-41, 2015.
- LEE, J.; PATEL, D.S.; KUCHARSKA, I.; TAMM, L.K.; IM, W. Refinement of OprH-LPS Interactions by Molecular Simulations. **Biophys J.**, v. 112, p. 346-55, 2017.
- LEE, K.; YOON, S.S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **J Microbiol Biotechnol.**, v. 27, p. 1053-1064, 2017.
- LEE, Y.; SUNG, J.Y.; KIM, H.; YONG, D.; LEE, K. Comparison of a New Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Platform, ASTA MicroIDSys, With Bruker Biotyper for Species Identification. **SLAS Discov.**, v. 37, p. 531-5, 2017.
- LIAKOPOULOS, A.; MAVROIDI, A.; KATSIFAS, E.A.; THEODOSIOU, A.; KARAGOUNI, A.D.; MIRIAGOU, V.; PETINAKI, E. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. **BMC Infect Dis.**, v. 13, p. 505, 2013.
- LIOY, V.S.; GOUSSARD, S.; GUERINEAU, V.; YOON, E.J.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M.; GRILLOT-COURVALIN, C. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. **RNA.**, v. 20, p. 382-91, 2014.
- LIU, Q.; LI, X.; LI, W.; DU, X.; HE, J.; TAO, C.; FENG, Y. Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection: a meta-analysis. **Scientific Reports.**, v. 5, p. 11715, 2015.

LIU, Y.Y.; WANG, Y.; WALSH, T.R.; YI, L.X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L.F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J.H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis.**, v. 16, p. 161-8, 2016.

LIU, L.; FENG, Y.; ZHANG, X.; MCNALLY, A.; ZONG, Z. A new variant of *mcr-3* in an extensively drug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate carrying *mcr-1* and *bla*<sub>NDM-5</sub>. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 61, p. pii: AAC.01757-17, 2017.

LIVERMORE, D.M.; JAMROZY, D.; MUSHTAQ, S.; NICHOLS, W.W.; YOUNG, K.; WOODFORD, N. AmpC  $\beta$ -lactamase induction by avibactam and relebactam. **J Antimicrob Chemother.**, v. 72, p. 3342-8, 2017.

LLAMAS, M.A.; IMPERI, F.; VISCA, P.; LAMONT, I.L. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 38, p. 569-97, 2014.

LOMOVSKAYA, O.; WATKINS, W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. **J Mol Microbiol Biotechnol.**, v. 3, p. 225-236, 2001.

LUCENA, A.; DALLA COSTA, L.M.; NOGUEIRA, K.S.; MATOS, A.P.; GALES, A.C.; PAGANINI, M.C.; CASTRO, M.E.; RABONI, S.M. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. **J Hosp Infect.**, v. 87, p. 234-40, 2014.

MADSEN JS, BURMØLLE M, HANSEN LH, SØRENSEN SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 65, p. 183-95, 2012.

MAGILL, S.S.; RHODES, B.; KLOMPAS, M. Improving ventilator-associated event surveillance in the National Healthcare Safety Network and addressing knowledge gaps: update and review. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 27, p. 394-400, 2014.

MAGILL, S.S.; LI, Q.; GROSS, C.; DUDECK, M.; ALLEN-BRIDSON, K.; EDWARDS, J.R. Incidence and Characteristics of Ventilator-Associated Events Reported to the

National Healthcare Safety Network in 2014. **Crit Care Med.**, v. 44, p. 2154-61, 2016.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.**, v. 18, p. 268-81, 2012.

MAISURIA, V.B.; LOS SANTOS, Y.L.; TUFENKJI, N.; DÉZIEL, E. Cranberry-derived proanthocyanidins impair virulence and inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Sci Rep.**, v. 4, p. 30169, 2016.

MALATHI, K.; RAMAIAH S. Molecular Docking and Molecular Dynamics Studies to Identify Potential OXA-10 Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Non-hydrolysing Inhibitors for *Pseudomonas aeruginosa*. **Cell Biochem Biophys.**, v. 74, p. 141-55, 2016.

MALKOÇOĞLU, G.; AKTAŞ, E.; BAYRAKTAR, B.; OTLU, B.; BULUT, M.E. VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. **Microb Drug Resist.**, v. 23, p. 328-34, 2017.

MANN, E.E.; WOZNIAK, D.J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36, p. 893-916. 2012.

MANOS, J.; HU, H.; ROSE, B.R.; WAINWRIGHT, C.E.; ZABLOTSKA, I.B.; CHENEY, J.; TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C.B.; GRIMWOOD, K.; HARMER, C.; ANUJ, S.N.; HARBOUR, C.; ACFBAL STUDY GROUP. Virulence factor expression patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains from infants with cystic fibrosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 32, p. 1583-92, 2013.

MARAOLO, A.E.; CASCELLA, M.; CORCIONE, S.; CUOMO, A.; NAPPA, S.; BORGIA, G.; DE ROSA, F.G.; GENTILE, I. Management of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: state of the art. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 15, p. 861-871, 2017.

MAROUÏ, I.; BARGUIGUA, A.; ABOULKACEM, A.; OUARRAK, K.; SBITI, M.; LOUZI, H.; TIMINOUNI, M.; BELHAJ, A. First report of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Morocco. **J Infect Chemother.**, v. 22, p. 127-32, 2016.

MARRA, A.R.; PEREIRA, C.A.; GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; CAL, R.G.; DE SOUZA, J.M.; EDMOND, M.B.; FARO, C.; WEY, S.B. Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, p. 388-90, 2006.

MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.; PIGNATARI, A.C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P.R.; MEDEIROS, E.A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C.A.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; DE SOUZA, M.A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C.U.; EDMOND, M.B.; BRAZILIAN SCOPE STUDY GROUP. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol.**, v. 49, p. 1866-71, 2011.

MARTINEZ, J.L.; SÁNCHEZ, M.B.; MARTÍNEZ-SOLANO, L.; HERNANDEZ, A.; GARMENDIA, L.; FAJARDO, A.; ALVAREZ-ORTEGA, C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 33, p. 430-49, 2009.

MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P.; GASPARETO, P.B.; BARTH, A.L. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. **Infection.**, v. 35, p. 457-60, 2007.

MASHBURN, L.M.; WHITELEY, M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. **Nature.**, v. 437, p. 422-5, 2005.

MAYA, J.J.; RUIZ, S.J.; BLANCO, V.M.; GOTUZZO, E.; GUZMAN-BLANCO, M.; LABARCA, J.; SALLES, M.; QUINN, J.P.; VILLEGAS, M.V. Current status of carbapenemases in Latin America. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 11, p. 657-67, 2013.

MELETIS, G.; BAGKERI, M. Beta-lactamase and carbapenemase detection methods: an overview of recent patents. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov.**, v. 9, p. 1-5, 2014.

MELETIS, G.; CHATZIDIMITRIOU, D.; MALISIOVAS, N. Double- and multi-carbapenemase-producers: the excessively armored bacilli of the current decade. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 34, p. 1487-93, 2015.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Ther Adv Infect Dis.**, v. 3, p. 15-21, 2016.

MIKUCIONYTE, G.; ZAMORANO, L.; VITKAUSKIENE, A.; LÓPEZ-CAUSAPÉ, C.; JUAN, C.; MULET, X.; OLIVER, A. Nosocomial dissemination of VIM-2-producing ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Lithuania. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 35, p. 195-200, 2016.

MINE, T.; MORITA, Y.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 43, p. 415-7, 1999.

MOHANAM, L.; MENON, T. Emergence of *rmtC* and *rmtF* 16S rRNA methyltransferase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian J Med Microbiol.**, v. 35, p. 282-5, 2017.

MOOSAVIAN, M.; RAHIMZADEH, M. Molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes, *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>SPM-1</sub> in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in teaching hospitals of Ahvaz, Iran. **Iran J Microbiol.**, v. 4, p. 2-6, 2015.

MORADALI, M.F.; GHODS, S.; REHM, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 4, p. 39, 2017.

MOREIRA, M.A.S.; SOUZA, E.C.D.; MORAES, C.A.D. Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. **Braz J Microbiol.**, v. 35, p. 19-28, 2004.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathog.**, v. 4, p. e1000213, 2008.

MULET, X.; CABOT, G.; OCAMPO-SOSA, A.A.; DOMINGUEZ, M.A.; ZAMORANO, L.; JUAN, C.; TUBAU, F.; RODRIGUEZ, C.; MOYA, B.; PENA, C.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; OLIVER, A.; SPANISH NETWORK FOR RESEARCH IN

INFECTIOUS D. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, p. 5527–5535, 2013.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica Murray**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017, 888p.

MUNITA, J.M.; ARIAS, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr.**, v. 4, 2016.

MURAKI, Y.; KITAMURA, M.; MAEDA, Y.; KITAHARA, T.; MORI, T.; IKEUE, H.; TSUGITA, M.; TADANO, K.; TAKADA, K.; AKAMATSU, T.; YAMADA, T.; YAMADA, T.; SHIRAISHI, T.; OKUDA M. Nationwide surveillance of antimicrobial consumption and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* isolates at 203 Japanese hospitals in 2010. **Infection.**, v. 41, p. 415-23, 2013.

NASCIMENTO, A.P.; ORTIZ, M.F.; MARTINS, W.M.; MORAIS, G.L.; FEHLBERG, L.C.; ALMEIDA, L.G.; CIAPINA, L.P.; GALES, A.C. VASCONCELOS, A.T. Intraclonal Genome Stability of the Metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277, an Endemic Clone Disseminated in Brazilian Hospitals. **Front Microbiol.**, v. 7, p. 1946, 2016.

NGUYEN, A.T.; JONES, J.W.; RUGE, M.A.; KANE, M.A.; OGLESBY-SHERROUSE, A.G. Iron Depletion Enhances Production of Antimicrobials by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol.**, v. 197, p. 2265-75, 2015.

NIKAIDO, H.; PAGES, J.M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of gram-negative bacteria. **FEMS Microbio. Rev.**, v. 36, p. 340-363, 2012.

NORDMANN, P.; RONCO, E.; NAAS, T.; DUPORT, C.; MICHEL-BRIAND, Y.; LABIA, R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 37, p. 962-9, 1993.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. **Clin Microbiol Infect.**, v. 22, p. 398-400, 2016.

NOTO, M.J.; BURNS, W.J.; BEAVERS, W.N.; SKAAR, E.P. Mechanisms of pyocyanin toxicity and genetic determinants of resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.**, 2017. pii: JB.00221-17.

NOUÉR, S.A.; NUCCI, M.; DE-OLIVEIRA, M.P.; PELLEGRINO, F.L.; MOREIRA, B.M. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

producing SPM metallo-beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, p. 3663-7, 2005.

NOWICKI, E.M.; O'BRIEN, J.P.; BRODBELT, J.S.; TRENT, M.S. Extracellular zinc induces phosphoethanolamine addition to *Pseudomonas aeruginosa* lipid A via the ColRS two-component system. **Mol Microbiol.**, v. 97, p. 166-78, 2015.

OKA, N.; SUZUKI, T.; ISHIKAWA, E.; YAMAGUCHI, S.; HAYASHI, N.; GOTOH, N.; OHASHI, Y. Relationship of Virulence Factors and Clinical Features in Keratitis Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 56, p. 6892-8, 2015.

OLAITAN, A.O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol.**, v. 5, p. 643, 2014.

OLIVARES PACHECO, J.; ALVAREZ-ORTEGA, C.; ALCALDE RICO, M.; MARTÍNEZ, J.L. Metabolic Compensation of Fitness Costs Is a General Outcome for Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Overexpressing Efflux Pumps. **MBio.**, v. 8, p. pii: e00500-17, 2017.

OLIVER, A.; MULET, X.; LÓPEZ-CAUSAPÉ, C.; JUAN, C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. **Drug Resist Updat.**, v. 21-22, p. 41-59, 2015.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 34, p. 877-86, 2015.

O'NEILL, J. **Review on Antimicrobial Resistance - Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis For the Health and Wealth of Nations.** HM Government, London. 2014. Disponível em [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf).

O'NEILL, J. **Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on antimicrobial resistance to the Government of the United Kingdom.** HM Government, London. 2016. Disponível em [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf).

PAGÈS, J.M.; AMARAL, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1794, p. 826-33, 2009.

PALZKILL, T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1277, p. 91-104, 2013.

PAPAGIANNITSIS, C.C.; MEDVECKY, M.; CHUDEJOVA, K.; SKALOVA, A.; ROTOVA, V.; SPANELOVA, P.; JAKUBU, V.; ZEMLICKOVA, H.; HRABAK, J.; CZECH PARTICIPANTS OF EUROPEAN ANTIMICROBIAL REISTANCE SURVEILLANCE NETWORK. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin: evidence for clonal spread of extensively resistant ST357 expressing IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, p. pii: AAC.01811-17. 2017.

PARK, J.W.; KIM, Y.J.; SHIN, I.S.; KWON, O.K.; HONG, J.M.; SHIN, N.R.; OH, S.R.; HA, U.H.; KIM, J.H.; AHN, K.S. Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Affects Matrix Metalloproteinase 12 (MMP-12) and MMP-13 Expression via Nuclear Factor  $\kappa$ B Signaling in Human Carcinoma Epithelial Cells and a Pneumonia Mouse Model. **J Infect Dis.**, v. 214, p. 962-9. 2016.

PARK, M.H.; KIM, S.Y.; ROH, E.Y.; LEE, H.S. Difference of Type 3 secretion system (T3SS) effector gene genotypes (*exoU* and *exoS*) and its implication to antibiotics resistances in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic otitis media. **Auris Nasus Larynx.**, v. 44, p. 258-265, 2017.

PASSMORE, I.J.; NISHIKAWA, K.; LILLEY, K.S.; BOWDEN, S.D.; CHUNG, J.C.; WELCH, M. Mep72, a metzincin protease that is preferentially secreted by biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 197, p. 762–773, 2015.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einstein.**, v. 10, p. 118-9, 2012.

PATEL R. Biofilms and antimicrobial resistance. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 437, p. 41-7, 2005.

PELLEGRINO, F.L.; CASALI, N.; DOS SANTOS, K.R.; NOUÉR, S.A.; SCHEIDEGGER, E.M.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. *Pseudomonas aeruginosa*

epidemic strain carrying *bla*<sub>SPM</sub> metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. **J Chemother.**, v. 18, p. 151-6, 2006.

PEÑA, C.; SUAREZ, C.; OCAMPO-SOSA, A.; MURILLAS, J.; ALMIRANTE, B.; POMAR, V.; AGUILAR, M.; GRANADOS, A.; CALBO, E.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; RODRÍGUEZ, F.; TUBAU, F.; OLIVER, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; SPANISH NETWORK FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASES (REIPI). Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: a post hoc analysis of a prospective cohort. **Clin Infect Dis.**, v. 57; p. 208-216, 2013.

PEÑA, C.; CABOT, G.; GÓMEZ-ZORRILLA, S.; ZAMORANO, L.; OCAMPO-SOSA, A.; MURILLAS, J.; ALMIRANTE, B.; POMAR, V.; AGUILAR, M.; GRANADOS, A.; CALBO, E.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, F.; TUBAU, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; OLIVER, A.; SPANISH NETWORK FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASES (REIPI). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. **Clin Infect Dis.**, v. 60, p. 539-48, 2015.

PEREIRA, S.G.; MARQUES, M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, O. Multidrug and extensive drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Portuguese central hospital: 10-year survey. **Microb Drug Resist.**, v. 21, p. 194-200, 2015.

PÉREZ-GALLEGO, M.; TORRENS, G.; CASTILLO-VERA, J.; MOYA, B.; ZAMORANO, L.; CABOT, G.; HULTENBY, K.; ALBERTÍ, S; MELLROTH, P.; HENRIQUES-NORMARK, B.; NORMARK, S.; OLIVER, A.; JUAN, C. Impact of AmpC Derepression on Fitness and Virulence: the Mechanism or the Pathway? **MBio.**, v. 7, p. pii: e01783-16, 2016.

PEYMANI, A.; NASERPOUR FARIVAR, T.; MOHAMMADI GHANBARLOU, M.; NAJAFIPOUR, R. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing *bla*<sub>IMP-1</sub> and *bla*<sub>VIM-1</sub> in Qazvin and Alborz educational hospitals, Iran. **Iran J Microbiol.**, v. 7, p. 302-9, 2015.

PHILIPPON, A.; SLAMA, P.; DÉNY, P.; LABIA, R. A Structure-Based Classification of Class A  $\beta$ -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. **Clin Microbiol Rev.**, v. 29, p. 29-57, 2016.

PFEIFER, Y.; TRIFONOVA, A.; PIETSCH, M.; BRUNNER, M.; TODOROVA, I.; GERGOVA, I.; WILHARM, G.; WERNER, G.; SAVOV, E. Clonal Transmission of Gram-Negative Bacteria with Carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital. **Microb Drug Resist.**, v. 23, p. 301-307, 2017.

PHAN, G.; PICARD, M.; BROUTIN, I. Focus on the Outer Membrane Factor OprM, the Forgotten Player from Efflux Pumps Assemblies. **Antibiotics (Basel)**., v. 4, p. 544-66, 2015.

PICÃO, R.C.; CARRARA-MARRONI, F.E.; GALES, A.C.; VENÂNCIO, E.J.; XAVIER, D.E.; TOGNIM, M.C.; PELAYO, J.S. Metallo- $\beta$ -lactamase-production in meropenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk for silent spread. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 107; p. 747-51, 2012.

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

PIER, G.B. Pulmonary Disease Associated with *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Current Status of the Host-Bacterium Interaction. **J Infect Dis.**, v. 151, p. 575–580, 1985.

POBIEGA, M.; WOJKOWSKA-MACH, J.; MACIAG, J.; CHMIELARCZYK, A.; ROMANISZYN, D.; POMORSKA-WESOŁOWSKA, M.; ZIOLKOWSKI, G.; HECZKO, P.B.; BULANDA, M. Virulence and Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Southern Poland. **Chemotherapy.**, v. 60, p. 253-60, 2014.

POBIEGA, M.; MACIĄG, J.; CHMIELARCZYK, A.; ROMANISZYN, D.; POMORSKA-WESOŁOWSKA, M.; ZIOLKOWSKI, G.; HECZKO, P.B.; BULANDA, M.; WOJKOWSKA-MACH, J. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infections in Southern Poland. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 83, p. 295-7, 2015.

POBIEGA, M.; MACIAG, J.; POMORSKA-WESOŁOWSKA, M.; CHMIELARCZYK, A.; ROMANISZYN, D.; ZIOLKOWSKI, G.; HECZKO, P.B.; WOJKOWSKA-MACH, J.; BULANDA, M. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* among children in Southern Poland: virulence factors and antibiotic resistance. **J Pediatr Urol.**, v. 12, p. 36, 2016.

POLLINI, S.; MARADEI, S.; PECILE, P.; OLIVO, G.; LUZZARO, F.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, p. 410–416, 2013.

POLOTTO, M.; CASELLA, T.; DE LUCCA OLIVEIRA, M.G.; RÚBIO, F.G.; NOGUEIRA, M.L.; DE ALMEIDA, M.T.; NOGUEIRA, M.C. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub> and *bla*<sub>GES-5</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub> and *bla*<sub>SPM-1</sub> causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infect Dis.**, v. 12, p. 176, 2012.

POOLE K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 2233-2241, 2000.

POOLE K, SRIKUMAR R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. **Curr Top Med Chem.**, v. 1, p. 59-71, 2001.

POOLE, K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Trends Microbiol.**, v. 20, p. 227-34, 2012.

POOLE, K.; LAU, C.H.; GILMOUR, C.; HAO, Y.; LAM, J.S. Polymyxin Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* Linked to the MexXY-OprM Multidrug Efflux System. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 7276-89, 2015.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 45, p. 568-85, 2015.

PRESTES-CARNEIRO, L.E.; AZEVEDO, A.M.; NAKASHIMA, M.A.; XAVIER, J.M.; CABRAL, C. Frequency and antimicrobial susceptibility of pathogens at tertiary public hospital, São Paulo, Brazil. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.**, v. 46, p. 276-84, 2015.

PUZARI, M.; CHETIA, P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 33, p. 24, 2017.

RADA, B.; LETO, T.L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Trends Microbiol.**, v. 21, p. 73-81, 2013.

RADAN, M.; MONIRI, R.; KHORSHIDI, A.; GILASI, H.; NOROUZI, Z.; BEIGI, F.; DASTEHL GOLI, Y. Emerging Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Carrying *bla*<sub>IMP</sub> Among Burn Patients in Isfahan, Iran. **Arch Trauma Res.**, v. 5, p. e33664, 2016.

RADÓ, J.; KASZAB, E.; PETROVICS, T.; PÁSZTI, J.; KRISZT, B.; SZOBOSZLAY, S. Characterization of environmental *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing scheme. **J Med Microbiol.**, v. 66, p. 1457-1466, 2017.

RAHMAN, M.; PRASAD, K.N.; PATHAK, A.; PATI, B.K.; SINGH, A.; OVEJERO, C.M.; AHMAD, S.; GONZALEZ-ZORN, B. RmtC and RmtF 16S rRNA Methyltransferase in NDM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Emerg Infect Dis.**, v. 21, p. 2059-62, 2015.

RAU, M.H.; HANSEN, S.K.; JOHANSEN, H.K.; THOMSEN, L.E.; WORKMAN, C.T.; NIELSEN, K.F.; JELSBK, L.; HOIBY, N.; YANG, L.; MOLIN, S. Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. **Environ Microbiol.**, v. 12, p. 1643–1658, 2010.

REINHART, A.A.; OGLESBY-SHERROUSE, A.G. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. **Genes (Basel)**, v. 7, p. 126, 2016.

REMANS, K.; PAUWELS, K.; VAN ULSEN, P.; BUTS, L.; CORNELIS, P.; TOMMASSEN, J.; SAVVIDES, S.N.; DECANNIERE, K.; VAN GELDER, P. Hydrophobic surface patches on LolA of *Pseudomonas aeruginosa* are essential for lipoprotein binding. **J Mol Biol.**, v. 401, p. 921-30, 2010.

RICCIO, M.L.; PALLECCHI, L.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. In70 of plasmid pAX22, a *bla*<sub>VIM-1</sub>-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 1249-1253, 2001.

RIZEK, C.; FU, L.; DOS SANTOS, L.C.; LEITE, G.; RAMOS, J.; ROSSI, F.; GUIMARAES, T.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 13, p. 43, 2014.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M.; MACHUCA, J.; CANO, M.E.; CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. **Drug Resist Updat.**, v. 29, p. 29:13-29, 2016.

ROOD, I.G.; LI, Q. Molecular detection of extended spectrum- $\beta$ -lactamase and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a clinical setting. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 89, p. 245-50, 2017.

ROPY, A.; CABOT, G.; SÁNCHEZ-DIENER, I.; AGUILERA, C.; MOYA, B.; AYALA, J.A.; OLIVER, A. Role of *Pseudomonas aeruginosa* low-molecular-mass penicillin-binding proteins in AmpC expression,  $\beta$ -lactam resistance, and peptidoglycan structure. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 3925-34, 2015.

ROSTAMI, S.; FARAJZADEH SHEIKH, A.; SHOJA, S.; FARAHANI, A.; TABATABAIEFAR, M.A.; JOLODAR, A.; SHEIKHI, R. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **J Chin Med Assoc.** 2017. pii: S1726-4901(17)30266-6.

ROY, P.H.; TETU, S.G.; LAROUCHE, A.; ELBOURNE, L.; TREMBLAY, S.; REN, Q.; DODSON, R.; HARKINS, D.; SHAY, R.; WATKINS, K.; MAHAMOUD, Y.; PAULSEN, I.T. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. **PLoS One.**, v. 5, p. e8842, 2010.

RUIZ-GARBAJOSA, P.; CANTÓN, R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. **Rev Esp Quimioter.**, v. 1, p. 8-12, 2017.

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbiol Infect.**, v. 11, p. 73-6, 2005.

SADER, H.S.; FARRELL, D.J.; FLAMM, R.K.; JONES, R.N. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 78, p. 443-8, 2014.

SADER, H.S.; HUBAND, M.D.; CASTANHEIRA, M.; FLAMM, R.K. *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Susceptibility Results from Four Years (2012 to 2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring Program in the United States. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 63, p. pii: e02252-16, 2017.

SAFAEI, H.G.; MOGHIM, S.; ISFAHANI, B.N.; FAZELI, H.; POURSINA, F.; YADEGARI, S.; NASIRMOGHADAS, P.; HOSSEININASSAB NODOUSHAN, S.A. Distribution of the Strains of Multidrug-resistant, Extensively Drug-resistant, and Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Burn Patients. **Adv Biomed Res.**, v. 6, p. 74, 2017.

SAFFARI, M.; FIROOZEH, F.; POURBABAEI, M.; ZIBAEI, M. Evaluation of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Production and Carriage of *bla<sub>VIM</sub>* Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wound Infections in Isfahan. **Arch Trauma Res.**, v. 5, p. e34343, 2016.

SAIER, M.H.JR, PAULSEN, I.T.; SLIWINSKI, M.K.; PAO, S.S.; SKURRAY, R.A.; NIKAIIDO, H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. **FASEB J.**, v. 12, p. 12:265-274, 1998.

SAINT-CRIQ, V.; VILLERET, B.; BASTAERT, F.; KHEIR, S.; HATTON, A.; CAZES, A.; XING, Z.; SERMET-GAUDELUS, I.; GARCIA-VERDUGO, I.; EDELMAN, A.; SALLENAVE, J.M. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. **Thorax.** 2017. pii: thoraxjnl-2017-210298.

SAITO, K.; EDA, S.; MASEDA, H.; NAKAE, T. Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 195, p. 23-8, 2001.

SALABI, A.E.; TOLEMAN, M.A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T.; FREI, R.; WALSH, T.R. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 54, p. 582, 2010.

SANA, T.G.; HACHANI, A.; BUCIOR, I.; SOSCIA, C.; GARVIS, S.; TERMINE, E.; ENGEL, J.; FILLOUX, A.; BLEVES, S. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and

modulates internalization in epithelial cells. **J Biol Chem.**, v. 287, p. 27095-105, 2012.

SÁNCHEZ-DIENER, I.; ZAMORANO, L.; LÓPEZ-CAUSAPÉ, C.; CABOT, G.; MULET, X.; PEÑA, C.; DEL CAMPO, R.; CANTÓN, R.; DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ARCOS, S.C.; NAVAS, A.; OLIVER, A. Interplay among resistance profiles, high-risk clones and virulence in the *Caenorhabditis elegans* *Pseudomonas aeruginosa* infection model. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, p. pii: AAC.01586-17, 2017.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Res Int.**, v. 2016, p. 2475067, 2016.

SERRA, R.; GRANDE, R.; BUTRICO, L.; ROSSI, A.; SETTIMIO, U.F.; CAROLEO, B.; AMATO, B.; GALLELLI, L.; DE FRANCISCIS, S. Chronic Wound Infections: The Role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Expert Rev Anti Infect.**, v. 13, p. 605-613, 2015.

SCHALK, I.J.; GUILLON, L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. **Amino Acids.**, v. 44, p. 1267–1277, 2013.

SCHEFFER, M.C.; GALES, A.C.; BARTH, A.L.; CARMO FILHO, J.R.; DALLA-COSTA, L.M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás. **Braz J Infect Dis.**, v. 14, p. 508-9, 2010.

SCHWEIZER, H.P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. **Genet Mol Res.**, v. 2, p. 48-62, 2003.

SKIADA, A.; MARKOGIANNAKIS, A.; PLACHOURAS, D.; DAIKOS, G.L. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 37, p. 187-93, 2011.

SEVILLANO, E.; GALLEGO, L.; GARCÍA-LOBO, J.M. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. **Pathol Biol (Paris).**, v. 57, p. 493-5, 2009.

SHANG, F.; MUIMHNEACHÁIN, E.Ó.; JERRY REEN, F.; BUZID, A.; O'GARA, F.; LUONG, J.H.T.; GLENNON, J.D.; MCGLACKEN, G.P. One step preparation and electrochemical analysis of IQS, a cell-cell communication signal in the nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 24, p. 4703-4707, 2014.

SHEN, J.; PAN, Y.; FANG, Y. Role of the Outer Membrane Protein OprD2 in Carbapenem-Resistance Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One.**, v. 10, p. e0139995, 2015.

SHI, G.; YIN, H.; YE, J.; PENG, H.; LI, J.; LUO, C. Aerobic biotransformation of decabromodiphenyl ether (PBDE-209) by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemosphere.**, v. 93, p. 1487-1493, 2013.

SHI, L.; LIANG, Q.; FENG, J.; ZHAN, Z.; ZHAO, Y.; YANG, W.; YANG, H.; CHEN, Y.; HUANG, M.; TONG, Y.; LI, X.; YIN, Z.; WANG, J.; ZHOU, D. Coexistence of two novel resistance plasmids, *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying p14057A and tetA(A)-carrying p14057B, in *Pseudomonas aeruginosa*. **Virulence.**, v. 1, p. 6, 2017.

SHIMIZU, W.; KAYAMA, S.; KOUUDA, S.; OGURA, Y.; KOBAYASHI, K.; SHIGEMOTO, N.; SHIMADA, N.; YANO, R.; HISATSUNE, J.; KATO, F.; HAYASHI, T.; SUEDA, T.; OHGE, H.; SUGAI, M. Persistence and epidemic propagation of a *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 clone harboring an IS26 composite transposon carrying the *bla*<sub>IMP-1</sub> integron in Hiroshima, Japan, 2005 to 2012. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 2678-87, 2015.

SHU, J.C.; SU, L.H.; CHIU, C.H.; KUO, A.J.; LIU, T.P.; LEE, M.H.; SU, I.N.; WU, T.L. Reduced production of OprM may promote *oprD* mutations and lead to imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* carrying an *oprD*-group 1A allele. **Microb Drug Resist.**, v. 21, p. 149-57, 2015.

SHU, J.C.; KUO, A.J.; SU, L.H.; LIU, T.P.; LEE, M.H.; SU, I.N.; WU, T.L. Development of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with OprD polymorphisms, particularly the amino acid substitution at codon 170. **J Antimicrob Chemother.**, v. 72, p. 2489-2495, 2017.

SILVA, F.M.; CARMO, M.S.; SILBERT, S.; GALES, A.C.; SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus

sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. **Microb Drug Resist.**, v. 17, p. 215-20, 2011.

SILVA, L.V.; GALDINO, A.C.; NUNES, A.P.; DOS SANTOS, K.R.; MOREIRA, B.M.; CACCI, L.C.; SODRÉ, C.L.; ZICCARDI, M.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, AL. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Med Microbiol.**, v. 304, p. 990-1000, 2014.

SILVEIRA, M.C.; ALBANO, R.M.; ASENSI, M.D.; CARVALHO-ASSEF, A.P. Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. **Infect Genet Evol.**, v. 42, p. 60-5, 2016.

SINGH, G.; SRINIVASAN, R.; CHENG, J.; PENG, Z.; FUJIMURA, K.; BAEK, M.S.; PANZER, A.R.; TRINGE, S.G.; CHEN, F.; SOREK, R.; WENG, L.; BRISTOW, J.; WIENER-KRONISH, J.P.; LYNCH, S.V. Rearrangement of a large novel *Pseudomonas aeruginosa* gene island in strains isolated from a patient developing ventilator-associated pneumonia. **J Clin Microbiol.**, v. 54, p. 2430–8, 2014.

SKAGSETH, S.; CARLSEN, T.J.; BJERGA, G.E.K.; SPENCER, J.; SAMUELSEN, Ø.; LEIROS, H.K.S. Role of Residues W228 and Y233 in the Structure and Activity of Metallo- $\beta$ -Lactamase GIM-1. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, p. 990–1002, 2015.

SKAGSETH, S.; AKHTER, S.; PAULSEN, M.H.; MUHAMMAD, Z.; LAUKSUND, S.; SAMUELSEN, Ø.; LEIROS, H.S.; BAYER, A. Metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors by bioisosteric replacement: Preparation, activity and binding. **Eur J Med Chem.**, v. 135, p. 159-173, 2017.

SMITH, J.D.; KUMARASIRI, M.; ZHANG, W.; HESEK, D.; LEE, M.; TOTH, M.; VAKULENKO, S.; FISHER, J.F.; MOBASHERY, S.; CHEN, Y. Structural analysis of the role of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 5 in beta-lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, p. 3137-3146, 2013.

SNITKIN, E.S.; ZELAZNY, A.M.; GUPTA, J.; NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM, PALMORE TN, MURRAY PR, SEGRE JA. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. **Genome Res.**, v. 23, p. 1155-62, 2013.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Curr Infect Dis Rep.**, v. 19, p. 38, 2017.

SPÍNOLA-AMILIBIA, M.; DAVÓ-SIGUERO, I.; RUIZ, F.M.; SANTILLANA, E.; MEDRANO, F.J.; ROMERO, A. The structure of VgrG1 from *Pseudomonas aeruginosa*, the needle tip of the bacterial type VI secretion system. **Acta Crystallogr D Struct Biol.**, v. 72, p. 22-33, 2016.

STALDER, T.; TOP, E. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. **NPJ Biofilms Microbiomes.**, v. 2, p. pii: 16022, 2016.

STEFANI, S.; CAMPANA, S.; CARIANI, L.; CARNOVALE, V.; COLOMBO, C.; LLEO, M.M.; IULA, V.D.; MINICUCCI, L.; MORELLI, P.; PIZZAMIGLIO, G.; TACCETTI, G. Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **Int J Med Microbiol.**, v. 307, p. 353-362, 2017.

SUÁREZ, C.; PEÑA, C.; GAVALDÀ, L.; TUBAU, F.; MANZUR, A.; DOMINGUEZ, M.A.; PUJOL, M.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. **Int J Infect Dis.**, v. 3, p. e73-8, 2010.

SULEMAN, L. Extracellular Bacterial Proteases in Chronic Wounds: A Potential Therapeutic Target? **Adv Wound Care (New Rochelle).**, v. 5, p. 455-463, 2016.

SUN, Z.; JIAO, X.; PENG, Q.; JIANG, F.; HUANG, Y.; ZHANG, J.; YAO, F. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. **Cell Physiol Biochem.**, v. 31, p. 347-54, 2013.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemic Biophys Res Commun.**, v. 453, p. 254–267, 2014.

SUZUKI, M.; YAMADA, K.; AOKI, M.; HOSOBABA, E.; MATSUMOTO, M.; BABA, H.; IINUMA, Y. Applying a PCR-based open-reading frame typing method for easy genotyping and molecular epidemiological analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Appl Microbiol.**, v. 120, p. 487-97, 2016.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol.**, v. 56, p. 187–209, 2002.

STREMPPEL, N.; NEIDIG, A.; NUSSER, M.; GEFFERS, R.; VIEILLARD, J.; LESOUHAITIER, O.; BRENNER-WEISS, G.; OVERHAGE, J. Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One.**, v. 8, p. e82240, 2013.

TADA, T.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; SHIMADA, K.; SHIMOJIMA, M.; KIRIKAE, T. IMP-43 and IMP-44 metallo- $\beta$ -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, p. 4427-32, 2013.

TADA, T.; NHUNG, P.H.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; SHIMADA, K.; PHUONG, D.M.; ANH, N.Q.; OHMAGARI, N.; KIRIKAE, T. IMP-51, a novel IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase with increased doripenem- and meropenem-hydrolyzing activities, in a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 7090-3, 2015.

TADA, T.; NHUNG, P.H.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; SHIMADA, K.; TSUCHIYA, M.; PHUONG, D.M.; ANH, N.Q.; OHMAGARI, N.; KIRIKAE, T. Multidrug-Resistant Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Producing IMP-26 with Increased Carbapenem-Hydrolyzing Activities in Vietnam. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, p. 6853-6858, 2016.

TADA, T.; SHIMADA, K.; SATOU, K.; HIRANO, T.; POKHREL, B.M.; SHERCHAND, J.B.; KIRIKAE, T. *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Nepal Coproducing Metallo- $\beta$ -Lactamases and 16SrRNA Methyltransferases. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, p. pii: e00694-17, 2017.

TALWALKAR, J.S.; MURRAY, T.S. The Approach to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. **Clin Chest Med.**, v. 37, p. 69-81, 2016.

THOMSON, J.M.; BONOMO, R.A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! **Curr Opin Microbiol.**, v. 8, p. 518-24, 2005.

TORRENS, G.; PÉREZ-GALLEGU, M.; MOYA, B.; MUNAR-BESTARD, M.; ZAMORANO, L.; CABOT, G.; BLÁZQUEZ, J.; AYALA, J.A.; OLIVER, A.; JUAN, C. Targeting the permeability barrier and peptidoglycan recycling pathways to disarm *Pseudomonas aeruginosa* against the innate immune system. **PLoS One.**, v. 12, p. e0181932, 2017.

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-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother.**, v. 50, p. 673-9, 2002.

TREEPONG, P.; KOS, V.N.; GUYEUX, C.; BLANC, D.S.; BERTRAND, X.; VALOT, B.; HOCQUET, D. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. **Clin Microbiol Infect.**, v. 2017. pii: S1198-743X(17)30342-7.

TUON, F.F.; GORTZ, L.W.; ROCHA J.L. Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy. **Braz J Infect Dis.**, v. 16, p. 351-6, 2012.

TURANO, H.; GOMES, F.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, S.; FONTES, L.C.; SATO, M.I.; LINCOPAN, N. Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 86, p. 80-2, 2016.

TURNER, K.H.; EVERETT, J.; TRIVEDI, U.; RUMBAUGH, K.P.; WHITELEY, M. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection. **PLoS Genet.**, v. 10, p. e1004518, 2014.

TURTON, J.F.; WRIGHT, L.; UNDERWOOD, A.; WITNEY, A.A.; CHAN, Y.T.; AL-SHAHIB, A.; ARNOLD, C.; DOUMITH, M.; PATEL, B.; PLANCHE, T.D.; GREEN, J.; HOLLIMAN, R.; WOODFORD, N. High-Resolution Analysis by Whole-Genome Sequencing of an International Lineage (Sequence Type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Metallo-Carbapenemases in the United Kingdom. **J Clin Microbiol.**, v. 53, p. 2622-31, 2015.

ULLAH, W.; QASIM, M.; RAHMAN, H.; JIE, Y.; MUHAMMAD, N. Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Phenotypic characteristics and molecular identification of virulence genes. **J Chin Med Assoc.**, v. 80, p. 173-177, 2017.

VAN BAMBEKE, F.; BALZI, E.; TULKENS, P.M. Antibiotic efflux pumps. **Biochem Pharmacol.**, v. 60, p. 60:457-470, 2000.

VEGA, S.; DOWZICKY, M.J. Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative organisms collected from the Latin American region between 2004

and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 16, p. 50, 2017.

VENTRE, I.; GOODMAN, A.L.; VALLET-GELY, I.; VASSEUR, P.; SOSCIA, C.; MOLIN, S.; BLEVES, S.; LAZDUNSKI, A.; LORY, S.; FILLOUX, A. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. **Proc. Natl Acad Sci USA.**, v. 103, p. 171–176, 2006.

VENTURI, V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 30, p. 274-91, 2006.

VIANA VIEIRA, V.V.; LOURENÇO DA FONSECA, E.; PAULO-VICENTE, A.C. Metallo- $\beta$ -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Clin Microbiol Infect.**, v. 11, p. 937, 2005.

VINCKX ,T.; WEI, Q.; MATTHIJS, S.; CORNELIS, R. The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative 463 stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protec-tive 464 role of pyocyanin. **Microbiol.**, v. 156, p. 678–686, 2010.

VUOTTO, F.; BERTHON, C.; LEMAITRE, N.; DUHAMEL, A.; BALKARAN, S.; LE, R.E.; MICOL, J.B.; FAURE, K.; ALFANDARI, S. Risk factors, clinical features, and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with hematologic malignancies: a case-control study. **Am J Infect Control.**, v. 41, p. 527–30, 2013.

WALKTY, A.; LAGACE-WIENS, P.; ADAM, H.; BAXTER, M.; KARLOWSKY, J.; MULVEY, M.R.; MCCRACKEN, M.; ZHANEL, G.G. Antimicrobial susceptibility of 2906 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: Results of the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008-2015. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 87, p. 60-63, 2016.

WANG, S.; YU, S.; ZHANG, Z.; WEI, Q.; YAN, L.; AI, G.; LIU, H.; MA L.Z. Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 80, p. 6724–6732. 2014.

WAREHAM, D.W.; CURTIS, M.A. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. **Int J Med Microbiol.**, v. 297, p. 227-34, 2007.

- WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 35, p. 147-51, 1991.
- WATERS, V.; ZLOSNIK, J.E.; YAU, Y.C.; SPEERT, D.P.; AARON, S.D.; GUTTMAN, D.S. Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 31, p. 3341-50, 2012.
- WEI, Q.; MA, L.Z. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Mol Sci.**, v. 14, p. 20983-1005, 2013.
- WEIGERT, M.; ROSS-GILLESPIE, A.; LEINWEBER, A.; PESSI, G.; BROWN, S.P.; KÜMMERLI, R. Manipulating virulence factor availability can have complex consequences for infections. **Evol Appl.**, v. 10, p. 91-101, 2016.
- WENDEL, A.F.; BRODNER, A.H.; WYDRA, S.; RESSINA, S.; HENRICH, B.; PFEFFER, K.; TOLEMAN, M.A.; MACKENZIE, C.R. Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, p. 5162–5165, 2013.
- WENDEL, A.F.; MACKENZIE, C.R. Characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase variant, GIM-2, from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in Germany. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, p. 1824-5, 2015.
- WILHELM, S.; GDYNIA, A.; TIELEN, P.; ROSENAU, F.; JAEGER, K.E. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. **J Bacteriol.**, v. 189, p. 6695-703, 2007.
- WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Curr Opin Microbiol.**, v. 12, p. 182-91, 2009.
- WINSOR, G.L.; LAM, D.K.; FLEMING, L.; LO, R.; WHITESIDE, M.D.; YU, N.Y.; HANCOCK, R.E.; BRINKMAN, F.S. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, p. D596-600.B, 2011.

WINSTANLEY, C.; O'BRIEN, S.; BROCKHURST, M.A. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. **Trends Microbiol.**, v. 24, p. 327-37, 2016.

WIRTH, F.W.; PICOLI, S.U.; CANTARELLI, V.V.; GONÇALVES, A.L.; BRUST, F.R.; SANTOS, L.M.; BARRETO, M.F. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from southern Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v. 13, p. 170-2, 2009.

WOŁKOWICZ, T.; PATZER, J.A.; KAMIŃSKA, W.; GIERCZYŃSKI, R.; DZIERŻANOWSKA, D. Distribution of carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates among hospitalised children in Poland: Characterisation of two novel insertion sequences disrupting the *oprD* gene. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 7, p. 119-125, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance.** 2014. Disponível em [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf) (a)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **10 facts on patient safety.** 2014. Disponível em [http://www.who.int/features/factfiles/patient\\_safety/patient\\_safety\\_facts/em/index9.html](http://www.who.int/features/factfiles/patient_safety/patient_safety_facts/em/index9.html)

WRIGHT, L.L.; TURTON, J.F.; HOPKINS, K.L.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Genetic environment of metallo- $\beta$ -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the UK. **J Antimicrob Chemother.**, v. 70, p. 3250-8, 2015.

XIA, J.; GAO, J.; TANG, W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Biosci Trends.**, v. 10, p. 14-21, 2016.

YAN, S.; WU, G. Reorganization of gene network for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under several conditions. **J Appl Genet.**, v. 58, p. 545-563, 2017.

YANAGIHARA, K.; WATANABE, A.; AOKI, N.; MATSUMOTO, T.; YOSHIDA, M.; SATO, J.; WAKAMURA, T.; SUNAKAWA, K.; KADOTA, J.; KIYOTA, H.; IWATA, S.; KAKU, M.; HANAKI, H.; OHSAKI, Y.; FUJIUCHI, S.; TAKAHASHI, M.; TAKEUCHI, K.; TAKEDA, H.; IKEDA, H.; MIKI, M.; NAKANOWATARI, S.; TAKAHASHI, H.; UTAGAWA, M.; NISHIYA, H.; KAWAKAMI, S.; MORINO, E.; TAKASAKI, J.; MEZAKI,

K.; CHONABAYASHI, N.; TANAKA, C.; SUGIURA, H.; GOTO, H.; SARAYA, T.; KURAI, D.; KATONO, Y.; INOSE, R.; NIKI, Y.; TAKUMA, T.; KUDO, M.; EHARA, S.; SATO, Y.; TSUKADA, H.; WATABE, N.; HONMA, Y.; MIKAMO, H.; YAMAGISHI, Y.; NAKAMURA, A.; OHASHI, M.; SEKI, M.; HAMAGUCHI, S.; TOYOKAWA, M.; FUJIKAWA, Y.; MITSUNO, N.; UKIMURA, A.; MIYARA, T.; NAKAMURA, T.; MIKASA, K.; KASAHARA, K.; UI, K.; FUKUDA, S.; NAKAMURA, A.; MORIMURA, M.; YAMASHITA, M.; TAKESUE, Y.; WADA, Y.; SUGIMOTO, K.; KUSANO, N.; NOSE, M.; MIHARA, E.; KUWABARA, M.; DOI, M.; WATANABE, Y.; TOKUYASU, H.; HINO, S.; NEGAYAMA, M.; MUKAE, H.; KAWANAMI, T.; OTA, T.; FUJITA, M.; HONDA, J.; HIRAMATSU, K.; AOKI, Y.; FUKUOKA, M.; MAGARIFUCHI, H.; NAGASAWA, Z.; KAKU, N.; FUJITA, J.; HIGA, F.; TATEYAMA, M. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in 2012: General view of the pathogens' antibacterial susceptibility. **J Infect Chemother.**, v. 23, p. 587-597, 2017.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.M.; LEE, K.; WALSH, T.R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 5046-54, 2009.

YOUSEFI-AVARVAND, A.; KHASHEI, R.; EBRAHIM-SARAIE, H.S.; EMAMI, A.; ZOMORODIAN, K.; MOTAMEDIFAR, M. The Frequency of Exotoxin A and Exoenzymes S and U Genes Among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran. **Int J Mol Cell Med.**, v. 4, p. 167-173, 2015.

YU H, HE X, XIE W, XIONG J, SHENG H, GUO S, HUANG C, ZHANG D, ZHANG K. Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. **Can J Microbiol.**, v. 60, p. 227-35, 2014.

YUN, H.C.; TULLY, C.C.; MENDE, K.; CASTILLO, M.; MURRAY, C.K. A single-center, six-year evaluation of the role of pulsed-field gel electrophoresis in suspected burn center outbreaks. **Burns.**, v. 42, p. 1323-30, 2016.

YUSUF, E.; VAN HERENDAEL, B.; VERBRUGGHE, W.; IEVEN, M.; GOOVAERTS, E.; BERGS, K.; WOUTERS, K.; JORENS, P.G.; GOOSSENS, H. Emergence of

antimicrobial resistance to *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: association with the duration of antibiotic exposure and mode of administration. **Ann Intensive Care.**, v. 7, p. 72, 2017.

ZHU, X.; TONG, A.; WANG, D.; SUN, H.; CHEN, L.; DONG, M. Antibiotic resistance patterns of Gram-negative and Gram-positive strains isolated from inpatients with nosocomial infections in a tertiary hospital in Beijing, China from 2011 to 2014. **J Chemother.**, v. 27, p. 1-4, 2016.

ZABORIN, A.; ROMANOWSKI, K.; GERDES, S.; HOLBROOK, C.; LEPINE, F.; LONG, J.; POROYKO, V.; DIGGLE, S.P.; WILKE, A.; RIGHETTI, K.; MOROZOVA, I.; BABROWSKI, T.; LIU, D.C.; ZABORINA, O.; ALVERDY, J.C. Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 106, p. 6327-32, 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- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **J Antimicrob Chemother.**, v. 56, p. 1148-51, 2005.

ZHANG, J.; CHU, Y.; WANG, P.; JI, X.; LI, X.; WANG, C.; PENG, Y. Clinical outcomes of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection and the relationship with type III secretion system in patients with diabetic foot. **Int J Low Extrem Wounds.**, v. 13, p. 205-10, 2014.

ZIMLICHMAN, E.; HENDERSON, D.; TAMIR, O.; FRANZ, C.; SONG, P.; YAMIN, C.K.; KEOHANE, C.; DENHAM, C.R.; BATES, D.W. Health care-associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. **JAMA Intern Med.**, v. 173, p. 2039-46, 2013.

## APRESENTAÇÃO

Nesta tese de doutorado são apresentados três artigos científicos relacionados à detecção de mecanismos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina (HU).

No primeiro artigo, uma coleção de isolados clínicos de *P. aeruginosa* foi avaliada para a detecção de mecanismos de virulência e de resistência aos antimicrobianos. Neste trabalho é evidenciada a diversidade de genes de beta-lactamases detectada bem como a presença de importantes fatores de virulência relacionados a infecções nestes isolados clínicos. Enfatiza-se neste artigo a presença de clones epidêmicos mundiais de *P. aeruginosa* no HU, os quais estão relacionados à disseminação da resistência, surtos de infecções e mau prognóstico do pacientes. O artigo será submetido ao periódico *Scientific Reports - Nature*.

O segundo estudo foi recentemente publicado no periódico *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* (Balero de Paula et al., 2017). O artigo relata, pela primeira vez no Brasil, a detecção da carbapenemase VIM-7 produzida por um isolado clínico de *P. aeruginosa* recuperado no HU em 2013, fora dos Estados Unidos da América, onde esta enzima foi primeiramente isolada no mundo. Este artigo foi desenvolvido em parceria com grupo de pesquisa do Laboratório ALERTA, da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP).

O terceiro artigo foi desenvolvido em forma de *letter* com o objetivo de descrever a presença de um isolado de *P. aeruginosa* recuperado em 2008 no HU no qual se detectou a enzima *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) num período anterior a um surto de infecções por enterobactérias produtoras de KPC neste hospital. Enfoca-se, em especial neste trabalho, que o isolado clínico de *P. aeruginosa* é pertencente a um clone epidêmico mundial, de alto risco de disseminação e raramente detectado no Brasil. O artigo foi submetido ao periódico *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. A realização deste estudo selou a parceria com o grupo de pesquisa liderado pela Dra Renata Cristina Picão do Laboratório de Investigação de Microbiologia Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## Artigo 1

### ***Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a tertiary hospital in Londrina, Brazil: phenotypes and genotypes of resistance, clonality, and virulence factors**

Suelen Balero de Paula-Petroli<sup>1</sup>, Francielle Eleodoro de Oliveira<sup>2</sup>, Rodrigo Cayô<sup>3</sup>, Ana Paula Streling<sup>3</sup>, Carolina Silva Nodari<sup>3</sup>, Alexandre Tadachi Morey<sup>1</sup>, Emerson José Venâncio<sup>4</sup>, Ana Cristina Gales<sup>3</sup>, Floristher Elaine Carrara-Marroni<sup>2</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - PR, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Clínica, Hospital Universitário de Londrina, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - PR, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório Alerta, Disciplina de Infectologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo - SP, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório de Imunologia IV, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – PR, Brazil.

\*Corresponding author

**Current Address:** Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445 Km 380, Campus Universitário, 86057-970, Londrina - PR, Brazil. Phone/Fax.: +55 43 33715503. E-mail: ogatta@uel.br.

## ABSTRACT

In this study, 210 *P. aeruginosa* isolates were characterized for antimicrobial susceptibility testing, carbapenemase production and resistance encoding genes. The carbapenemase-producing isolates were tested for production of several virulence factors and their genetic relatedness was assessed by ERIC-PCR and MLST. High rates of carbapenem resistance were observed and only polymyxins showed activity against all isolates. The production of carbapenemases and metallo-beta-lactamases were detected in 33.3% and 31.9% of the isolates by Blue Carba Test and Triple-Disc Synergy Test, respectively. Carbapenemase encoding genes were found among 70 isolates: *bla*<sub>SPM-1</sub> (30.0%), *bla*<sub>KPC-2</sub> (1.4%), *bla*<sub>IMP-16</sub> (0.9%), *bla*<sub>VIM-1</sub> (0.4%) and *bla*<sub>VIM-7</sub> (0.4%). Beta-lactamase encoding genes (*bla*<sub>GES-26</sub>, *bla*<sub>OXA-46</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) and aminoglycoside resistance (*rmtD*) were detected. The *bla*<sub>IMP-16</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> and *bla*<sub>VIM-7</sub> genes were detected in class I integrons. All the carbapenemase-producing isolates formed biofilm and presented the *lasI* and *exoY* genes. A total of 98.6% and 94.3% were producers of hemolysins and proteases. The *plcH*, *lasB*, *toxA* and *exoS* were detected in at least 94.3% of the isolates. Only one and four isolates showed the *nanI* and *exoU*, respectively. The molecular typing showed a high clonal diversity and five different STs were obtained. The present study demonstrates a diversity of carbapenem resistance determinants and the presence of high-risk clones (ST235 and ST277) in HU. In addition, the clonal dynamics and virulence traits of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* from this institution was revealed.

## 1. INTRODUCTION

*Pseudomonas aeruginosa* is one of the leading causes of health-care associated infections, which induces various disorders mainly in immunocompromised individuals, patients with cystic fibrosis and burn victims (Kariminik et al., 2017). This opportunistic pathogen is implicated in a wide variety of clinical infections, including pneumonia, skin structure infections, urinary tract infections, surgical site infections, wound burn and bloodstream infections (Sader et al., 2017). *P. aeruginosa* is naturally resistant to many drugs, and presents a remarkable ability to acquire further resistance mechanisms to multiple classes of antimicrobial agents (Subedi et al., 2017). Infections caused by multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) strains severely compromise the treatment and are associated with increased morbidity, mortality, and health care costs (Oliver et al., 2015; O'Neill, 2016).

Carbapenems are potent broad-spectrum beta-lactamics used for treating MDR and XDR *P. aeruginosa* infections (Feng et al., 2017). The increasing resistance to these important antimicrobial agents has restricted their use and limited the antimicrobial options for infections caused by *P. aeruginosa* isolates (Labarca et al., 2016; Meletis, 2016). Although carbapenem resistance in *P. aeruginosa* may occur through different mechanisms, the acquired carbapenemases are of the utmost concern, due to their very wide hydrolytic spectrum that affect almost all beta-lactams; their increasing prevalence; as well their easily transmissible nature once they are frequently carried on mobile genetic elements, associated with genes conferring resistance to other classes of antimicrobials (Gniadek et al., 2016; Papagiannitsis et al., 2017).

Beyond of to the various mechanisms of resistance detected among *P. aeruginosa* isolates, this microorganism can produce an arsenal of virulence attributes and to form biofilm (Schroeder et al., 2017; Moradali et al., 2017). These bacterial virulence traits act by increasing the tissue damage, causing cell death and necrosis and act helping bacteria to evade the host immune system recognition, contributing to the establishment and maintenance of the infectious process (Balasubramanian et al., 2013; Reinhart; Oglesby-Sherrouse, 2016). A complex regulatory circuit involving cell-to-cell signaling are associate with gene expression regulation, including the expression of resistance and virulence genes, and biofilm formation. Therefore, *quorum sensing* allows the bacteria to produce these factors in a coordinated manner (Wolloscheck et al., 2017).

Biofilm is considered an important virulence factor of *P. aeruginosa*, and the biofilm formation is strongly correlated with antibiotic and immune system resistance, to virulence traits, and the course of infection (Di Domenico et al., 2017). *P. aeruginosa* virulence also includes the expression of soluble molecules such as toxins (exotoxins - A, U, Y, T and S) and enzymes (phospholipases, lipases and proteases) (Georgesku et al., 2016; Takata et al., 2017).

High-risk clones are responsible for epidemics of nosocomial infections by MDR/XDR *P. aeruginosa* strains worldwide (Oliver, 2015). Biological parameters and virulence traits have been described and these strains showed significantly increased biofilm formation but reduced motility and production of pigments (Mulet et al., 2013). Moreover, another virulence factor, the presence of type III secretion system (TTSS genotype) has differentiated high-risk clones and has been correlated with the clinical outcome of the infected patients (Edelstein et al., 2013; Sánchez-Diener et al., 2017).

The aim of this work was to determine the molecular epidemiology, susceptibility profiles and resistance mechanisms of a large collection of *P. aeruginosa* clinical isolates obtained from a tertiary hospital in Southern Brazil. In addition, the genetic relatedness and virulence profile of carbapenemase-producing isolates were analyzed, with a focus on high-risk epidemic clones by MLST.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Bacterial strains

A collection of 210 *P. aeruginosa* isolates non-susceptible to ceftazidime, imipenem and/or meropenem, obtained from patients admitted to a teaching hospital in Londrina, Paraná, Brazil, over a period from June 2012 until May 2014. Isolates recovered from urine, respiratory tract samples, blood, soft tissues and from vigilance cultures were included in this study. Clinical specimens were collected from 197 patients hospitalized in intensive care units, clinical and surgical wards as well as from ambulatory. Isolates were phenotypically identified according conventional biochemical tests, morphological and growth characteristics, and using Vitek-2 System GN ID Card (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and stored until this study. The identification of *P. aeruginosa* was confirmed by amplification of 16S ribosomal DNA according Spilker et al. (2004). For the antimicrobial susceptibility testing *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) were used as quality control strains.

### 2.2 Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility to amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), aztreonam (30 µg), cefepime (30 µg), ceftazidime (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), piperacillin-tazobactam (100/10 µg), colistin (10 µg), polymyxin B (300 units), ciprofloxacin (5 µg) and levofloxacin (5 µg) were determined by the disk-diffusion method, following Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). The results were interpreted according to CLSI document M100-S27 (CLSI, 2017). The isolates were classified as MDR or XDR isolates according to proposed definitions by Magiorakos et al. (2012). Therefore, isolates non-susceptible at least one agent in at least three antimicrobial categories were considered MDR and isolates non-susceptible to at least one agent in at least six categories were known XDR. For the carbapenemase-producing isolates the minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem, meropenem, ceftazidime, colistin and polymyxin B were performed according the CLSI guidelines (CLSI, 2012; CLSI, 2017).

### 2.3 Phenotypic detection of carbapenemase production

The Blue-Carba test (BCT) (Pires et al., 2013) was performed for detection of carbapenemase production in *P. aeruginosa* isolates. For the BCT, a loop of a pure bacterial cultured in Muller Hinton plates was directly suspended in 100  $\mu$ L of the test solution (0.04% aqueous solution of bromothymol blue pH 6.0, 0.1mmol/L ZnSO<sub>4</sub> and 3 mg/mL of imipenem, final pH 7.0) and in 100  $\mu$ L of the control solution (without imipenem, final pH 7.0), followed by incubation at 37°C for 2h. The change of color from blue/green to yellow in the test solution was observed in carbapenemase-producing isolates. Non-carbapenemase-producing isolates remained blue or green on both solutions.

Phenotypic detection of metallo-beta-lactamases (MBL) was performed by triple-disc synergy test (TDST) using imipenem, meropenem and ceftazidime as substrates and, the 2-mercaptopropionic acid (2-MPA) and ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) as MBL inhibitors (Arakawa et al., 2000). Briefly, an overnight culture was adjusted to 0.5 McFarland bacterial suspension and was inoculated on a Muller Hinton agar plate. Imipenem (10  $\mu$ g), meropenem (10  $\mu$ g) and ceftazidime (30  $\mu$ g) disks were aligned around blank filter disks containing 5.0  $\mu$ L of 100 mM EDTA and 3.0  $\mu$ L of 2-MPA. The distances tested between the substrates and inhibitors were 1.5 and 2.0 cm (from center to center) for EDTA and 2-MPA, respectively. The appearance of either an enhanced or a phantom zone between the antimicrobial agents and the inhibitor disk was considered a positive result and indicative of MBL production.

### 2.4 Detection of resistance encoding genes and integrons

Detection of class A (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>), class B (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, and *bla*<sub>NDM</sub>) and class D (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>OXA-143</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub>) beta-lactamases genes, 16S rRNA methylases genes (*rmtA*, *rmtC*, *rmtD* and *rmtG*), plasmid-mediated *qnr* genes (*qnrD*, *qnrA*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrB* and *qnrVC*) and the plasmid mediated colistin resistance gene (*mcr-1*) were performed using specific primers and cycling parameters described elsewhere (Kraychete et al., 2016; Wang et al., 2006; Mendes et al., 2007; Doyle et al., 2012; Woodford et al., 2006a, 2006b; Higgins et al., 2010; Wang et al., 2016; Liu et al., 2016). Integrases encoding genes of class I, II and III integrons (*intI*, *intII* and *intIII*) were also tested (Lévesque et al., 1995). Amplicons of *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) and sequenced in both strands using the Applied Biosystems 3500 genetic analyzer equipment (Applied Biosystems, USA). Integrons harboring MBL-encoding genes

were characterized by PCR and DNA sequencing using specific -IMP, -VIM primers in combination with 5'CS and 3'CS primers of the conserved regions of class I integrons (Picão et al., 2012).

### 2.5 Detection of virulence-associated genes

Detection of virulence genes encoding for elastase (*lasB*), hemolytic phospholipase (*plcH*), exotoxin A (*toxA*), type III secretion system (*exoU*, *exoS* and *exoY*), extracellular neuraminidase (*nanI*) and a component of *quorum sensing* (*lasI*), were conducted by PCR using published primers (Lanotte et al., 2004; Mitov et al., 2010 Sabharwal et al., 2014; Sawa et al., 2014)

### 2.6 Phenotypic detection of virulence factors

The isolates were previously grown in Muller-Hinton agar at 37°C for 18h. The cell density was adjusted to  $1 \times 10^7$  colony forming units (CFU)/mL and this standard inoculum was used in the tests. The experiments were carried out in triplicate on three different occasions, except when specified. *P. aeruginosa* PA01 was included in all experiments.

#### 2.6.1 Biofilm Formation

Biofilm production on an abiotic surface was quantified adding 200  $\mu$ L of the standard suspension in a 96-well flat-bottomed polystyrene microtiter plate (Techno Plastic Products, Switzerland). Negative control wells containing only TSB were included. The plates were incubated under aerobic conditions at 37°C for 24h without agitation. After the incubation period, the medium was aspirated off and non-adherent cells were removed by washing thoroughly three times with sterile phosphate-buffered saline (0.2M, pH 7.2). The adherent bacterial film was fixed with cold methanol for 15 minutes and then stained with filtered 1.0% crystal violet. Bound dye was released by adding 33.0% acetic acid (Georgescu et al., 2016). Absorbance was measured spectrophotometrically at 570 nm. Experiments were carried out in quintuplicate on three different occasions. Biofilm formation was scored according to the criteria proposed by Stepanovic et al. (2000).

#### 2.6.2 Hemolytic Activity

Hemolytic activity on blood agar plates were tested by inoculating 10  $\mu$ L of the standard inoculum in the center of agar base supplemented with 5.0% sheep erythrocytes. The

plates were then incubated at 37°C for 24h. The presence of a clear colourless zone surrounding the colonies indicated hemolytic activity (Tayabali et al., 2012).

### 2.6.3 Proteolytic Activity

Protease production was evaluated by using protease plates containing skim milk powder agar according to Sokol et al. (1979). Ten microliters of standard inoculum was placed on the agar medium surface. The presence of a clear colourless zone surrounding the colonies indicated protease activity.

### 2.6.4 Aesculin Hydrolysis

For aesculinase activity, a medium supplemented with 1.0% aesculin and 0.5% ferric ammonium citrate was used. Briefly, the standard inoculum was inoculated on the agar medium surface. Enzyme production was detected after 24h of incubation, at 37°C. A black precipitate around the culture, due conversion of esculin to esculetin, was considered a positive reaction (Qadri et al., 1980).

## 2.7 Molecular typing

The genetic relatedness among carbapenemase-producing isolates was investigated by amplification of the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence (ERIC-PCR). The amplicons were analysed after gel electrophoresis and staining with ethidium bromide (0.5 µg/mL). The gel was photographed and analysed using L-Pix Touch (Loccus, Cotia, Brazil). Band patterns were analysed with BioNumerics v. 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) using the Dice coefficient and unweighted pair group method with arithmetic mean pair group method with arithmetic average. Isolates with 93% level of similarity were considered clonally related (Silbert et al., 2004).

One isolate of each carbapenemase-producing *P. aeruginosa* group and one SPM-1-producing isolate arbitrary selected from the most abundant genetic group detected by ERIC-PCR were selected for determining the Sequence Types (ST) by standard DNA amplification of the seven house-keeping genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* and *trpE*) (Cacci et al., 2016). The PCR products were sequenced in both directions and the sequences were compared with the allele sequences and ST profiles hosted in the MLST database available at <http://pubmlst.org/paeruginosa>.

## 2.8 Statistical Analysis

Qualitative variables associated with *P. aeruginosa* isolates were analyzed using the Chi-square test and Fisher's exact test when appropriate. All analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 20.0, and *p* value less than 0.05 was considered significant.

## 3. RESULTS

### 3.1 Demographic characteristic of patients

A total of 197 patients were enrolled in this study and of these, 138 (70.0%) were males and 59 (29.9%) females, and their ages ranged from 0 to 90 years. The 210 isolates were obtained from specimens originated from urinary tract (42 isolates, 20.0%), respiratory tract (50 isolates, 23.8%), bloodstream (5 isolates, 2.4%), soft tissue (18 isolates, 8.6%), swab (84 isolates, 40.0%), catheter tips (2 isolates, 0.9%) and non-respiratory secretions (9 isolates, 4.3%). Clinical specimens were collected from patients hospitalized in intensive care units (91, 43.3%), clinical and surgical wards (58, 27.6%), emergency room (48, 22.8%), pediatrics units (5, 2.4%), as well as from ambulatory (8, 3.8%) as a standard care procedure and were stored for this study. Statistical analysis was carried out between the demographics data of patients infected by *P. aeruginosa* isolates (producing-carbapenemase and non-producing-carbapenemase) and no association was detected in the gender of the patients (Chi-Square = 0.407; *P* = 0.52), age of the patients (Chi-square = 5.185; *P* = 0.26), hospital units (Fisher's exact test = 6,041; *P* = 0.19), as well as in clinical materials (Fisher's exact test = 8,274; *P* = 0.08) (Table 1).

### 3.2 Antibiotic susceptibility profile and carbapenemase/metallo-beta-lactamase production

Of the 210 isolates, 115 isolates (54.76%) were considered XDR and 67 (31.90%) were considered MDR. High resistance rates were found for carbapenems (80.95% for imipenem and 78.09% for meropenem) and fluoroquinolones (77.62% for ciprofloxacin and 78.57% for levofloxacin). Resistance was also found for ceftazidime (63.81%), cefepime (59.05%), amikacin (72.86%), gentamicin (72.38%), piperacillin/tazobactam (40.47%) and aztreonam (32.86%). None isolates was resistant to polymyxins (Table 2).

Of the 210 isolates, 70 (33.33%) were phenotypically identified as carbapenemase producers by BCT and the MBL production was detected in 67 isolates (31.90%) by the performance of the TDST.

Among the 70 carbapenemase-producing isolates, higher rates of resistance were detected for: cefepime (100.00%), ceftazidime (98.57%), imipenem (97.14%), meropenem (95.71%), amikacin (97.14%), gentamicin (97.14%), ciprofloxacin (95.71%) and levofloxacin (95.71%) (Table 2). Of these isolates, 47 (67.14%) and 23 (32.86%) were considered XDR and MDR, respectively. MICs ranging from 16 to  $\geq 128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ceftazidime, 2 to  $\geq 128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  for imipenem and 0.5 to  $\geq 128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  for meropenem were detected. All isolates were susceptible to colistin and polymyxin B with MICs from 0.5 to 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.25 to 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

### 3.3 Molecular resistance encoding genes

Among the collection of 210 isolates, 70 (33.33%) harbored a carbapenemase gene. The most frequent carbapenemase gene identified was *bla*<sub>SPM</sub> (63/30.00%), followed by *bla*<sub>KPC</sub> (3/1.43%), *bla*<sub>IMP</sub> (2/0.95%) and *bla*<sub>VIM</sub> (2/0.95%). Sequencing analysis revealed the SPM-1, KPC-2, IMP-16, VIM-1 and VIM-7 carbapenemases.

Seven isolates harboring *bla*<sub>GES-26</sub>, four isolates with *bla*<sub>OXA-46</sub>, one isolate with *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and one with *rmtD* were also detected. The co-existence of *bla*<sub>GES-26</sub> with *bla*<sub>SPM-1</sub> was reported in four isolates. The *bla*<sub>OXA-46</sub> was observed in co-existence with isolates harboring *bla*<sub>IMP-16</sub> or with *bla*<sub>VIM-7</sub>. In one XDR isolate, three beta-lactamase-coding genes (*bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>OXA-46</sub>) were observed.

Genes of class I integrases were found in the IMP-16, VIM-1 and VIM-7-producing *P. aeruginosa* isolates. None class II and III integrases genes were detected. The variable region of the IMP-16-producing isolates presented only the *bla*<sub>IMP-16</sub> cassette gene in the class I integron. Analysis of variable region of class I integrons harboring the *bla*<sub>VIM-1</sub> and *bla*<sub>VIM-7</sub>-genes showed that these MBL genes were localized in the first position of this element, followed by an aminoglycoside-modifying enzyme (*aacA4*). A narrow-spectrum oxacillinase encoding gene (*bla*<sub>OXA-46</sub>) followed by *qac* $\Delta$ E1/*suII* were located at the 3'-CS.

### 3.4 Dissemination of carbapenemases and international clones

Analysis of genetic similarity by ERIC-PCR showed great clonal diversity among the 70 carbapenemases-producing isolates (Figure 1). Eighteen clusters (named A-R) were identified and the genotypes most representatives were H (12 isolates), K (12 isolates), C (10 isolates) and D (8 isolates). SPM-1-producing isolates were distributed in 14 genotypes. The two IMP-16 producing isolates belonged to genotype N. The genotype Q included the three KPC-2 producing isolates.

The five isolates submitted to MLST analysis were assigned to different STs: the KPC-producing isolate was identified as ST235, the VIM-1 as ST230, the VIM-7 as ST1284, the IMP-16 as ST273 and the SPM-1 as ST277 (Table 3).

### 3.5 Virulence factors

Virulence factors were phenotypically and molecularly analyzed in the 70 carbapenemase-producing isolates. All isolates were able to form biofilm, of which 22 (31.43%), 18 (25.71%) and 30 (42.86%) isolates were considered as weak, moderate and strong biofilm producers, respectively. Sixty-nine (98.57%) of the *P. aeruginosa* carbapenemase-producing isolates showed hemolysis on blood agar. Protease activity was detected in sixty six (94.28%) isolates. Aesculin hydrolysis was not detected (Table 4).

All carbapenemase-producing isolates harbored three or more virulence encoding genes analyzed here but none isolate presented all genes together. The *lasI* and *exoY* were detected in all isolates. The *plcH* gene was detected in 68 (97.14%) isolates. Sixty-seven (95.71%) isolates had *toxA* and *lasB*. The *exoS* and *exoU* genes were detected in sixty six (94.28%) and four (5.71%) isolates, respectively. Only one isolate (1.43%) showed the *nanI* gene (Table 5).

Some variations were verified on the distribution of the type III secretion toxin-encoding gene where *exoY*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>/*exoU*<sup>-</sup>, *exoY*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>+</sup>/*exoU*<sup>-</sup>, *exoY*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>/*exoU*<sup>+</sup> and *exoY*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>+</sup>/*exoU*<sup>+</sup> genotypes were detected. The majority (64/91.43%) of the isolates showed the genotype *exoY*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>+</sup>/*exoU*<sup>-</sup>. The *exoY*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>/*exoU*<sup>-</sup> was found in two isolates, both SPM-1-producing isolates. The genotype *exoY*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>/*exoU*<sup>+</sup> was found in three isolates, all KPC-2-producing isolates, and only the VIM-1-producing isolate showed of genotype *exoY*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>+</sup>/*exoU*<sup>+</sup>.

No association between the virulence determinants and the origin of the clinical material was detected [hemolysin (Fisher's exact test = 4.448, P = 0.34); protease (Fisher's exact test = 1.469; P = 0.83); biofilm production (Fisher's exact test = 10,810; P = 0.21); *nanI* (Fisher's exact test = 0.806, P = 0.93); *lasB* (Fisher's exact test = 1.397, P = 0.845); *plcH* (Fisher's exact test = 1.637, P = 0.802); *toxA* (Fisher's exact test = 1.241; P = 0.87); *exoU* (Fisher exact test = 2920; P = 0.571); *exoS* (Fisher exact test = 4.203, P = 0.37)].

A statistically significant association was found between the type of carbapenemase and the hemolysin production (Fisher's exact test = 34.493; P <0.001; V of Cramèr = 0.70), indicating a change in the pattern of IMP-16-producing isolates. Furthermore, statistically significance was observed in the *exoU* (Fisher's exact test = 70,000, P <0.01) and

*exoS* detection (Fisher's exact test = 40.803;  $P < 0.01$ ) with the KPC-2-producing isolates (Table 4 and 5).

#### 4. DISCUSSION

The increasing prevalence of MDR and XDR *P. aeruginosa* in the healthcare settings is alarming, as it has limited the therapeutic options for infections caused by this bacterium. In this study, a high prevalence of both MDR and XDR *P. aeruginosa* exhibiting various resistance encoding genes was detected in our hospital.

Until few years ago, carbapenems had excellent clinical utility for the treatment of infections by MDR *P. aeruginosa* because of their potent activity against this organism. However, this pathogen developed resistance mechanisms after relentless exposure to carbapenems and other classes of antimicrobial agents (Labarca et al., 2016). In a global surveillance program involving a total of 8010 *P. aeruginosa* isolates from different clinical specimen recovered from Asia-Pacific, Europe, Latin America, the Middle East-Africa and North America the meropenem resistance was found to be 26.7% (Karmierczak et al., 2016).

In another surveillance study, Rosenthal et al., (2016) reported rates of carbapenem-resistance ranging from 26.1 to 44.4% in *P. aeruginosa* isolated from device-associated healthcare infections in Latin America, Europe, Eastern Mediterranean, Southeast Asia and Western Pacific.

Data from Latin America is noteworthy once that resistance to carbapenems is higher compared to the United States and Europe with Brazil showing the highest resistance rates among other countries from Latin America (Labarca et al., 2016). In contrast, Dantas and colleagues (2017) found lower rates of MDR and XDR *P. aeruginosa* isolates compared to the present study. Similar carbapenem resistance rate in *P. aeruginosa* isolates in a study from EUA and another from Brazil (Polotto et al., 2012; Lob et al., 2017), nevertheless, Ribeiro and colleagues (2016) observed all isolates resistant to carbapenems. As in our work, no resistance to polymyxins was observed in several other studies (Polotto et al., 2012; Ribeiro et al., 2016; Estepa et al., 2016; Maroui et al., 2016; Dantas et al., 2017; Mirsalehian et al., 2017). These different rates observed could be due to differences in antibiotic usage between Brazil and the countries where these studies were done.

In this study the TSDT and BCT correlated with carbapenemase gene detection. Our data showed that carbapenem resistance in this study was mainly mediated by MBL. Our results showed higher rates of detection of carbapenemase-encoding genes than European studies (Japoni et al., 2014; Castanheira et al., 2014; Fan et al., 2016; Maroui et al., 2016;

Feng et al., 2017). As in other studies, the great majority of the carbapenemase-producing isolates presented MBL-encoding genes and similar proportions of MBL-positive strains were reported (Franco et al., 2010; Maroui et al., 2016), indicating that these strains are a persistent problem. In Brazil, similar results were obtained in other studies, with predominance of SPM-1-producing isolates and presence of IMP, KPC and VIM-type genes (Polotto et al., 2012; Rizek et al., 2014; Cacci et al., 2016; Dantas et al., 2017). A Brazilian study showed lower rates of carbapenemase-producing isolates (19.15%) and genetic analysis revealed that, consistently with findings of other studies performed in Brazil, the MBL SPM-1 was the most prevalent acquired beta-lactamase among *P. aeruginosa* isolates recovered from patients of HU (Kos et al., 2015; Escandón-Vargas et al., 2016; Dantas et al., 2017).

Both IMP and VIM variants were confirmed to be associated with class I integron, which can be mobilized by transposition or plasmid conjugation (Kazmierczak *et al.*, 2016). The two IMP-16 producers carried only the gene cassette *bla*<sub>IMP-16</sub> on the class I integron as described in a previous report by Picão and colleagues (2012) that analysed isolates recovered from this same hospital ten years ago. The genetic context of *bla*<sub>VIM-1</sub> was similar to that of *bla*<sub>VIM-7</sub> described previously (Balero de Paula et al., 2017). However, they were different those described by Li et al. (2008). The MBL-encoding gene was the first gene cassette of class 1 integron, followed by an aminoglycoside-modifying enzyme (*aacA4*). In addition, the *bla*<sub>OXA-46</sub>, followed by *qacEΔ1/sul1* genes were located at the 3'-CS.

Carbapenem-resistant isolates without carbapenemase genes detected in this study alludes to the occurrence of additional non-carbapenemase resistance mechanisms. Three factors are responsible for the acquired resistance to carbapenems: upregulated efflux pumps, loss of the outer-membrane protein encoding gene *oprD* (porin loss) and the production of enzymes hydrolyzing of carbapenems (carbapenemases) (Kateete et al., 2016). Non-carbapenemase mediated mechanisms need further investigations as we did not extensively characterize them in this study. Decreased permeability and increased efflux are the most prevalent carbapenem resistance mechanism. However, carbapenemase production is increasing worldwide as a major mechanism of carbapenem resistance among *P. aeruginosa* isolates and partly is due to the location of most of these encoding genes in mobile elements (Meletis et al., 2015).

In addition to resistance mechanisms, *P. aeruginosa* express a notable number of virulence factors contributing for the establishment of infections. Most of these determinants are related to molecules associated with bacteria surface and secreted factors. These factors may facilitate the disruption of epithelial integrity and interfere with the immune system

functions, causing host tissue damage and cell death (Hamood et al., 1996; Jaffar-Bandjee et al., 1995; Khalil et al., 2015; Park et al., 2016).

All isolates harbored the *lasI* gene that encodes an autoinducer synthase, a component of the Las signaling system, which triggers the expression of the extracellular toxins: elastase (LasB), protease (LasA and AprA) and exotoxin A (ExoA) (Gambello et al., 1993; Sharma et al., 2014; Rasamiravaka et al., 2016). This could explain the high rates of isolates producers of proteases.

The enzymatic activities of proteases and elastases are important virulence factors during *P. aeruginosa*-host interplay, and contribute to the establishment of the infectious process (Gelattly; Hancock, 2013; Jayaseelan et al., 2014). Elastases (encoded by *lasB* gene) are able to destroy eukaryotic proteins such as collagen, elastin and other structural proteins of the cells (Galdino et al., 2016; Newman et al., 2017; Benie et al., 2017). The exotoxin A is another secreted virulence factor and is the major member of the type II secretion system which targets elongation factor inhibiting the protein synthesis. The *plcH* gene was detected in most of *P. aeruginosa* that also presented a hemolytic activity on sheep blood. In fact, the *plcH* gene encodes a hemolytic phospholipase that also hydrolyses the lipids of the cellular membranes and lung (Fadhil et al., 2016; Khattab et al., 2015; Wargo et al., 2011). The expression of *plcH* can be activated in the presence of choline and betaine, which protect *P. aeruginosa* against the effects of hyperosmolar environments (Sage; Vasil, 1997).

*P. aeruginosa* also possesses a virulence mechanism known as the type III secretion system (TTSS) that allows the injection of four effector cytotoxins (exotoxins U, S, Y and T) into the cytosol of target eukaryotes (Sawa et al., 2014). In contrast to the *exoT* and *exoY* gene, which is found in almost all strains, the *exoS* is present only in about 58-72% of *P. aeruginosa* strains and the *exoU* is less frequent (28-42%) (Hauser, 2009; Kung et al., 2010; Takata et al., 2017; Juan et al., 2017). Here, all *P. aeruginosa* isolates harbored *exoY* gene and the majority also harbored the *exoS* gene, and these data are in agreement with other studies (Pobiega et al., 2015; Ferreira et al., 2015; Zhang et al., 2014). The *exoU* encodes a potent phospholipase, which was found only in the KPC-2 and VIM-1-producing isolates. Previous studies described that the ExoU and ExoS are mutually exclusive in the majority of *P. aeruginosa* clinical isolates (Reboud et al., 2017). The production of different enzymes determines a distinct host tissue injury, and ExoU presents a greater impact in bacterial virulence (Engel; Balachandran, 2009; Peña et al., 2015).

Similar to other studies all *P. aeruginosa* isolates were able to form biofilm on polystyrene surface in this study (Di Domenico et al., 2017; Meradji et al., 2016; Silva et al.,

2014). Biofilm is considered an important virulence factor in *P. aeruginosa*. The mature biofilm matrix acts as a barrier against the antimicrobials penetration, difficulting the treatment of infections. In addition, the biofilm formation allows bacteria to elude the host immune response and confer protection against the damage effects of reactive oxygen species and ultraviolet radiation (Di Domenico et al., 2017; Flemming; Wingender, 2010; Wolska; Kot, 2013). Because of the extreme resistance to biofilm cells, most persistent chronic infections are believed to be associated with biofilms (Kim; Lee, 2016).

In this study ERIC-PCR was used to examine genetic relatedness of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates and a great genetic variability among this population was found, indicating that there is no clonal relationship. The SPM-1-producing isolates belonged to fourteen clonal groups and were recovered from patients hospitalized in the intensive care units, clinical and surgical wards and emergency room, suggesting that these areas have an important role in the nosocomial spread of the strains. According to previous studies, clonal dissemination of *P. aeruginosa* is considered low and the carbapenemase-producing isolates exhibit a high genetic diversity and varied resistant patterns (Fan et al., 2016). The IMP-16 and KPC-2-producing isolates showed the same ERIC-PCR pattern displayed by previously *P. aeruginosa* IMP-16 and KPC-2-producing isolates detected in our institution (data not shown). These results highlight the attention on the possible rapid spread of these determinants of resistance in *P. aeruginosa* isolates and for the fact that these strains may become a reservoir of these transmissible resistance mechanisms in HU.

However, other studies have been reported that *P. aeruginosa* carbapenemase-producing isolates can spread clonally, and some have been associated with successful high-risk ST, such as ST 111, 175 and 235. These high-risk clones have played a major role in the spread of resistance worldwide and are associated with high mortality of patients infected by these isolates (Oliver et al., 2015). Based on MLST scheme, the five representative isolates were classified in five different STs, including the ST235 and ST277, considered high risk clones with globally and Brazil associated dissemination, respectively (Oliver et al., 2015). The major limitation of this study is the small number of samples submitted to MLST analysis. Despite this, our findings have important implication, once high-risk STs and a diversity of clone were detected.

The present study demonstrates that the SPM-1-producing isolate belongs to the ST277 which is extremely prevalent in Brazil, and is associated with the dissemination of SPM-1 *P. aeruginosa* producing clone SP in our country (Silva et al., 2011; Cavalcanti et al.,

2015). A study showed the *bla*<sub>SPM-1</sub> is integrated into genomic islands inserted in the chromosome of *P. aeruginosa* and this fact could explain why the *bla*<sub>SPM-1</sub> is virtually restricted to a specific clone (ST277) and not easily disseminated as other MBL genes (Silveira et al., 2016).

The KPC-2-producing isolate belonged to ST235, the major *P. aeruginosa* multidrug-resistant involved in class A (BEL, CTX-M, PER and GES enzymes), class B (FIM, IMP, VIM and SPM variants) and class D beta-lactamases dissemination in Europe and Asia (Oliver et al., 2015; Treepong et al., 2017). The ST235 has also been involved in KPC-2 dissemination in Colômbia (Correa et al., 2015) and was detected in a KPC-2-producing *P. aeruginosa* isolate recovered from our hospital in 2008 (Paula-Petroli et al., 2017). This international high-risk clone is associated with poor clinical outcome and isolates belonging to this clone often have an increase biofilm formation (Mulet et al., 2013). Genomic analysis of *P. aeruginosa* ST235 isolates showed that the ability of acquire antimicrobial resistance genes and the presence of the *exoU* gene are responsible for the success of dissemination of this high-risk clone worldwide (Treepong et al., 2017). Indeed, in our study the isolate belonging to ST235 presents the *exoS*<sup>-</sup>/*exoU*<sup>+</sup> genotype and is a strong biofilm producer. In addition, this isolate express the pore-forming enzymes and hemolysin.

A single-*locus* variant of the ST235 (ST230) was detected in the VIM-1-producing isolate. The ST230 was classified as clonal complex BG11 and detected in VIM-4-producing strains isolated from Greece and Sweden (Giske et al., 2006). The VIM-1-producing isolate of our study, belonged to ST230 harbored the genes *exoY*, *exoS*, and *exoU*, is associated with acute infection and correlated with a worse outcome in clinical infections. In addition, this XDR isolate was a strong biofilm producer, express most of virulence factors tested, and only the *nanI* gene was not detected in its genome. Therefore, attention to this isolate could be given, once that it is correlated with high-risk clones.

The carbapenem-susceptible IMP-16 isolate belonged to ST273. Few isolates belonging to this ST were described in the literature. The MLST database shows isolates from Poland and Australia. In addition, Slekovec et al. (2012) detected MDR *P. aeruginosa* strains recovered from a hospital wastewater in France belonging to this ST.

The ST1284 was found in study, in a Portuguese VIM-2-producing isolate and in non-carbapenemase-producing isolates in China (Botelho et al., 2015; Feng et al., 2017). The high genetic variability observed in these isolates show a high antibiotic pressure that is conducive to the presence of new clones such as ST230, ST1284 and ST273 reported for the first time in Brazil.

## 5. CONCLUSION

The present study demonstrates a diversity of carbapenems resistance determinants and the presence of high-risk clones in HU. In addition, the clonal dynamics and virulence traits of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* from this institution was revealed. It was observed that carbapenemase producing isolates were extremely resistant to most clinically available antimicrobial agents and the resistance to carbapenems was mediated by Ambler's class A (KPC-2) and class B (SPM-1, IMP-16, VIM-1, VIM-7). Our results also showed that the carbapenemase-producing isolates exhibit a variable ability to produce different virulence determinants. Multi-drug resistance in addition to the presence of virulence factors, moderate clonal relation and the presence of high-risk clones are aspects of great concern that require control to avoid the dissemination of these carbapenem resistant isolates. In addition, these results highlight the attention on the possible rapid spread of these determinants of resistance in *P. aeruginosa* isolates and for the fact that these strains may become a reservoir of these transmissible resistance mechanisms.

## REFERENCES

- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):40-3.
- Balasubramanian D, Schnepfer L, Kumari H, Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1): 1–20.
- Balero de Paula S, Cayô R, Streling AP, Silva Nodari C, Pereira Matos A, Eches Perugini MR, Gales AC, Carrara-Marroni FE, Yamada-Ogatta SF. Detection of blaVIM-7 in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;89(1):80-82.
- Benie CK, Dadié A, Guessenn N, N'gbesso-Kouadio NA, Kouame ND, N'golo DC, Aka S, Dako E, Dje KM, Dosso M. Characterization of Virulence Potential of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Bovine Meat, Fresh Fish, and Smoked Fish. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2017;7(1):55-64.
- Botelho J, Grosso F, Rocha C, et al. High-risk clones among carbapenemase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a Portuguese hospital. In: 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - ECCMID, ePoster EV0125. Copenhagen, Denmark, 2015.

Cacci LC, Chuster SG, Martins N, Carmo PR, Girão VB, Nouér SA, Freitas WV, Matos JA, Magalhães AC, Ferreira AL, Picão RC, Moreira BM. Mechanisms of carbapenem resistance in endemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates after an SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase producing strain subsided in an intensive care unit of a teaching hospital in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016;111:551-558.

Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother. 2014;69(7):1804-14.

Cavalcanti FL, Mirones CR, Paucar ER, Montes LA, Leal-Balbino TC, Morais MM, Martínez-Martínez L, Ocampo-Sosa AA. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(8):1003-9

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - 9th Edition: Approved Standard M07-A9. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th Edition: M100. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.

Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, Maya JJ, Rojas L, Cantón R, Arias CA, Villegas MV. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(4):2421-5.

Dantas RCC, Silva RTE, Ferreira ML, Gonçalves IR, Araújo BF, Campos PA, Royer S, Batista DWDF, Gontijo-Filho PP, Ribas RM1. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. PLoS One. 2017;12(5):e0176774.

Di Domenico EG, Farulla I, Prignano G, Gallo MT, Vespaziani M, Cavallo I, Sperduti I, Pontone M, Bordignon V, Cilli L, De Santis A, Di Salvo F, Pimpinelli F, Lesnoni La Parola I, Toma L, Ensoli F. Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype. Int J Mol Sci. 2017;18(5). pii: E1077.

Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. J Clin Microbiol. 2012; 50(12): 3877-80.

- Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12(1):61-6.
- Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(3):277-297.
- Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'souza JW, Tapalski DV, Azizov IS, Sukhorukova MV, Pavlukov RA, Kozlov RS, Toleman MA, Walsh TR. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(10):867-76.
- Estepa V, Rojo-Bezares B, Azcona-Gutiérrez JM, Olarte I, Torres C, Sáenz Y. Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(3):141-147.
- Fadhil L, Al-Marzoqi AH, Zahraa MA, Shalan AA. Molecular and phenotypic study of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical origins by PCR: profiles of genes and toxins. *Res J Pharm, Biol Chem Sci*. 2016;7:590–598.
- Fan X, Wu Y, Xiao M, Xu ZP, Kudinha T, Bazaj A, Kong F, Xu YC. Diverse Genetic Background of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Mainland China, and Emergence of an Extensively Drug-Resistant ST292 Clone in Kunming. *Sci Rep*. 2016;6:26522.
- Feng W, Sun F, Wang Q, Xiong W, Qiu X, Dai X, Xia P. Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;8:142-147.
- Ferreira ML, Dantas RC, Faria AL, Gonçalves IR, Silveira de Brito C, Queiroz LL, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Molecular epidemiological survey of the quinolone- and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2015;64(Pt 3):262-71.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623-33.
- Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(9):825-9.

- Galdino AC, Viganor L, Ziccardi M, Nunes AP, Dos Santos KR, Branquinha MH, Santos AL. Heterogeneous production of proteases from Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016. pii: S0213-005X(16)30182-3.
- Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun*. 1993;61(4):1180-4.
- Georgescu M, Gheorghe I, Curutiu C, Lazar V, Bleotu C, Chifiriuc MC. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. *BMC Infect Dis*. 2016;16 Suppl 1:92.
- Giske CG, Libisch B, Colimon C, Scoulica E, Pagani L, Füzi M, Kronvall G, Rossolini GM. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12):4309-15.
- Gniadek TJ, Carroll KC, Simner PJ. Carbapenem-Resistant Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Bacilli: the Missing Piece to the Puzzle. *J Clin Microbiol*. 2016;54(7):1700-10.
- Habermann E, Hardt KL. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal Biochem*. 1972;50(1):163-73.
- Hamood AN, Griswold JA, Duhan CM. Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections. *J Surg Res*. 1996 Mar;61(2):425-32.
- Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:654–65.
- Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(3):305.
- Jaffar-Bandjee MC, Lazdunski A, Bally M, Carrère J, Chazalotte JP, Galabert C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 1995;33(4):924-9.
- Japoni A, Anvarinejad M, Farshad S, Giammanco GM, Rafaatpour N, Alipour E. Antibiotic Susceptibility Patterns and Molecular Epidemiology of Metallo- $\beta$ -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Burn Patients. *Iran Red Crescent Med J*. 2014;16(5):e10916.

- Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(4):1159-68.
- Juan C, Peña C, Oliver A. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl\_1):S44-S51.
- Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunol Lett.* 2017;190:1-6.
- Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, Sahm DF, Bradford PA. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec 7;60(2):1067-78.
- Kateete DP, Nakanjako R, Namugenyi J, Erume J, Joloba ML, Najjuka CF. Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* at Mulago Hospital in Kampala, Uganda (2007-2009). *Springerplus.* 2016 Aug 9;5(1):1308.
- Khattab MA, Nour MS, ElSheshtawy NM: Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes among different isolates. *J Microb Biochem Techno* 2015;7:274–277.
- Khalil MA, Ibrahim Sonbol F, Mohamed AF, Ali SS. Comparative study of virulence factors among ES $\beta$ L-producing and nonproducing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Turk J Med Sci.* 2015;45(1):60-9.
- Kos VN, McLaughlin RE, Gardner HA. Identification of unique in-frame deletions in OprD among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis.* 2016;74(4):ftw031.
- Kraychete GB, Botelho LA, Campana EH, Picão RC, Bonelli RR. Updated multiplex PCR for detection of all six-plasmid-mediated qnr gene families. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(12):7524-7526.
- Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(4):621-41.
- Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(2):276-92.
- Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, Quentin R. 2004. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol* 2004;53:73-81
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(1):185-91.

- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16(2):161-8.
- Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, Young K, Motyl MR, Karlowsky JA, Sahm DF. *In Vitro* Activity of Imipenem-Relebactam against Gram-Negative ESKAPE Pathogens Isolated by Clinical Laboratories in the United States in 2015 (Results from the SMART Global Surveillance Program). *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(6).pii:e02209-16.
- Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, Hoban DJ, Young K, Motyl MR, Karlowsky JA, Sahm DF. In vitro activity of imipenem-relebactam against gram-negative bacilli isolated from patients with lower respiratory tract infections in the United States in 2015 - Results from the SMART global surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;88(2):171-176.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:268- 281.
- Maroui I, Barguigua A, Aboukacem A, Ouarrak K, Sbiti M, Louzi H, Timinouni M, Belhaj A. First report of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Morocco. *J Infect Chemother*. 2016;22(3):127-32.
- Meletis G, Chatzidimitriou D, Malisiovas N. Double- and multi-carbapenemase-producers: the excessively armored bacilli of the current decade. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(8):1487-93.
- Meletis G, Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(1): 15–21.
- Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45:544-547.
- Meradji S, Barguigua A, Bentakouk MC, Nayme K, Zerouali K, Mazouz D, Chettibi H, Timinouni M. Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria. *Burns*. 2016;42(4):906-18.
- Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Taherikalani M, Jabalameli F, Emaneini M. Determination of carbapenem resistance mechanism in clinical isolates of *Pseudomonas*

*aeruginosa* isolated from burn patients, in Tehran, Iran. *J Epidemiol Glob Health*. 2017;7(3):155-159.

Mitov I, Strateva T, Markova B. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Microbiol*. 2010;41(3):588-95.

Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:39.

Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(11):5527-35.

Newman JW, Floyd RV, Fothergill JL. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiol Lett*. 2017;364(15).

O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on antimicrobial resistance to the Government of the United Kingdom. HM Government, London. 2016.

Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015; 21-22: 41-59.

Papagiannitsis CC, Medvecky M, Chudejova K, Skalova A, Rotova V, Spanelova P, Jakubu V, Zemlickova H, Hrabak J, Czech Participants of European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin: evidence for clonal spread of extensively resistant ST357 expressing IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. pii: AAC.01811-17.

Park JW, Kim YJ, Shin IS, Kwon OK, Hong JM, Shin NR, Oh SR, Ha UH, Kim JH, Ahn KS. Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Affects Matrix Metalloproteinase 12 (MMP-12) and MMP-13 Expression via Nuclear Factor  $\kappa$ B Signaling in Human Carcinoma Epithelial Cells and a Pneumonia Mouse Model. *J Infect Dis*. 2016;214(6):962-9.

Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis*. 2015;60(4):539-48.

- Picão RC, Carrara-Marroni FE, Gales AC, Venâncio EJ, Xavier DE, Tognim MC, Pelayo JS. Metallo- $\beta$ -lactamase-production in meropenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk for silent spread. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(6):747-51.
- Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol. 2013;51(12):4281-3.
- Pobiega M, Maciąg J, Chmielarczyk A, Romaniszyn D, Pomorska-Wesolowska M, Ziolkowski G, Heczko PB, Bulanda M, Wojkowska-Mach J. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infections in Southern Poland. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;83(3):295-7.
- Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, Nogueira MC. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub> and *bla*<sub>GES-5</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub> and *bla*<sub>SPM-1</sub> causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. BMC Infect Dis. 2012;12:176.
- Qadri SM, DeSilva MI, Zubairi S. Rapid test for determination of esculin hydrolysis. J Clin Microbiol. 1980;12(3):472-4.
- Reboud E, Basso P, Maillard AP, Huber P, Attrée I. Exolysin Shapes the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clonal Outliers. Toxins (Basel). 2017;9(11). pii: E364.
- Reinhart AA, Oglesby-Sherrouse AG: Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. Genes (Basel).2016;7(12):126.
- Ribeiro PC, Monteiro AS, Marques SG, Monteiro SG, Monteiro-Neto V, Coqueiro MM, Marques AC, de Jesus Gomes Turri R, Santos SG, Bomfim MR. Phenotypic and molecular detection of the *bla*<sub>KPC</sub> gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. BMC Infect Dis. 2016;16(1):737.
- Rizek C, Fu L, Dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014;13:43.
- Rasamiravaka T, El Jaziri M. Quorum-Sensing Mechanisms and Bacterial Response to Antibiotics in *P. aeruginosa*. Curr Microbiol. 2016;73(5):747-53.
- Rosenthal VD, Al-Abdely HM, El-Kholy AA, AlKhawaja SA, Leblebicioglu H, Mehta Y, Rai V, Hung NV, Kanj SS, Salama MF, Salgado-Yeppez E, Elahi N, Morfin Otero R, Apisarnthanarak A, De Carvalho BM, Ider BE, Fisher D, Buenaflor MC, Petrov MM, Quesada-Mora AM, Zand F, Gurskis V, Anguseva T, Ikram A, Aguilar de Moros D,

Duszynska W, Mejia N, Horhat FG, Belskiy V, Mioljevic V, Di Silvestre G, Furova K, Ramos-Ortiz GY, Gamar Elanbya MO, Satari HI, Gupta U, Dendane T, Raka L, Guanche-Garcell H, Hu B, Padgett D, Jayatilleke K, Ben Jaballah N, Apostolopoulou E, Prudencio Leon WE, Sepulveda-Chavez A, Telechea HM, Trotter A, Alvarez-Moreno C, Kushner-Davalos L. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. *Am J Infect Control*. 2016;44(12):1495-1504.

Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S et al. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2014; 5: 125-134.

Sader HS, Huband MD, Castanheira M, Flamm RK. *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Susceptibility Results from Four Years (2012 to 2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring Program in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(3). pii: e02252-16.

Sage AE, Vasil ML. Osmoprotectant-dependent expression of *plcH*, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 1997;179(15):4874-81.

Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, Cabot G, Mulet X, Peña C, Del Campo R, Cantón R, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Arcos SC, Navas A, Oliver A. Interplay among resistance profiles, high-risk clones and virulence in the *Caenorhabditis elegans* *Pseudomonas aeruginosa* infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. pii: AAC.01586-17.

Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Critical Care*. 2014;18(6):668

Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance Genes (Basel). 2017;8(1):39.

Sharma P, Faridi F, Mir IA, Sharma SK. Characterization of *exo-s*, *exo-u*, and *alg* virulence factors and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from migratory Egyptian vultures from India. *Infect Ecol Epidemiol*. 2014;4.

Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(10):847-51.

- Silva FM, Carmo MS, Silbert S, Gales AC. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. *Microb Drug Resist*. 2011;17:215–220.
- Silva LV, Galdino AC, Nunes AP, dos Santos KR, Moreira BM, Cacci LC, Sodr  CL, Ziccardi M, Branquinha MH, Santos AL. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(8):990-1000.
- Silveira MC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. *Infect Genet Evol*. 2016, 42:60-5.
- Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouverez M, Talon D, Bertrand X, Hocquet D. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One*. 2012;7(12):e49300.
- Sokol PA, Ohman DE, Iglewski BH. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 1979;9(4):538-40.
- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-Based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(5): 2074–2079.
- Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol* 2011; 61: 717-732.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000; 40(2):175-9.
- Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp Optom*. 2017. doi: 10.1111/cxo.12621.
- Takata I, Yamagishi Y, Mikamo H. Association of the *exoU* genotype with a multidrug non-susceptible phenotype and mRNA expressions of resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother*. 2017. pii: S1341-321X(17)30201-5.
- Tayabali AF, Nguyen KC, Shwed PS, Crosthwait J, Coleman G, Seligy VL. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. *PLoS One*. 2012;7(5):e37024.
- Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect*. 2017, S1198-743X(17)30342-7.

- Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(6):1261-2.
- Wang Y, Shen M, Yang J, Dai M, Chang Y, Zhang C, Luan G, Ling B, Jia X. Prevalence of carbapenemases among high-level aminoglycoside-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in China. *Exp Ther Med.* 2016; 12(6):3642-3652.
- Wargo MJ, Gross MJ, Rajamani S, Allard JL, Lundblad LK, Allen GB, Vasil ML, Leclair LW, Hogan DA. Hemolytic phospholipase C inhibition protects lung function during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(3):345-54.
- Wolloscheck D, Krishnamoorthy G, Nguyen J, Zgurskaya HI. Kinetic control of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by multidrug efflux pumps. *ACS Infect Dis.* 2017. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00160.
- Wolska K, Kot B. Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013;60(3):313-28.
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006; 27: 351-3.
- Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(1):154-5.
- Zhang J, Chu Y, Wang P, Ji X, Li X, Wang C, Peng Y. Clinical outcomes of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection and the relationship with type III secretion system in patients with diabetic foot. *Int J Low Extrem Wounds.* 2014;13(3):205-10.

**Table 1:** Demographic and clinical characteristics of patients infected by ceftazidime/carbapenem non-susceptible *P. aeruginosa*

Characteristic	Number of isolates			p value
	Total (%)	Non-CP (%) <sup>a</sup>	CP (%) <sup>b</sup>	
<b>Gender</b>				
Female	59 (29.9)	40 (31.5)	19 (27.1)	0.52
Male	138 (70.0)	87 (68.5)	51 (72.9)	
<b>Age</b>				
≤20	26 (13.2)	20 (15.7)	6 (8.6)	0.26
21-40	38 (19.3)	27 (21.3)	11 (15.7)	
41-60	47 (23.9)	31 (24.4)	16 (22.9)	
61-80	69 (35.0)	38 (29.9)	31 (44.3)	
>80	17 (8.6)	11 (8.7)	6 (8.6)	
<b>Hospital Units</b>				
Intensive Treatment Unit	91 (43.3)	66 (47.1)	25 (35.7)	0.19
Emergency Room	48 (22.9)	25 (17.9)	23 (32.9)	
Nursery	58 (27.6)	38 (27.1)	20 (28.6)	
Ambulatory	8 (3.8)	6 (4.3)	2 (2.9)	
Pediatrics	5 (2.4)	5 (3.6)	0 (0.0)	
<b>Clinical Specimens</b>				
Tissue	18 (8.6)	13 (9.3)	5 (7.1)	0.08
Catheter tip (>15 colonies)	2 (0.9)	1 (0.7)	1 (1.4)	
Tracheal secretion (>10 <sup>6</sup> UFC/mL)	50 (23.8)	38 (27.1)	12 (17.1)	
Swab surveillance	84 (40.0)	45 (32.1)	39 (55.7)	
Urine	42 (20.0)	29 (20.7)	13 (18.6)	
Non-respiratory fluids and secretions	9 (4.3)	9 (6.4)	0 (0.0)	
Blood	5 (2.4)	5 (3.6)	0 (0.0)	

<sup>a</sup>Non-CP: Noncarbapenemase-producing isolates; <sup>b</sup>CP: Carbapenemase-producing isolates

**Table 2:** Antibiotic resistance patterns of the studied isolates.

<b>Drug name</b>	<b>Total (%)</b>	<b>Non-CP (%)</b>	<b>CP (%)</b>	<b><i>p</i> value</b>
<b>Aminoglycosides</b>				
Gentamicin	152 (72.4)	84 (60.0)	68 (97.1)	0.95
Amikacin	153 (72.9)	85 (60.7)	68 (97.1)	
<b>Antipseudomonal carbapenems</b>				
Imipenem	170 (80.9)	102 (72.9)	68 (97.1)	0.78
Meropenem	164 (78.1)	96 (68.6)	68 (97.1)	
<b>Antipseudomonal cephalosporins</b>				
Ceftazime	134 (63.8)	65 (46.4)	69 (98.6)	0.42
Cefepime	124 (59.0)	54 (38.6)	70 (100.0)	
<b>Monobactam</b>				
Aztreonam	69 (32.9)	64 (46.4)	5 (7.1)	
<b>Antipseudomonal fluoroquinolones</b>				
Ciprofloxacin	163 (77.6)	96 (68.6)	67 (95.7)	0.92
Levofloxacin	165 (78.6)	98 (70.0)	67 (95.7)	
<b>Antipseudomonal penicillins + beta-lactamase inhibitor</b>				
Piperacillin/tazobactam	85 (40.5)	49 (35.0)	36 (51.4)	
<b>Polymyxins</b>				
Colistin	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Polymyxin B	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

<sup>a</sup>Non-CP: Noncarbapenemase-producing isolates (n=140); <sup>b</sup>CP: Carbapenemase-producing isolates (n=70)

**Table 3:** Clinical characteristics, clonal relationship, virulence and resistance features of five carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates.

Sample	Ward	Undelying disease	Outcome	Sequence type	Virulence Profile	Carbapenemase Resistance Genes	Integron Class I	Resistance Profile	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)
Pa 2614	Femine Ward	Peripheral Arterial Insufficiency	Discharge from hospital	ST277	<i>lasI, lasB, toxA, plcH, exoY</i> and <i>exoS</i> PR, HE, +	SPM-1	-	AK, CN, CTX, FEP, CAZ, IMI, MEM, CIP, LEV	CAZ: ≥128 IMI: 128 MEM: 128 COL: 1 POLB: 0.5
Pa 2491	Male Ward	Urinary Tract Infection	Discharge from hospital	ST230	<i>lasI, lasB, toxA, plcH, exoY, exoS</i> and <i>exoU</i> PR, HE, +++	VIM-1	VIM-1, <i>aca4</i> , OXA-46	AK, CN, AZT, CTX, FEP, CAZ, IMI, MEM, PTZ, CIP, LEV	CAZ: ≥128 IMI: ≥128 MEM: ≥128 COL: 1 POLB: 0.5
Pa 2815	ICU2	Fracture of the humerus	Death	ST1284	<i>lasI, lasB, toxA, plcH, exoY</i> and <i>exoS</i> HE, +++	VIM-7	VIM-7, <i>aca4</i> , OXA-46	AK, CN, AZT, CTX, FEP, CAZ, IMI, MEM, PTZ, CIP, LEV	CAZ: ≥128 IMI: 128 MEM: 128 COL: 1 POLB: 0.5
Pa 2622	Male Ward	Multiple trauma	Death	ST235	<i>lasI, lasB, toxA, plcH, exoY</i> and <i>exoU</i> PR, HE, +++	KPC-2	-	AK, CN, AZT, CTX, FEP, CAZ, IMI, MEM, PTZ, CIP, LEV	CAZ: ≥128 IMI: 128 MEM: 128 COL: 1 POLB: 0.5
Pa 2665	Male Ward	Fracture of the femur	Death	ST273	<i>lasI, lasB, toxA, plcH, exoY</i> and <i>exoS</i> PR, +++	IMP-16	IMP-16	AK, CN, LEV, CTX, CIPRO	CAZ: 32 IMI: 2 MEM: 0.5 COL: 1 POLB: 0.5

PH: phospholipase; PR: protease; HE: hemolysin; +: weak biofilm producer; +++: strong biofilm producer

**Table 4:** Production of virulence factors by carbapenemases-producing *P. aeruginosa* isolates

Carbapenemase genes	Production of Virulence Factors (%)				
	Hemolysin	Protease	Biofilm Production		
			Weak	Moderate	Strong
<b>SPM-1 (n=63)</b>	63 (100.00)	59 (93.66)	21 (33.33)	17 (26.98)	25 (39.69)
<b>KPC-2 (n=3)</b>	3 (100.00)	3 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (100.00)
<b>IMP-16 (n=2)</b>	1 (50.00)*	2 (100.00)	0 (0.00)	1 (50.00)	1 (50.00)
<b>VIM-1 (n=1)</b>	1 (100.00)	1 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (100.00)
<b>VIM-7 (n=1)</b>	1 (100.00)	1 (100.00)	1 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
<b>Total</b>	69 (98.58)	66 (94.29)	22 (31.42)	18 (25.71)	30 (42.87)

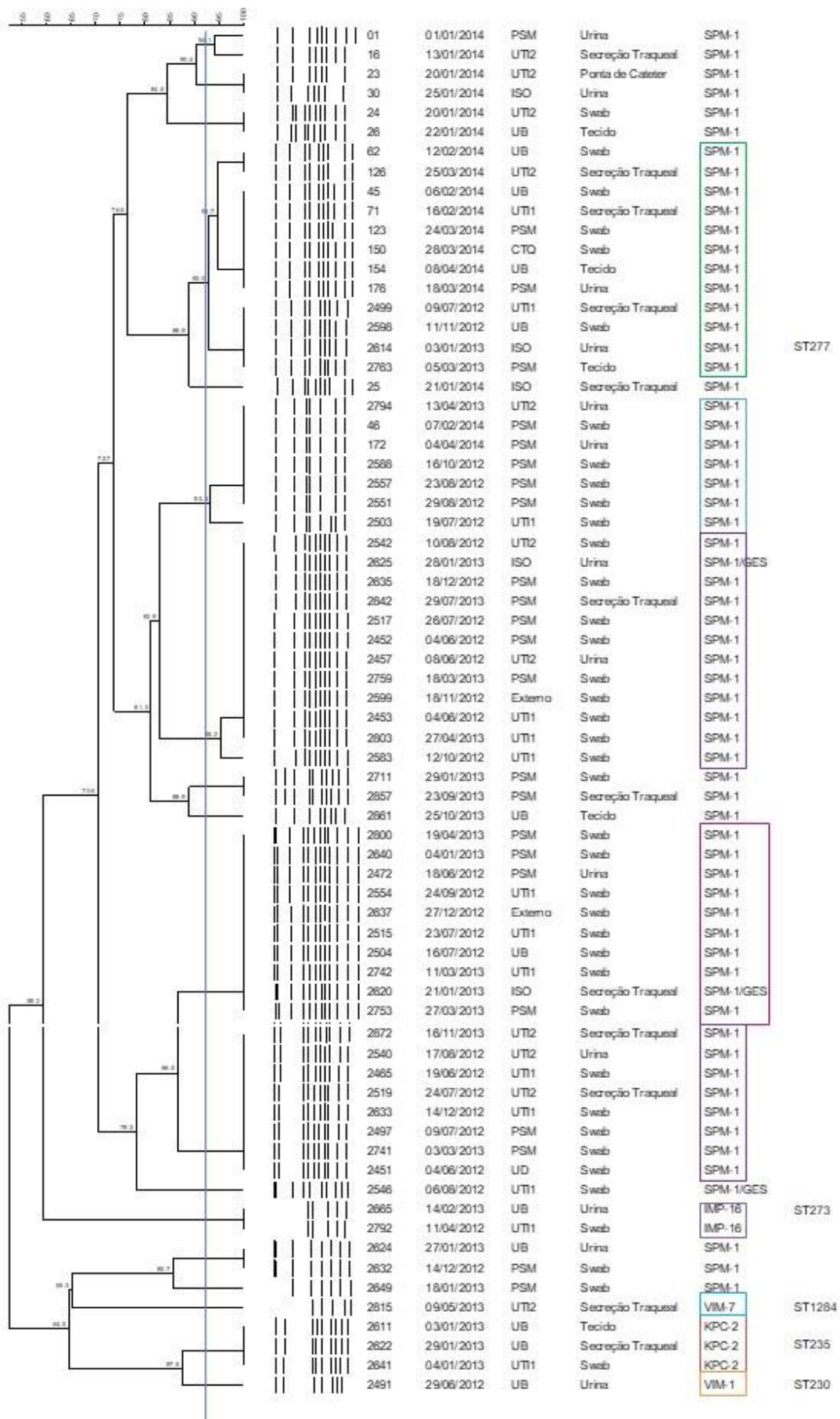
\* *p*-value <0.01

**Table 5:** Prevalence of virulence genes in the carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates

Carbapenemase genes	Virulence determinants (%)							
	<i>lasI</i>	<i>lasB</i>	<i>toxA</i>	<i>plcH</i>	<i>nanI</i>	<i>exoY</i>	<i>ExoS</i>	<i>exoU</i>
<b>SPM-1 (n=63)</b>	63 (90.00)	60 (85.71)	60 (85.71)	61 (87.14)	1 (1.43)	63 (90.00)	62 (88.57)	0 (0.00)
<b>KPC-2 (n=3)</b>	3 (4.28)	3 (4.28)	3 (4.28)	3 (4.28)	0 (0.00)	3 (4.28)	0 (0.00) <sup>&amp;</sup>	3 (4.28) <sup>#</sup>
<b>IMP-16 (n=2)</b>	2 (2.86)	2 (2.86)	2 (2.86)	2 (2.86)	0 (0.00)	2 (2.86)	2 (2.86)	0 (0.00)
<b>VIM-1 (n=1)</b>	1 (1.43)	1 (1.43)	1 (1.43)	1 (1.43)	0 (0.00)	1 (1.43)	1 (1.43)	1 (1.43) <sup>#</sup>
<b>VIM-7 (n=1)</b>	1 (1.43)	1 (1.43)	1 (1.43)	1 (1.43)	0 (0.00)	1 (1.43)	1 (1.43)	0 (0.00)
<b>Total</b>	70 (100.00)	67 (95.71)	67 (95.71)	68 (97.14)	1 (1.43)	70 (100.00)	64 (94.28)	4 (5.71)

<sup>&</sup> *p*-value <0.01<sup>#</sup> *p*-value <0.01

**Figure 1** – Dendrogram of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates



**Artigo 2 - Publicado no periódico Diagnostic Microbiology & Infectious  
Disease**

Balero de Paula S, Cayô R, Streling AP, Silva Nodari C, Pereira Matos A, Eches Perugini MR, Gales AC, Carrara-Marroni FE, Yamada-Ogatta SF. Detection of *bla*<sub>VIM-7</sub> in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Sep;89(1):80-82. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.008. Epub 2017 Jun 17.







**Artigo 3 - Submetido ao Journal of Global Antimicrobial Resistance - JGAR-D-17-00646**

**Title: Early detection of a hypervirulent KPC-2-producing *P. aeruginosa* ST235 in Brazil**

**Running Title: KPC-2-producing *P. aeruginosa* ST235**

Suelen Balero de Paula-Petroli<sup>1</sup>, Eloiza Helena Campana<sup>2</sup>, Mayara Bocchi<sup>3</sup>, Thiago Bordinhão<sup>3</sup>, Renata Cristina Picão<sup>2</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1</sup>, Floristher Elaine Carrara-Marroni<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - PR, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Investigação de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia Clínica, Hospital Universitário de Londrina, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - PR, Brazil.

\* Corresponding author.

**Current Address:** Laboratório de Microbiologia Clínica, Hospital Universitário de Londrina – UEL, Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, 86038-360, Londrina – PR, Brazil. Phone.:+55 43 33712346. E-mail: floristher@gmail.com

**ABSTRACT**

We described the occurrence of a KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging to the internationally-disseminated ST235 that was recovered from a patient admitted at a tertiary teaching hospital located in Southern Brazil. Multiple virulence traits were detected in this isolate. In Brazil, only the beta-lactamases CTX-M-2 and OXA-129 were described associated with this high-risk clone and KPC-2- producing ST235 isolates has only been described in Colombia. The presence of a XDR *P. aeruginosa* producing KPC ST235 in Brazil is worrisome and careful monitoring of this international high-risk clone could be useful to avoid the spread of this life-threatening microorganism.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, ST235

### **Funding**

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação of the Universidade Estadual de Londrina. SBP-P received a student scholarship from CAPES. RCP receives a productivity research fellowship from CNPq (process number 311946/2016-0), and a young investigator grant from FAPERJ (E-26-201.555/2014). SFY-O receives a research fellowship from CNPq (process number 309914/2016-7).

### **Text**

Sequence Type 235 (ST235) is a globally-disseminated *Pseudomonas aeruginosa* clone that is often associated with hospital-acquired infections with poor clinical outcomes. This high-risk clone's success is attributed to expression of a wide arsenal of resistance and virulence genes (Oliver et al. 2015). Nearly one hundred different acquired resistance elements have been reported in ST235, including  $\beta$ -lactamases; enzymes modifying aminoglycosides, chloramphenicol and rifampin; 16S rRNA methyltransferases associated with aminoglycosides resistance; and genes encoding fluoroquinolones resistance (Oliver et al. 2015; Treepong et al. 2017). Multiple carbapenemases have been described in ST235, more frequently VIM, followed by IMP, OXA, GES, KPC and NDM (Oliver et al. 2015; Treepong et al. 2017). Curiously, KPC-producing ST235 has only been reported in Colombia. It was first described in 2007 and since then, it became endemic in that country. So far, *only* CTX-M-2 and OXA-129 were reported in ST235 recovered in Brazil (Treepong et al. 2017). Here we describe KPC-2 producing *P. aeruginosa* ST235 causing infection in a Brazilian hospital during 2008.

In November 2008, a 97-years-old woman was admitted at a tertiary teaching hospital located in Southern Brazil. She presented with burn wounds compromising 3.5% of her corporal surface, and was transferred to the burn intensive care unit with respiratory failure and hypertension. After 8 days of hospitalization, she was diagnosed with bloodstream infection due to *Klebsiella pneumoniae*, for which imipenem was prescribed (1g, iv, q6h, for

14 days). On the 13th day of imipenem therapy, she presented with urinary tract infection and a carbapenem-resistant *P. aeruginosa* Pa1461 was isolated from her urine ( $10^7$  UFC/mL). Despite of multiple medical interventions during the following days, including replacement of imipenem for polymyxin B (500.000 U, iv, q8h, for 14 days), she presented refractory septic shock and died on January 2009.

Isolate Pa1461 was identified using the automated system Vitek<sup>®</sup>2 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) and confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS), using MALDI Biotyper 3.1 software (Bruker Daltonics, Germany). Multilocus sequence typing was performed, as previously described, and identified ST235 (Cacci et al. 2016). Susceptibility testing showed Pa1461's extremely drug resistant (XDR) profile. It was resistant to broad spectrum cephalosporins,  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations, aztreonam, carbapenems, fluoroquinolones and aminoglycosides, but remained susceptible to polymyxins (Table1). Moreover, carbapenemase activity was detected by Modified Hodge Test. Presence of genes encoding plasmid-mediated quinolone resistance determinants, 16S rRNA methyltransferases and class A, B and D beta-lactamases was assessed by PCR as described previously (Cassi et al. 2016). Positive result was only obtained for *bla*<sub>KPC</sub> and sequencing analysis identified the *bla*<sub>KPC-2</sub> allele (Table1). The insertion sequence *ISKpn6* was located downstream *bla*<sub>KPC-2</sub>, but structures upstream could not be determined as PCR targeting both *ISKpn7* and *ISKpn8* yielded negative results. In addition, plasmid profile analysis upon extraction by the Kieser technique and electrophoresis revealed absence of replicons. In addition, repetitive attempts to transfer *bla*<sub>KPC-2</sub> to *E. coli* J53 by mating-out assays were unsuccessful, suggesting possible chromosomal location of this resistance determinant.

Pa1461 was able to produce phospholipase, protease, hemolysin and a strong biofilm (Table 1). In addition, this isolate harbored several virulence genes, as revealed by PCR, such as: *lasI* (encoding the autoinducer synthase of Las quorum sensing system), *plcH* (hemolytic phospholipase C), *toxA* (exotoxin A), *lasB* (elastase) and *exoS/exoU*<sup>+</sup> genotype (type III secretion system) which is a genetic marker of ST235 clone (Table 1) (Oliver et al., 2015; Treepong et al. 2017).

KPC was first detected in this healthcare institution in February 2009, when we observed a large multiclonal outbreak of KPC-2 producing *K. pneumoniae* (Ramos et al. 2012). Since then, *P. aeruginosa* were prospectively evaluated for KPC production, and we

could describe such occurrence in 2010 (Carrara-Marroni et al. 2015). To assess earlier emergence of *bla*<sub>KPC-2</sub> in *P. aeruginosa*, we conducted a retrospective survey comprising one year prior to the above mentioned outbreak due to KPC-producing *K. pneumoniae*. Fifty-three carbapenem non-susceptible *P. aeruginosa* recovered from January to December 2008 were evaluated for presence of *bla*<sub>KPC</sub> and only Pa1461 was positive, demonstrating that *P. aeruginosa* ST235 producing KPC-2 circulated in that hospital before we first identified KPC-producing *K. pneumoniae*.

Presence of XDR *P. aeruginosa* ST235 producing KPC in Brazil is worrisome considering its wide repertoire of virulence and dissemination capacity. Furthermore, chromosomally-encoded *bla*<sub>KPC</sub> may favor spread of KPC-producing *P. aeruginosa* upon expansion of this high risk clone. Although SPM-1 is the most prevalent carbapenemase in our country, expansion of the ST235 clone evaluated here may cause a future endemic state of KPC-producing *P. aeruginosa*, as it was observed in Colombia. Therefore, careful monitoring of this international high-risk clone could be useful to avoid the spread of this life-threatening microorganism.

## References

Cacci LC, Chuster SG, Martins N, Carmo PR, Girão VB, Nouér SA, Freitas WV, Matos JA, Magalhães AC, Ferreira AL, Picão RC, Moreira BM. Mechanisms of carbapenem resistance in endemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates after an SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase producing strain subsided in an intensive care unit of a teaching hospital in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016;111:551-558.

Carrara-Marroni FE, Cayô R, Streling AP, da Silva AC, Palermo RL, Romanin P, Venâncio E, Perugini MR, Pelisson M, Gales AC. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. J Glob Antimicrob Resist 2015;3(4):304-306.

Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat 2015;21-22:41-59.

Ramos PI, Picão RC, Vespero EC, Pelisson M, Zuleta LF, Almeida LG, Gerber AL, Vasconcelos AT, Gales AC, Nicolás MF. Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. BMC Microbiol 2012;12:173.

Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin Microbiol Infect 2017;pii: S1198-743X(17)30342-7

**Table 1:** Clinical and microbiological data of KPC-2-producing *P. aeruginosa* ST235, isolate Pa1461.

Date and ward of patient's hospitalization	Clinical specimen and date of isolate recovery	Antimicrobial Susceptibility Profile <sup>a</sup>		Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL) <sup>b</sup>					Resistance gene detected	Virulence genes detected	Virulence phenotype
		R	S	CAZ	IMI	MEM	COL	POLB			
November/2008 BICU	Urine 10 <sup>7</sup> CFU/mL December/ 2008	AK, CN, TOB, AZT, CEF, CAZ, IMI, MEM, PIP/TZP, CIP, LEV	COL, POL B	≥128	128	128	1	0.5	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	<i>lasI</i> , <i>lasB</i> , <i>toxA</i> , <i>plcH</i> , <i>exoY</i> , <i>exoU</i>	Phospholipase, protease, hemolysin, strong biofilm producer

BICU - burn intensive care unit; CFU – Colony forming units; AK – amikacin; CN – gentamicin; TOB – tobramycin; AZT – aztreonam; CEF – cefepime; CAZ – ceftazidime; IMP – imipenem; MEM – meropenem; PIP/TZP – piperacillin-tazobactam; COL – colistin; POLB – polymyxin B; CIP – ciprofloxacin; LEV – levofloxacin.

<sup>a</sup>The antimicrobial susceptibility profile was performed using Kirby-Bauer disk diffusion and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2017).

<sup>b</sup>The minimum inhibitory concentration was determined using the broth microdilution method conducted and interpreted according to CLSI guidelines (CLSI, 2012; 2017).

## CONCLUSÕES

- Mais da metade dos isolados foram considerados multirresistentes aos antimicrobianos e altas taxas de resistência foram verificadas entre os isolados de *P. aeruginosa* estudados, os quais apresentaram taxas de resistência aos carbapenêmicos superiores a 78,1%. Contudo, nenhum isolado apresentou resistência às polimixinas. Dentre os isolados produtores de carbapenemases, 67,1% foram considerados extensivamente resistentes e as taxas de resistência aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas foram superiores a 95,7%. Estes resultados sugerem a utilização das polimixinas como antimicrobianos de escolha para o tratamento das infecções sérias por este agente no HU.

- Um terço dos isolados foram produtores de carbapenemases e, em sua maioria, produtores de metalo-beta-lactamases, indicando que estas enzimas constituem importantes determinantes de resistência aos beta-lactâmicos entre os isolados de *P. aeruginosa* recuperados no HU.

- Entre os isolados incluídos neste estudo, as carbapenemases mais frequentes foram: SPM-1, seguida por KPC-2, IMP-16, VIM-1 e VIM-7. Os genes codificadores de IMP-16, VIM-1 e VIM-7 estavam inseridos em integrons de classe I. A manutenção de determinantes de resistência aos carbapenêmicos no HU, bem como a detecção de novas enzimas ressalta a necessidade da contínua vigilância para a detecção destas enzimas a fim de monitorar e prevenir a disseminação de novas carbapenemases no hospital.

- Os isolados, além de apresentarem importantes determinantes de resistência aos carbapenêmicos, também foram capazes de produzir fatores de virulência e apresentaram importantes genes codificadores de fatores de virulência. Este fato é preocupante devido à capacidade deste patógeno causar danos ao paciente e à limitação terapêutica para o tratamento de infecções causadas por estes isolados.

- A diversidade genotípica observada entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemases indica que a pressão seletiva exercida pela utilização de antibióticos possa ocorrer no HU.

- A presença de clones de alto risco que apresentam importantes determinantes de resistência aos carbapenêmicos e dotados de

um repertório de virulência é alarmante. Uma vez que estes clones de *P. aeruginosa* são reconhecidos pela disseminação da resistência aos antimicrobianos no Brasil e no mundo, o monitoramento destes clones deve ser realizado a fim de evitar a disseminação deste patógeno no hospital.