



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAQUEL LIMA PALERMO

**CARACTERIZAÇÃO DE DETERMINANTES DE  
RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS ANTIMICROBIANOS E DE  
GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS E  
AMBIENTAIS DE *Pseudomonas* spp. MULTIRRESISTENTES**

RAQUEL LIMA PALERMO

**CARACTERIZAÇÃO DE DETERMINANTES DE  
RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS ANTIMICROBIANOS E DE  
GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS E  
AMBIENTAIS DE *Pseudomonas* spp. MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Sueli Fumie Yamada Ogatta  
Co-orientadora: Floristher Elaine Carrara-  
Marroni

Londrina  
2018

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

Palermo, Raquel Lima.

CARACTERIZAÇÃO DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS ANTIMICROBIANOS E DE GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Pseudomonas* spp. MULTIRRESISTENTES / Raquel Lima Palermo. - Londrina, 2018.

121 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Coorientador: Floristher Elaine Carrara-Marroni.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. *Pseudomonas* spp. - Tese. 2. Determinantes de resistência adquirida - Tese. 3. Resistência aos antimicrobianos - Tese. 4. Carbapenemases - Tese. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada . II. Carrara-Marroni, Floristher Elaine . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

RAQUEL LIMA PALERMO

**CARACTERIZAÇÃO DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA  
ADQUIRIDA AOS ANTIMICROBIANOS E DE GENES DE VIRULÊNCIA  
EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas* spp.  
MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada  
Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dra. Suelen Balero de Paula  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 08 de Março de 2018.

*Dedico este trabalho in memoriam dos meus queridos e amados avós Maria Almeida de Lima e José Estevão de Lima que sempre foram minha referência de princípios e coragem para seguir em frente.*

## AGREDECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter permitido que eu concluísse este trabalho e me manter confiante durante os momentos de dificuldade.

A minha orientadora, Professora Sueli Fumie Yamada Ogatta, por ter aberto as portas do seu laboratório, pelo apoio e disponibilidade em me acolher quando foi preciso, ter confiado no meu trabalho e na minha capacidade de desenvolver esta pesquisa.

A minha co-orientadora, Professora Floristher Elaine Carrara-Marroni, por todos os anos de ensinamento, carinho e aprendizado que contribuíram para a minha formação. Pela oportunidade de trabalhar com microbiologia, um assunto que aprendi a amar e a me dedicar integralmente, me espelhando sempre na sua habilidade de instruir e mostrar o caminho a seguir. Por todas as vezes que me inspirou a ser uma profissional competente e pelas palavras de suporte e reconhecimento da minha capacidade como aluna e profissional.

A Professora Márcia Regina Eches Perugini, por ter sido a primeira pessoa a me oferecer a oportunidade de trabalhar com microbiologia e sempre estar disponível para me ajudar.

A Professora Bárbara Gionco, por toda a paciência e atenção nos ensinamentos iniciais quando entrei no LEMRA e, por prontamente atender ao meu convite de participação na banca de qualificação do mestrado.

A Professora Jacinta Sanchez Pelayo, por sempre atender ao meu convite de participação na banca de qualificação e defesa do mestrado.

A Professora Maria Cristina Bronharo Tognim, por atender ao meu convite de participação na banca de defesa do mestrado e por oferecer seu laboratório e disponibilizar a aluna Márcia Maria dos Anjos Szczerepa que auxiliou nas análises dos resultados apresentados neste trabalho com o *Software Bionumerics*.

A Professora Suelen Balero de Paula, por ser uma amiga atenciosa e querida que participou e acompanhou cada etapa do desenvolvimento deste trabalho, sempre estando disponível para me orientar e ajudar na análise dos resultados, além de atender ao meu convite de participação na banca de qualificação e defesa do mestrado.

Aos professores do departamento de patologia, Professor Emerson José Venâncio e Professora Eiko Nakagawa Itano, por colaborarem para o desenvolvimento desta pesquisa cedendo os equipamentos necessários para algumas etapas da metodologia.

A professora Renata Cristina Picão, por gentilmente ceder as linhagens bacterianas utilizadas como controle neste trabalho.

Aos alunos do departamento de genética e a Ana Camila Munis Jardim, por ajudar quando necessário ou por indicar quem poderia contribuir para as metodologias e análises dos resultados, e ao aluno Lucas Milanez Benicio por fazer todos os sequenciamentos deste trabalho.

Aos meus colegas e parceiros de laboratório, a mestranda Larissa dos Santos Fávoro e ao aluno de iniciação científica Jônatas Fernando Cavallini, pela convivência e por ajudarem sempre que solicitei, contribuindo de alguma forma para os resultados aqui apresentados.

A mestranda Renata Fernandes, por me ajudar na realização dos experimentos de microdiluição em caldo.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia Clínica do HU Claudineia e Fábio pelos ensinamentos básicos em microbiologia e pelo carinho e atenção.

As minhas amigas, e companheiras de profissão Rosemeire Corrêa Pestana, Ana Camila Munis Jardim, Franciele Aparecida Marcatto e Dayane Bonetti Taborda pela amizade verdadeira e por dividirem os momentos de descontração, alegrias e incertezas.

A minha amiga e companheira de todas as horas Priscila Romanin, que sempre foi o meu suporte e apoio na pesquisa e na vida nos nossos longos anos de amizade, que sempre me ajudou a encontrar soluções para todos os problemas, e que me incentivou e esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis de toda nossa jornada até aqui, aceitando qualquer desafio.

A minha família por todo o apoio, compreensão e palavras de suporte e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo apoio, suporte e incentivo, em especial a minha Mãe, por ser minha melhor amiga, me entender, acompanhar e cuidar de mim durante as longas horas de estudo. Por dividirem comigo intensos momentos de alegria e frustrações, por sempre me fornecerem estrutura e amor para chegar até

aqui e não me deixarem desistir. A vocês todo meu amor e carinho. Sem vocês eu não seria o que sou hoje.

Ao meu irmão Lucas, por ser o melhor companheiro e amigo, por me aconselhar, animar, repreender e ajudar sempre que preciso.

A CAPES e a Universidade Estadual de Londrina, pela concessão da bolsa de mestrado e por financiar esta pesquisa.

Agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma  
nova ideia jamais volta ao seu  
tamanho original”.*

*Albert Einstein*

PALERMO, Raquel Lima. **Caracterização de determinantes de resistência adquirida aos antimicrobianos e de genes de virulência em isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas* spp. multirresistente.** 2018. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

O surgimento de isolados de *Pseudomonas* spp. multirresistentes aos antimicrobianos (MR-PS) é um problema de saúde pública, uma vez que a maioria dos determinantes de resistência aos antimicrobianos são adquiridos e podem ser disseminados entre isolados, em diversos ambientes, por meio da transferência lateral de genes. O objetivo desta pesquisa foi realizar a vigilância epidemiológica de MR-PS no ambiente hospitalar e comunitário contribuindo para o controle de infecções hospitalares no Hospital Universitário de Londrina (HU). Foram analisadas a presença de genes que codificam resistência adquirida aos antimicrobianos e virulência, e a relação clonal entre os isolados. A identificação e o perfil de resistência foram, primeiramente, realizados pelo sistema automatizado Vitek-2 (BioMérieux®) para os isolados clínicos e por testes bioquímicos convencionais para os isolados ambientais seguido por identificação molecular baseada em análises do gene 16S rRNA para espécies de *Pseudomonas*. Os genes codificadores de resistência aos beta-lactâmicos e carbapenêmicos de classe A, B e D de Ambler, quinolonas (*qnr*), aminoglicosídeos (*rmt*) e colistina (*mcr-1*) foram pesquisados por PCR e a identidade confirmada por sequenciamento. O contexto dos genes codificadores de carbapenemases foi investigado por PCR-mapping e a relação clonal entre os isolados foi analisada por ERIC-PCR. Um total de 198 isolados clínicos recuperados entre os anos de 2015 e 2016 foram selecionados para o estudo com base nos seguintes critérios: isolados únicos, consecutivos e não sensíveis a ceftazidima e/ou imipenem e meropenem. Além disso, foram incluídos no presente trabalho sete isolados ambientais de MR-PS produtores de carbapenemases, os quais foram recuperados de efluentes e faziam parte de uma coleção de isolados de *Pseudomonas* spp. do Laboratório de estudos moleculares e resistência aos antimicrobianos (LEMRA) do Ambulatório de Especialidades do HU (AEHU). Com exceção das polimixinas (100,0% sensíveis), altas taxas de resistência foram obtidas para todos os antimicrobianos testados. Taxas preocupantes foram detectadas para os carbapenêmicos em isolados clínicos: 81,5% e 82,5% para imipenem e meropenem, respectivamente. Dentre os 198 isolados clínicos MR-PS, 38 (19,2%) apresentaram genes codificadores de beta-lactamases, dos quais 32 (16,1%) apresentaram genes codificadores de carbapenemases. Desta forma, a nova distribuição dos genes codificadores de beta-lactamases foi: em 14 isolados o gene *bla*<sub>SPM-1</sub>, seguido por 10 isolados carreando o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, 2 *bla*<sub>IMP-16</sub>, 6 *bla*<sub>CTX-M-2</sub> e 6 *bla*<sub>GES-5</sub>, indicando um aumento da taxa de isolados portadores de *bla*<sub>KPC</sub> e uma redução de isolados portadores de *bla*<sub>SPM</sub> em comparação com as pesquisas anteriores. Os genes investigados que codificam resistência às quinolonas, aminoglicosídeos e colistina não foram detectados neste estudo. Os 32 isolados clínicos de MR-PS que apresentaram genes de carbapenemases foram agrupados em 12 clones (A-L) distribuídos ao longo do período analisado em diversas unidades hospitalares. Os isolados que carregam o gene *bla*<sub>SPM-1</sub> foram agrupados em um único clone (A), sugerindo uma disseminação clonal e que este

clone A é o responsável pela manutenção desse determinante de resistência no HU. Os isolados codificadores de *bla*<sub>IMP-16</sub> foram agrupados em 2 clones que diferiram fenotipicamente do clone que se manteve no hospital por 10 anos caracterizado pela sensibilidade ao meropenem. Dentre os 10 isolados portadores do gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, obtiveram-se 7 clones revelando a adaptação deste determinante de resistência em nosso hospital, provavelmente movido pela pressão seletiva do uso de carbapenêmicos. A presença de uma nova carbapenemase do tipo GES-5 foi detectada em 6 isolados pertencentes a um mesmo clone (B). Todos os isolados exibiram um padrão de genes de virulência que condiz com sua capacidade patogênica, porém não apresentaram correlação com a produção de carbapenemases, mas podem estar relacionados a clones epidêmicos mundiais. Os isolados ambientais apresentaram-se clonalmente distintos dos isolados clínicos, representando 7 clones diferentes (A-G) condizendo com a diversidade esperada em isolados ambientais. Além disso, a frequência de genes de virulência foi menor, revelando uma menor capacidade patogênica quando comparado aos isolados clínicos. A presença de isolados produtores de carbapenemases recuperados de efluentes é alarmante uma vez que este ambiente é caracterizado pela notável capacidade de disseminação da resistência. Além disso, esses resultados mostram que as taxas e a distribuição dos genes de resistência adquirida aos antimicrobianos podem flutuar em uma instituição e que a sua vigilância é essencial para estabelecer as medidas de controle de infecção para resguardar a eficácia dos antimicrobianos no tratamento de infecções por *Pseudomonas* spp.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas* spp. Multirresistentes aos antimicrobianos. Determinantes de resistência adquirida. Resistência aos antimicrobianos. Carbapenemases.

PALERMO, Raquel Lima. **Characterization of acquired resistance determinants to antimicrobials and virulence genes in clinical and environmental isolates of multi-drug resistant *Pseudomonas* spp.** 2018. 121 pp. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

The emergence of *Pseudomonas* spp. (MR-PS) is a public health problem, since most antimicrobial resistance determinants are acquired and can be disseminated among isolates in a variety of environments through lateral gene transfer. The objective of this research was to performance the epidemiological surveillance of MR-PS in the hospital environment and community contributing to the control of hospital infections at the Hospital Universitário de Londrina (HU). Were analyzed the presence of genes coding for antimicrobial resistance, virulence and the clonal relationship between the isolates. The identification and resistance profile were first performed by the Vitek-2 automated system (BioMérieux®) for clinical isolates and by conventional biochemical tests for environmental isolates followed by molecular identification based on analyzes of the 16S rRNA gene for *Pseudomonas* species. The genes encoding resistance to beta-lactam and carbapenems from class A, B and D of Ambler, quinolones (*qnr*), aminoglycosides (*rmt*) and colistin (*mcr-1*) were screened by PCR and the identity confirmed by sequencing. The context of the genes encoding carbapenemases was investigated by PCR-mapping and the clonal relationship between the isolates was analyzed by ERIC-PCR. A total of 198 clinical isolates recovered between the years 2015 and 2016 were selected for the study based on the following criteria: single, consecutive and non-susceptible isolates for ceftazidime and/or imipenem and meropenem. In addition, were included in this study seven environmental isolates of MR-PS producing carbapenemases, which were recovered from effluents and were part of a collection of *Pseudomonas* spp. from the Laboratório de estudos moleculares e resistência aos antimicrobianos (LEMRA) of the Ambulatório de Especialidades do HU (AEHU). With the exception of polymyxins (100.0% sensitive), high resistance rates were obtained for all antimicrobials tested. Concern rates were detected for carbapenems in clinical isolates: 81.5% and 82.5% for imipenem and meropenem, respectively. Among the 198 MR-PS clinical isolates, 38 (19.2%) had beta-lactamases encoding genes, of which 32 (16.1%) had genes encoding carbapenemases. Thus, the new distribution of the genes encoding beta-lactamase was: in 14 isolates the *bla*<sub>SPM-1</sub> gene, followed by 10 isolates carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> gene, 2 *bla*<sub>IMP-16</sub>, 6 *bla*<sub>CTX-M-2</sub> and 6 *bla*<sub>GES-5</sub>, indicating an increase in the rate of *bla*<sub>KPC</sub> carriers isolates and a reduction of *bla*<sub>SPM</sub> carriers isolates compared to previous research. The investigated genes encoding resistance to quinolones, aminoglycosides and colistin were not detected in this study. The 32 clinical isolates of MR-PS that showed carbapenemase genes were grouped into 12 clones (A-L) distributed over the period analyzed in several hospital units. The isolates carrying the *bla*<sub>SPM-1</sub> gene were grouped into a single clone (A), suggesting a clonal spread and that clone A is responsible for maintaining this resistance determinant in HU. The isolated encoding *bla*<sub>IMP-16</sub> were grouped into two clones differed phenotypically from the clone that was maintained in the hospital for 10 years and characterized by sensitivity to meropenem. Among the 10 isolates carrying the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene, 7 clones were obtained, revealing the adaptation of this resistance determinant in our hospital,

probably due to the selective pressure of carbapenem use. The presence of a new carbapenemase type GES-5 was detected in 6 isolates belonging to the same clone (B). All isolates exhibited a pattern of virulence genes that matched their pathogenicity but did not correlate with the production of carbapenemases, but may be related to global epidemic clones. The environmental isolates were clonally distinct from clinical isolates, representing 7 different clones (A-G), matching the expected diversity in environmental isolates. In addition, the frequency of virulence genes was lower, revealing a lower pathogenicity when compared to clinical isolates. The presence of carbapenemase producers isolated recovered from effluents is worrisome since this environment is characterized by the remarkable capacity of dissemination of resistance. In addition, these results show that the rates and distribution of antimicrobial acquired resistance genes may float in an institution and that their surveillance is essential to establish infection control measures to safeguard the effectiveness of antimicrobials in the treatment of infections by *Pseudomonas* spp.

**Key words:** *Pseudomonas* spp. Multidrug resistant. Acquired resistance determinants. Antimicrobial resistance. Carbapenemases.

## LISTA DE FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 1</b> – Estrutura geral de integrons de classe 1 .....   | 31  |
| <b>Figura 2</b> – Representação esquemática do contexto genético dos genes que codificam beta-lactamases identificados em isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....   | 37  |
| <b>Figura 3</b> – Representação esquemática do transposon Tn4401 associado ao gene <i>bla<sub>KPC</sub></i> .....  | 39  |
| <b>Figura 4</b> – Representação esquemática do contexto genético dos genes codificadores de beta-lactamase identificados em isolados de <i>P. aeruginosa</i> ..... | 43  |
| <b>ARTIGO A</b>  |     |
| <b>Figure 1</b> - Dendrogram of clinical isolates of <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> producing <i>P. aeruginosa</i> .....   | 86  |
| <b>APÊNDICES</b>   |     |
| Dendrograma dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de carbapenemases .....  | 121 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1</b> - Variantes de beta-lactamases da classe A de Ambler descritas em <i>P. aeruginosa</i> .....  | 36  |
| <b>Tabela 2</b> - Variantes de metalo-beta-lactamases da classe B de Ambler descritas em <i>P. aeruginosa</i> .....   | 41  |
| <b>Tabela 3</b> - Variantes de oxacilinases descritas em <i>P. aeruginosa</i> .....   | 44  |
| <b>ARTIGO A</b>   |     |
| <b>Table 1</b> - Antibiotic susceptibility testing results and associated genes of clinical isolates of <i>bla</i> <sub>kpc-2</sub> producing <i>P. aeruginosa</i> isolated at the Hospital Universitário de Londrina from 2008 to 2016 ..... | 85  |
| <b>ARTIGO C</b>   |     |
| <b>Table 1</b> - Antibiotic susceptibility testing results and associated genes of clinical and environmental isolates of <i>bla</i> <sub>IMP-16</sub> producing <i>Pseudomonas</i> spp.....  | 110 |
| <b>APÊNDICES</b>  |     |
| Tabela de resultados dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de <i>bla</i> <sub>SPM</sub> .....   | 119 |
| Tabela de resultados dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de <i>bla</i> <sub>GES</sub> .....   | 120 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |   |
|----------|---|
| ANVISA   | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                      |
| BEL      | <i>Belgium extended-spectrum beta-lactamase</i>               |
| BKC      | <i>Brazilian Klebsiella carbapenemase</i>                     |
| CLSI     | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>                |
| CHDL     | <i>Carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase</i>          |
| CIM      | Concentração inibitória mínima                                |
| CTX      | <i>Cefotaxime Munich</i>                                      |
| EDTA     | Ácido etileno-diamino-tetracético                             |
| EUA      | Estados Unidos da América                                     |
| ER       | Extensivamente resistente aos antimicrobianos                 |
| ERIC-PCR | <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>        |
| ESBL     | <i>Extended spectrum beta-lactamase</i>                       |
| FIM      | <i>Florence imipenemase</i>                                   |
| GES      | <i>Guiana extended spectrum</i>                               |
| GIM      | <i>German imipenemase</i>                                     |
| HMB      | <i>Hamburg metallo-beta-lactamase</i>                         |
| HU       | Hospital Universitário de Londrina                            |
| IMP      | <i>Imipenemase</i>  |
| KB       | Quilobases  |
| KPC      | <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>                    |
| LPS      | Lipopolissacarídeo  |
| LSBL     | Beta-lactamases de espectro limitado                          |
| MBL      | Metalo-beta-lactamase   |
| MDR      | <i>Multidrug-resistant</i>                                    |
| MFS      | <i>Major Facilitator Superfamily</i>                          |
| MLST     | <i>Multilocus Sequence Typing</i>                             |
| MR       | Multirresistente  |
| MR-OS    | <i>Pseudomonas</i> spp. multirresistentes aos antimicrobianos |
| NDM      | <i>New-Delhi metallo-beta-lactamase</i>                       |
| OMS      | Organização mundial da saúde                                  |
| OXA      | Oxacilinase   |
| PBP      | Proteína ligadora de penicilina                               |

|       |  |
|-------|--|
| PCR   | <i>Polymerase Chain Reaction</i>   |
| PDR   | <i>Pandrug-resistant</i>   |
| PER   | <i>Pseudomonas extended resistant</i>                                      |
| PR    | Pan resistente aos antimicrobianos   |
| QS    | <i>Quorum sensing</i>  |
| RA    | Resistência aos antimicrobianos  |
| RND   | <i>Resistance Nodulation Division</i>                                      |
| SCOPE | <i>Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance</i> |
| SHV   | <i>Sulphydryl-variable beta-lactamase</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>   |
| UC    | Unidade de cuidados intermediários   |
| 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>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 23 |
| 2.1      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | 23 |
| 2.2      | Fatores de virulência .....  | 25 |
| 2.3      | Opções terapêuticas para infecções ocasionadas por <i>P. aeruginosa</i> .....  | 28 |
| 2.4      | Elementos genéticos móveis e seu papel na resistência aos antimicrobianos em <i>P. aeruginosa</i> .....  | 29 |
| 2.5      | Resistência aos beta-lactâmicos  |    |
| 2.5.1    | Beta-lactamases .....  | 32 |
| 2.5.2    | <i>Guiana Extended-Spectrum</i> (GES) .....  | 37 |
| 2.5.3    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC) .....   | 38 |
| 2.5.4    | Metalo-beta-lactamases (MBL) .....   | 40 |
| 2.5.5    | Oxacilinases (OXA) .....   | 43 |
| 2.6      | Resistência às Fluoroquinolonas .....  | 45 |
| 2.7      | Resistência aos Aminoglicosídeos .....   | 47 |
| 2.8      | Resistência às Polimixinas .....   | 49 |
| 2.9      | Resistência aos antimicrobianos no ambiente .....  | 50 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 52 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 70 |
| 3.1      | Objetivo Geral .....   | 72 |
| 3.2      | Objetivos Específico .....   | 72 |
| <b>4</b> | <b>ARTIGO A</b> – Caracterização de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtoras de <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> durante um período de 9 anos (2008-2016) .....   | 74 |
| <b>5</b> | <b>ARTIGO B</b> – Primeira descrição de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> co-carreando <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> , <i>bla</i> <sub>GES-5</sub> e 16S rRNA Metilase RmtD1 pertencente ao ST1560 recuperado de efluentes no Brasil ..... | 93 |

|   |   |     |
|---|---|-----|
| 6 | <b>ARTIGO C</b> – <i>Pseudomonas</i> spp produtora de <i>bla</i> <sub>IMP-16</sub> : Evidência molecular da diversidade clonal entre isolados clínicos e ambientais ..... | 98  |
| 7 | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 117 |
|   | <b>APÊNDICES</b> .....  | 116 |
|   | APÊNDICE A – Tabela de resultados de isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de <i>bla</i> <sub>SPM</sub> .....   | 119 |
|   | APÊNDICE B – Tabela de resultados de isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de <i>bla</i> <sub>GES</sub> .....   | 120 |
|   | APÊNDICE C – Dendrograma de isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de carbapenemases .....   | 121 |

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a resistência aos antimicrobianos (RA) se disseminou e tornou-se um problema de saúde global que impacta inclusive a economia mundial. Recentemente, o diretor geral da Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu um alerta sobre a chegada iminente da "era pós-antibiótica", na qual os antibacterianos não terão efeito contra bactérias patogênicas. Este documento ressalta a urgência da tomada de medidas de controle efetivas para que se evite a previsão catastrófica de mortes atribuídas à RA de aproximadamente 10 milhões de pessoas até 2050 (O'NEILL, 2016).

Atualmente, a resistência bacteriana a diferentes antimicrobianos está difundida em todo o mundo. No ambiente hospitalar, onde grandes quantidades de antimicrobianos são utilizadas, pode ocorrer um aumento da seleção de isolados multirresistentes (MR), que contribuem para a disseminação da resistência, ocasionando infecções de difícil controle (O'BRIEN, 2002; KÜMMERER, 2009; BOUKI et al., 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* está entre os principais microrganismos responsáveis por infecções hospitalares no Brasil e no mundo, estando particularmente associada a infecções em pacientes imunocomprometidos. Em razão dos elevados índices de resistência aos antimicrobianos e a emergência de isolados que exibem perfis de multirresistência - resistência a pelo menos três das oito classes de antimicrobianos definidas para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa*, esta bactéria figura na lista de patógenos resistentes aos antimicrobianos prioritários em 2017 pela OMS (WHO, 2017).

A diversidade metabólica que permite adaptação a condições adversas e permanência por longo tempo no ambiente, juntamente com a presença de diversos fatores de virulência, e resistência intrínseca e adquirida resultam na emergência de *P. aeruginosa* MR responsáveis por infecções epidêmicas e endêmicas (CHOLLEY et al., 2011; POTRON et al., 2015).

A resistência natural a agentes antimicrobianos em *P. aeruginosa* ocorre devido à produção de beta-lactamases, alteração da permeabilidade da

membrana externa e expressão constitutiva de sistemas de efluxo. Além disso, este microrganismo apresenta habilidade em adquirir mecanismos de resistência adicionais a múltiplas classes de antimicrobianos que contribuem para o surgimento de isolados MR. A existência de *Pseudomonas* spp. MR (MR-PS) compromete a escolha terapêutica adequada, estando associada a taxas significativas de morbidade e mortalidade (SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2017).

A frequência de MR-PS está aumentando em todo o mundo com taxas que variam de 15 a 30%, embora existam variações importantes nas diferentes regiões geográficas. Entretanto, uma proporção importante de isolados MR atendem aos critérios de *extensive drug-resistant* (XDR) - resistência a todas menos uma das oito classes de antimicrobianos testados; limitando ainda mais o arsenal terapêutico. A resistência a todos os antimicrobianos, exceto às polimixinas, não é mais raridade em muitos hospitais de todo o mundo, sendo os isolados *pan drug-resistant* (PDR), resistentes a todos os antimicrobianos, já ocasionalmente, relatados (MAGIORAKOS et al., 2012; OLIVER et al., 2015; ALIPOUR et al., 2017).

O grupo de beta-lactâmicos constituído por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos são os antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*; sendo os últimos, os fármacos mais comumente empregados para a terapia de infecções causadas por isolados MR-PS (POIREL; PITOUT; NORMANN, 2007, GRUPTA, 2008).

De acordo com o Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde, publicado em 2017 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, nas últimas quatro décadas, a incidência de *P. aeruginosa* associada a infecções hospitalares foi de 10%, sendo assim considerada como um agente etiológico importante de infecções em pacientes hospitalizados (ANVISA, 2017). Os dados do programa SENTRY (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*) de vigilância de RA na América Latina, mostram a evolução da resistência em *P. aeruginosa*, sendo este o principal patógeno isolado em casos de pneumonia, o terceiro mais frequente em infecções de pele e tecidos moles e o quinto em infecções de corrente sanguínea até o ano de 2013. Foi observado que 30,2% dos isolados de *P. aeruginosa*, coletados em centros brasileiros, entre 1997 e 2001, foram resistentes aos

carbapenêmicos, e entre isolados de pacientes internados em unidades de terapia intensiva, esta taxa aumentava para 40,0% (CAMPANA, 2013).

O programa SCOPE Brasil (*The Brazilian Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance*) revelou que *P. aeruginosa* foi recuperada em 3,9% dos casos das infecções de corrente sanguínea em pacientes pediátricos, com resistência aos carbapenêmicos superior a 20,0% e taxa de mortalidade de 14,3% (PEREIRA et al., 2013).

Quando comparadas, as taxas de resistência ao imipenem em isolados de *P. aeruginosa* no Brasil aumentaram do período de 1997-1999 (34,1%) em relação ao período de 2003-2005 (42,0%), no entanto se manteve estável em relação ao período de 2008-2010 (42,1%). Dados atuais mostram que essa porcentagem diminuiu em 2017 (39,1%) (GALES et al., 2012, ANVISA, 2017).

O Hospital Universitário de Londrina (HU) atende pacientes de cerca de 250 municípios do Paraná e de mais de 100 cidades de outros estados. Possui uma estrutura de 313 leitos, sendo: 213 leitos de unidades de internação; 20 de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) adultos; 05 UTIs pediátricas; 17 de Cuidados intermediários neonatais (UCI Neonatal) e UTI Neonatal, 45 de Pronto Socorro e 16 da Unidade de Queimados. Os hospitais que possuem UTI e centro cirúrgico, em que os pacientes são tratados com antimicrobianos, representam um “habitat” que alberga bactérias e que contribuem para RA nas infecções hospitalares devido ao uso excessivo de antimicrobianos, falhas em medidas básicas de controle de infecção hospitalar pelos profissionais e pacientes hospitalizados imunocomprometidos.

A média das taxas de resistência para *Pseudomonas* spp. entre os anos de 2012 a 2016 no HU foi de 58,0% ao aztreonam; 42,9% piperacilina+tazobactam; 44,0% cefepime; 41,3% ceftazidima; 43,2% imipenem; 42,0% meropenem; 48,1% ciprofloxacina; 48,4% gentamicina; 41,0% amicacina; 0,7% colistina (dados não publicados), sendo detectado, nos últimos anos, em isolados de *P. aeruginosa* do HU diversos genes codificadores de carbapenemases: *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>IMP</sub> (PICÃO et al., 2012; CARRARA-MARRONI et al., 2015; DE PAULA et al., 2017).

Estudos têm associado a presença de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar à disseminação clonal da espécie. Três clones internacionais de alto risco de *P. aeruginosa*, *Sequence Type* 111 (ST111), ST175 e ST235, são considerados os responsáveis pela disseminação de genes codificadores de carbapenemases em todo o mundo, sendo o ST235 já reportado no HU em um isolado produtor do gene *bla<sub>KPC</sub>* recuperado no ano de 2008 (CORREA et al., 2015; DE PAULA-PETROLI et al., 2018).

Dessa forma, a detecção rápida de isolados produtores de carbapenemases por meio da utilização de testes com um curto tempo de resposta é essencial para garantir a implantação oportuna de medidas de controle nos hospitais. O rastreio preliminar é realizado para imipenem ou meropenem na rotina da maioria dos laboratórios (PRAGASAM et al., 2016).

Testes fenotípicos podem sugerir a presença de uma certa classe de carbapenemase, e ajudam a excluir outros mecanismos de resistência aos carbapenêmicos como perda de porina, produção de AmpC e/ou ESBL. A detecção de carbapenemases pode ser feita utilizando bioensaios, ensaios colorimétricos, MALDI-TOF ou espectrofotometria (AKHI et al., 2016; MARTINEZ-MARTINEZ, 2016).

A técnica de PCR permite a detecção de genes mesmo que estes não sejam expressos, ou que sejam pseudogenes que não produzam uma proteína funcional. A PCR Multiplex é uma técnica útil para a detecção e vigilância, ativa ou orientada por testes fenotípicos, de genes que codificam carbapenemases em *Enterobacteriaceae*. No entanto, não é possível detectar por PCR mutações que alteram a fase de leitura das regiões codificantes. Além disso, novos genes que não apresentam complementariedade com as sequências dos oligonucleotídeos utilizados na PCR não serão detectados. Assim, é necessário a análise da expressão de resistência aos antimicrobianos por testes fenotípicos para a complementação e interpretação do resultado (MARTINEZ-MARTINEZ, 2016).

Este trabalho teve como objetivo realizar a vigilância epidemiológica de *Pseudomonas* spp. no ambiente hospitalar e comunitário, sendo analisadas a presença de genes que codificam resistência adquirida aos antimicrobianos e virulência, e a relação clonal entre os isolados. Os dados obtidos fornecem subsídios para que a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar possa realizar o controle da disseminação

de genes que conferem resistência adquirida aos antimicrobianos em *P. aeruginosa*. Assim, por meio de medidas profiláticas efetivas, podem contribuir para a diminuição das taxas locais de resistência; o controle da disseminação de microrganismos MR; além do direcionamento de terapias efetivas que reduzam o número de pacientes internados e acometidos por infecções de origem hospitalar, que contribuem para os elevados índices de mortalidade e representam altos custos hospitalares por meio de tratamentos com antimicrobianos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não fermentador da glicose, pertencente à família *Pseudomonadaceae*, que compreende mais de 100 espécies. Foi identificada inicialmente por *Luke* em 1862, sendo denominada *Bacillus pyocyaneus* por *Gessard*. Entretanto, ganhou maior importância clínica a partir da década de 60 por ser um agente oportunista que pode causar uma diversidade de infecções agudas em pacientes hospitalizados, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, vítimas de queimaduras, e em pacientes com fibrose cística (LYCZAK et al., 2000, BRETONNIÈRE et al., 2016).

Esta bactéria apresenta ampla capacidade metabólica permitindo sua adaptação e proliferação em diversos ambientes, principalmente no solo e água, ou ainda associada a plantas, animais, dispositivos médicos e presença de alguns desinfetantes (SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2017). *P. aeruginosa* é capaz de utilizar diversas fontes de carbono e nitrogênio em ambiente aeróbico. Entretanto, pode crescer de modo anaeróbico usando nitrato ou arginina como aceptores finais de elétrons. A presença da enzima citocromo oxidase é utilizada como teste para diferenciar este microrganismo dos demais bacilos Gram-negativos (BGN) não fermentadores. Algumas cepas são mucoides pela abundância de uma cápsula de polissacarídeos, e podem produzir pigmentos difusíveis como piocianina (azul), pioverdina (verde), piorrubina (vermelho) e piomelanina (marrom) (MURRAY et al., 2010).

Devido a produção de biofilme, *P. aeruginosa* é capaz de aderir a diversos materiais, contaminando cateteres, respiradores mecânicos, próteses, lentes de contato, equipamentos hospitalares, produtos de limpeza, processadores de alimentos e alguns isolados podem até crescer em água destilada (LYCZAK et al., 2000).

Pacientes em unidades de tratamento intensivo, que sofreram procedimentos invasivos, transplantes de órgãos ou terapia imunossupressora são mais

susceptíveis às infecções por *P. aeruginosa* (HONG et al., 2015). Fatores como presença de cateter, tubo endotraqueal, queimaduras ou diminuição da imunidade do hospedeiro, estão diretamente associados às infecções por este patógeno (GEISINGER; ISBERG, 2017).

A colonização persistente como parte da microbiota normal humana é incomum, exceto em pacientes hospitalizados ou ambulatoriais imunocomprometidos. Como microrganismo oportunista pode causar infecções primárias da pele e tecidos moles, feridas e queimaduras, infecções do trato urinário, pulmonar, otológica, ocular, bacteremia e endocardite, além de outras infecções localizadas no trato gastrointestinal, sistema nervoso central e sistema musculoesquelético (LI et al., 2016; TATARELLI; MIKULSKA, 2016).

A RA em *P. aeruginosa* está relacionada com mecanismos intrínsecos como a produção de uma cefalosporinase induzível (AmpC); a expressão de sistemas de efluxo, sendo MexAB-OprM (expressão constitutiva) e MexXY-OprA (expressão induzível) clinicamente mais importantes; e permeabilidade reduzida de sua membrana externa aos agentes antimicrobianos. A expressão de AmpC desempenha um papel importante na resistência intrínseca de *P. aeruginosa* às aminopenicilinas e a maioria das cefalosporinas (particularmente cefamicinas como a cefoxitina), além de ser um potente indutor de resistência que pode contribuir para o nível de resistência basal de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos. (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

O sistema de efluxo MexAB-OprM desempenha um papel importante nos níveis de sensibilidade basal de *P. aeruginosa* a quase todos os beta-lactâmicos (com exceção de imipenem) e fluoroquinolonas, e o sistema de efluxo induzível MexXY possui atividade significativa no nível basal de sensibilidade a aminoglicosídeos (MORADALI, GHODS E REHM, 2017). Duas outras beta-lactamases intrínsecas também podem influenciar os níveis basais de sensibilidade aos beta-lactâmicos, a enzima OXA PoxB/OXA-50 e uma imipenemase recentemente descrita (PA5542). Em *P. aeruginosa*, diferentes porinas podem ser encontradas em sua membrana externa como, OprC, OprD, OprE e OprF. A OprF é a mais abundante e a mais utilizada para entrada da maioria dos beta-lactâmicos no interior da célula. OprC e OprE são canais inespecíficos, utilizados por alguns antimicrobianos. A porina OprD é amplamente

estudada, pois sua ausência ou expressão reduzida do gene *oprD*, codificador dessa porina, tem contribuído para a resistência aos carbapenêmicos, especialmente imipenem (FAJARDO et al., 2014).

## 2.2 Fatores de virulência

*P. aeruginosa* é um microrganismo que apresenta diversos fatores de virulência, sendo 15% das espécies de *Pseudomonas* consideradas altamente patogênicas (CHAPAVAL et al., 2010).

*Quorum sensing* (QS) é a comunicação entre células individuais usando sinais químicos específicos que regulam uma variedade de processos biológicos importantes para a adaptação e sobrevivência bacteriana por múltiplas vias de sinalização interconectadas. O QS baseia-se em regular a expressão de conjuntos específicos de genes em resposta a um limiar crítico de moléculas de sinalização conhecidas como auto indutores. Mais de 10% dos genes de *P. aeruginosa* são regulados por QS. Esses genes estão envolvidos principalmente na produção de fatores de virulência, motilidade, transição entre célula móvel/célula sésil e desenvolvimento de biofilmes, mecanismos de resistência aos antimicrobianos e resposta ao estresse. O QS pode determinar o grau de danos nos hospedeiros e a progressão das infecções (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

A infecção por *P. aeruginosa* inicia-se com a adesão e colonização. A presença de fímbrias ou *pili*, que possuem moléculas ligantes (lectinas ligadoras de maltose e lectinas ligadoras de galactose), promovem a adesão da bactéria a receptores de glicosídeos GM-1 presentes na superfície das células do hospedeiro (principalmente células cutâneo-mucosas). A fímbria tipo IV é considerada a principal adesina de *P. aeruginosa*, pois permite a aderência inicial em meios abióticos ou superfície celular (FAEZI et al., 2018). O alginato, um exopolissacarídeo mucoide produzido por algumas cepas de *P. aeruginosa*, também desempenha o papel de adesina nas membranas mucosas, sobretudo em pacientes com fibrose cística. Esta substância é um dos constituintes dos biofilmes produzidos por esta bactéria (SINGH; KULHARIA, 2017).

O biofilme é composto por microrganismos aderidos (células sésseis) a um substrato biótico ou abiótico e entre si, fixados em uma matriz polimérica extracelular composta de polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Esta forma de crescimento constitui um modo de proteção dos microrganismos contra condições adversas, conferindo resistência a fagocitose, ao estresse oxidativo, à restrição de nutrientes/oxigênio, ao acúmulo de resíduos metabólicos, às competições interespecíficas e aos agentes antimicrobianos convencionais (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Os mecanismos responsáveis pela resistência do biofilme aos antimicrobianos podem estar associados: a limitação na difusão do antimicrobiano, a produção de enzimas que degradam os agentes e a expressão de genes de resistência, que podem ser adquiridos lateralmente por elementos genéticos móveis. A formação de biofilme por isolados mucoides de *P. aeruginosa* é característica em infecções crônicas e indicativa de progressão e persistência da doença a longo prazo, sendo um dos grandes problemas a colonização de cateteres e de outros dispositivos médicos (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014).

A piocianina é um fator de virulência que possui atividade bactericida contra outros microrganismos, induz apoptose de neutrófilos, diminui a concentração de glutatona e aumenta a expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-1), além de ser tóxica para as células em baixas concentrações. A pioverdina é o principal sideróforo secretado por *P. aeruginosa* e regula a produção de fatores de virulência como a exotoxina A, endoprotease, além da sua própria secreção. No hospedeiro a pioverdina compete pelo ferro ligado às proteínas transferrina, lactoferrina e ferritina (SMITH et al., 2017).

A habilidade de *P. aeruginosa* de invadir os tecidos está ligada a produção de enzimas extracelulares e toxinas que facilitam o rompimento da integridade epitelial e interagem com os fatores de defesa do sistema imunológico do hospedeiro. Essas enzimas são elastases, protease alcalina, fosfolipase C e hemolisinas (GONÇALVES et al., 2017).

Duas hemolisinas, a fosfolipase C que é termolábil e o ramnolipídeo que é termoestável, agem sinergicamente na degradação de lipídeos e lecitina, que são fatores que contribuem para a invasão tecidual. A fosfolipase C possui ação citotóxica

direta, aumentando a síntese de ácido aracdônico e sua capacidade de degradação da fosfatidilcolina, um componente do surfactante pulmonar, ocasionando rompimento nos alvéolos pulmonares. O ramnolípídeo diminui a atividade mucociliar do trato respiratório (KHALIFA et al., 2011).

A elastase também diminui a atividade mucociliar, provoca danos ao epitélio respiratório, hemorragia intra-alveolar, degradação da laminina e elastina dos pequenos vasos, quebra do colágeno, imunoglobulinas e de fatores do complemento. Além disso, quando combinada com a protease alcalina possui ação proteolítica sobre o interferon gama e o fator de necrose tumoral alfa (KHALIFA et al., 2011).

A exotoxina A é uma proteína termolábil, que atua de forma similar à toxina diftérica, catalisando a ADP-ribosilação e inativando o fator de alongação 2 (EF-2), resultando na inibição da síntese de proteínas nas células do hospedeiro, e morte celular. É conhecida como o componente mais tóxico produzido por *P. aeruginosa*, sendo encontrada em aproximadamente 90% dos isolados clínicos (KHALIFA et al., 2011).

*P. aeruginosa* secreta quatro toxinas (ExoS, ExoU, ExoY e ExoT) conhecidas pelo sistema de secreção tipo III (T3SS). Este sistema é um dos principais determinantes da pneumonia aguda causada por *P. aeruginosa*. Tem a capacidade de injetar as quatro proteínas efetoras diretamente no citoplasma da célula hospedeira subvertendo os sistemas de defesa e sinalização da célula. Como consequência ocorre morte celular rápida ou rearranjo do citoesqueleto para facilitar a invasão bacteriana das células epiteliais ou até mesmo a evasão de células fagocíticas (KLOCKGETHER; TÜMMLER, 2017).

A exotoxina S é uma proteína bifuncional e de grande importância na patogênese das infecções devido a sua atividade de ADP-ribosiltransferase, que interfere na organização normal do citoesqueleto celular. É uma proteína comumente produzida por cepas de *P. aeruginosa* presentes nos tecidos queimados e em bacteremias (GEORGESCU et al., 2016).

A proteína ExoU é uma fosfolipase que cliva fosfolípidos de membrana, resultando em uma rápida lise celular e, assim como a ExoS, é expressa de forma variável dependendo do local da infecção e condições gerais do paciente. Uma

correlação entre as características antimicrobianas da bactéria e um genótipo ExoU positivo foi relatado como mal prognóstico em estudos clínicos recentes caracterizando infecções agudas com altas taxas de mortalidade (SAWA et al., 2014).

As citotoxinas ExoU e ExoS contribuem grandemente para a patogênese da doença. Embora, a maioria das cepas possa carrear genes que codificam estas proteínas ExoS ou ExoU, não é comum a produção concomitante das duas. A produção de ExoU é observada, aproximadamente, em 40% e 25% dos isolados sanguíneos e respiratórios, respectivamente. De fato, cepas de *P. aeruginosa* que expressam a citotoxina ExoU mostraram maior impacto em indivíduos com pneumonia, apresentando altas taxas de mortalidade e disseminação pulmonar com danos nos tecidos em comparação com outras exotoxinas secretadas pelo T3SS (CHO et al., 2014).

ExoY é uma adenilato ciclase, que como a ExoT, é uma proteína bifuncional com atividade de ADP-ribosiltransferase e de proteína ativadora de GTPase, codificada por quase todas as cepas. Porém, alguns isolados produzem ExoY não funcional devido à presença de mutações em *frameshift*. ExoT e ExoY têm um efeito menor na virulência da bactéria (SAWA et al., 2014).

### **2.3 Opções terapêuticas para infecções ocasionadas por *P. aeruginosa***

Os beta-lactâmicos são os antimicrobianos de escolha mais utilizados para o tratamento de infecções bacterianas, devido à sua atividade de amplo espectro, à sua segurança, propriedades farmacocinéticas favoráveis e baixo custo (MEHTA; RICE; PALZKILL, 2015).

Os beta-lactâmicos que apresentam atividade contra *P. aeruginosa* são as penicilinas, ticarcilina e piperacilina, incluindo suas respectivas associações com inibidores de beta-lactamases, o ácido clavulânico e piperacilina+tazobactam; as cefalosporinas de amplo espectro ceftazidima, cefepime e cefoperazona; o monobactâmico aztreonam; e os carbapenêmicos imipenem, meropenem e doripenem (PAPPAS et al., 2009; GEORGIOS; MARIA, 2014).

Os carbapenêmicos, imipenem e meropenem, são antimicrobianos de amplo espectro escolhidos para o tratamento de infecções por MR-PS desde 1980 devido a sua alta afinidade com proteínas de ligação à penicilina (PBPs), estabilidade contra beta-lactamases de amplo espectro (ESBLs) e permeabilidade a membrana externa bacteriana (JUAN; OLIVER, 2010; SHEIKH et al., 2014; HONG et al., 2015).

Outras opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem aminoglicosídeos tais como gentamicina, tobramicina, netilmicina e amicacina; as fluoroquinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina, e as polimixinas (GEORGIOS; MARIA, 2014).

As fluoroquinolonas são agentes potentes para o tratamento de infecções por MR-PS. No entanto, vários isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos também apresentam resistência às fluoroquinolonas, e estão disseminando-se rapidamente (CHO et al., 2014).

Os aminoglicosídeos, apesar de serem ototóxicos e nefrotóxicos, possuem boa atividade contra *P. aeruginosa*, especialmente a amicacina. Esses agentes são, geralmente, clinicamente efetivos para o tratamento de infecções causadas por isolados resistentes aos beta-lactâmicos e são utilizados como último recurso antes das polimixinas (SATLIN; WALSH, 2017).

Para terapia de infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* XDR que apresentam resistência aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, são utilizados representantes da classe das polimixinas como a polimixina B e polimixina E (colistina), porém com a ressalva de serem neurotóxicos e nefrotóxicos (PETROLINI, 2013).

## **2.4 Elementos genéticos móveis e seu papel na resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* é considerada intrinsecamente resistente a muitos antimicrobianos devido a capacidade de codificar genes de resistência que estão localizados no cromossomo. Entretanto, a facilidade em adquirir elementos genéticos

móveis, como plasmídeos, integrons e transposons, contribui para multirresistência deste microrganismo (GEISINGER; ISBERG, 2017).

Plasmídeos são moléculas circulares de DNA que apresentam diversidade quanto ao tamanho e função, podendo carrear até 400 genes. Os plasmídeos existem independentemente do DNA cromossômico e se multiplicam de forma autônoma sendo possível a presença de várias cópias em uma célula bacteriana. Eles não participam de funções celulares básicas, como crescimento celular e multiplicação, porém carregam elementos genéticos que auxiliam as bactérias a sobreviver e crescer em condições ambientais desfavoráveis, como a presença de antimicrobianos. Os plasmídeos podem codificar enzimas que conferem resistência a diferentes substâncias antimicrobianas, como antimicrobianos, desinfetantes, metais pesados e até mesmo a radiação UV e são mobilizados por transferência horizontal (OLIVER et al., 2015).

Os plasmídeos podem carrear genes de resistência às fluoroquinolonas juntamente a genes codificadores de beta-lactamases (VAN HOEK et al., 2011). A ocorrência de plasmídeos está associada à natureza dos antimicrobianos e à fonte de isolamento da bactéria. Por exemplo, isolados resistentes aos beta-lactâmicos carregam plasmídeos com maior frequência do que isolados resistentes a outras classes de antimicrobianos. Do mesmo modo, os plasmídeos são, geralmente, de tamanho maior em isolados que apresentam resistência aos aminoglicosídeos. Além disso, genes de resistência a antimicrobianos associados a integrons foram identificados em vários surtos de infecções causadas por *P. aeruginosa* (SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2017).

Os transposons são outros elementos genéticos importantes para a transferência horizontal de resistência bacteriana e são comuns em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Seu tamanho pode variar de 1,5 quilobases (kb) até 26,6 kb, e podem integrar-se ao DNA do hospedeiro por meio da sua própria transposição, entre plasmídeos e o cromossomo bacteriano, uma vez que codificam uma transposase responsável pelo seu movimento. Possuem pequenos elementos chamados sequências de inserção (IS – *Insertion Sequence*) e sequências de repetição terminal que desempenham um papel no reconhecimento de proteínas como as transposases ou

recombinases as quais são necessárias para inserir ou remover um transposon de regiões específicas do genoma. (VAN HOEK et al., 2011).

Um integron é composto por genes cassetes que podem ser incluídos no DNA bacteriano e pode estar localizado em plasmídeos e cromossomo. São capazes de mobilizar genes de resistência e auxiliam a sua expressão por meio de promotores que estão presentes em sua região conservada. O integron normalmente codifica sua própria integrase (*int*) que facilita a inserção de genes cassetes em regiões de integração (*attI*) de cada integron. Os genes cassetes são pequenos segmentos de DNA circular compostos por um gene de resistência delimitado na extremidade 5' pelo local de ligação do ribossomo e a jusante por um elemento de 59-bases que é um local de recombinação comum para o gene (SACHA et al., 2008; OLIVER et al., 2015).

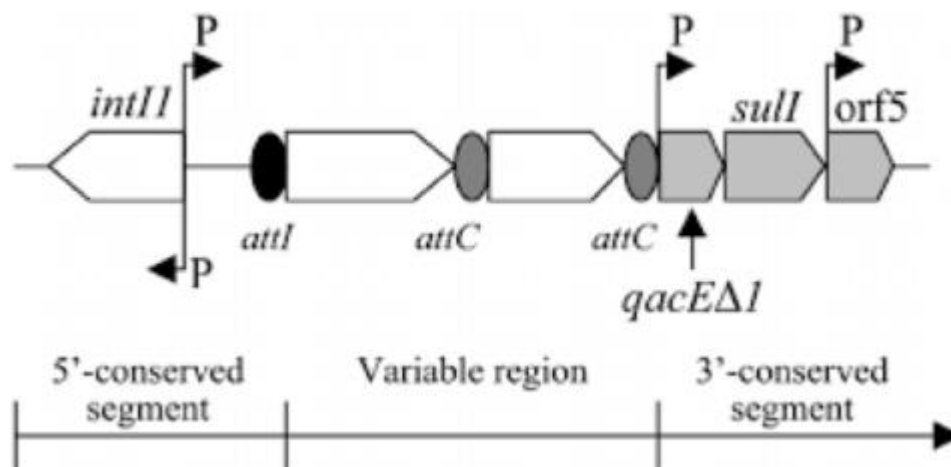


FIGURA 1. Estrutura geral de integrons de classe 1. Os genes cassetes são inseridos na região variável pela integrase usando um mecanismo de recombinação sítio-específico. Os locais *attI* e *attC* são mostrados por um oval preto e cinza, respectivamente, e os promotores são indicados por P. Os genes são os seguintes: *intI1*, gene da integrase; *qacE1*, gene de resistência a quaternários de amônia; *sull*, gene de resistência a sulfonamida; *orf5*, gene de função desconhecida. As pontas das setas indicam o sentido da transcrição.

Fonte: DROUIN; MÉLANÇON; ROY, 2002.

As enzimas ESBLs e carbapenemases são tipicamente codificadas em integrons de classe 1 juntamente com determinantes de resistência aos aminoglicosídeos. No entanto, os integrons são mobilizados somente quando estão associados a um elemento genético móvel específico, como um transposon, um plasmídeo conjugativo ou uma ilha genômica (OLIVER et al., 2015).

As ilhas genômicas em *P. aeruginosa* são elementos integrativos e conjugativos. Essas ilhas genômicas normalmente carregam genes para a capacidade metabólica, virulência, resistência a metais pesados, integração, transferência e manutenção de elementos integrativos e conjugativos conferindo-lhe auto-transferibilidade. Até o momento, 14 ilhas genômicas de *P. aeruginosa* foram identificadas (OLIVER et al., 2015; HONG et al., 2016).

## **2.5 Resistência aos beta-lactâmicos**

### **2.5.1. Beta-lactamases**

A resistência aos beta-lactâmicos é mediada por mecanismos intrínsecos como perda ou modificação de porinas, expressão de sistemas de efluxo e por enzimas que hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, tornando o antimicrobiano ineficaz (MEHTA, RICE E PALZKILL, 2015).

Os carbapenêmicos são considerados a última linha de terapia entre os beta-lactâmicos para infecções causadas por *P. aeruginosa*, pois são resistentes à ação da maioria das beta-lactamases de espectro limitado ou estendido. A resistência a esta subclasse de antimicrobianos é um desafio clínico e pode estar relacionado à produção de enzimas do tipo carbapenemases (RAMÍREZ et al., 2013).

Devido à diversidade estrutural e espectro de atividade das beta-lactamases, foi necessária a organização das mesmas em um sistema de classificação baseado na homologia da sequência primária de aminoácidos. Atualmente duas classificações são consideradas mais relevantes, a classificação de Ambler (classificação molecular baseada na sequência de aminoácidos) e a de Bush, Jacoby e Medeiros (classificação funcional baseada na especificidade de substrato e no perfil de

inibição enzimática). As Classes A, C e D de Ambler são beta-lactamases serino-dependentes, pois possuem um aminoácido serina no seu sítio ativo. As metalo-beta-lactamases (MBL) pertencem a classe B, necessitam de um íon metálico como cofator enzimático, e são classificadas no grupo funcional 3 (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH; JACOBY, 2010).

Os genes que codificam beta-lactamases podem estar localizados no cromossomo ou em elementos genéticos móveis. As enzimas codificadas por genes cromossomais geralmente são expressas constitutivamente, porém na resistência mediada por plasmídeos a expressão é induzível, na maioria das vezes, e as mutações nos genes plasmidiais originam variantes enzimáticas com diferente especificidade de substratos (SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2017).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* está associada a diferentes mecanismos que podem ser encontrados, em uma única cepa, isoladamente ou em combinação. São eles: alterações na permeabilidade da membrana externa pela perda ou diminuição da expressão de porinas, como a porina D (OprD); expressão induzível da beta-lactamase cromossomal AmpC; hiperexpressão de sistemas de efluxo (MexAB-OprM); e hidrólise do antimicrobiano por carbapenemases das classes A, B e D de Ambler (RAMÍREZ et al., 2013; AKHI et al., 2016).

O principal mecanismo de resistência adquirida aos carbapenêmicos é mediado pela produção de diferentes carbapenemases que são beta-lactamases capazes de hidrolisar praticamente todas as classes de beta-lactâmicos. As principais carbapenemases presentes em *P. aeruginosa* incluem: metalo-beta-lactamases (MBLs), variantes da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), oxacilinasas - *carbapenem-hydrolyzing Class D beta-lactamase* (CHDL) e variantes de GES-carbapenemase (*Guiana Extended Spectrum beta-lactamase*) (LIAKOPOULOS et al., 2013).

Os genes codificadores de carbapenemases estão, geralmente, localizados em elementos genéticos móveis como transposons e integrons, os quais, por sua vez, podem estar inseridos em plasmídeos conjugativos que facilitam a transferência horizontal dos mesmos e a disseminação da resistência (DE ARAÚJO JÁCOME et al., 2012; RAMÍREZ et al., 2013).

A cefalosporinase cromossomal (*AmpC*) é responsável por um baixo nível de resistência intrínseca aos beta-lactâmicos em *P. aeruginosa*. No entanto, a sua produção pode ser induzida pela exposição a estes antimicrobianos. A *AmpC* mediada por plasmídeo foi identificada pela primeira vez na década de 1980 em bactérias Gram-negativas, porém há poucos relatos de *AmpC* plasmidial em *P. aeruginosa*, o mais recente foi descrito em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* isolada na China (GEISINGER; ISBERG, 2017).

Os principais mecanismos intrínsecos que conduzem ao desenvolvimento da resistência às penicilinas anti-*Pseudomonas* (ticarcilina, piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepime) e monobactâmicos (aztreonam) ocorrem por mutações em genes de reciclagem de peptidoglicano (*ampD*, *dacB*, *ampR*) levando à hiperexpressão de *AmpC*, estando presente em mais de 20% dos isolados clínicos. A inativação, perda ou alteração mutacional da porina OprD, juntamente com a expressão induzível de *AmpC*, confere resistência ao imipenem, mas sensibilidade reduzida ao meropenem. A hiperexpressão de MexAB-OprM somada à inativação de OprD é um dos mecanismos mais relevantes de resistência clínica ao meropenem e imipenem, respectivamente (HONG et al., 2016).

As beta-lactamases de espectro limitado (LSBLs) conferem resistência às penicilinas, carbenicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração e são inibidas por inibidores de serino-beta-lactamases (ácido clavulânico e tazobactam). As LSBLs frequentemente detectadas em *P. aeruginosa* são TEM-1 (*Temoniera beta-lactamase*), TEM-2, TEM-90, TEM-110 e 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, porém algumas variantes podem apresentar atividade de ESBL (PHILIPPON et al., 2016).

As beta-lactamases do tipo TEM (*Temoneira*) são funcionalmente similares a SHV e foram identificadas pela primeira vez em *Escherichia coli*, mas as variantes de TEM (TEM-1, TEM-2, TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42, TEM-116) já foram detectadas em *P. aeruginosa* com diferentes capacidades enzimáticas (OLIVER et al., 2015).

As beta-lactamases que apresentam uma região variável de sulfidrilo (SHV), por isso chamadas de SHV, foram primeiramente derivadas do cromossomo de *Klebsiella* spp., mas logo incorporada em plasmídeos. Essas enzimas podem hidrolisar penicilinas de amplo espectro, como a ampicilina e a piperacilina, mas não as cefalosporinas (ceftazidima e cefotaxima). As variantes de SHV (SHV-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-5, SHV-12) foram isoladas em *P. aeruginosa* (OLIVER et al., 2015).

As enzimas CTX (cefotaximases) representam uma família de beta-lactamases, que não estão relacionadas aos tipos SHV ou TEM e que têm a capacidade de hidrolisar cefotaxima. Também foram derivadas de *Enterobacteriaceae* e disseminadas para outras bactérias por transferência horizontal de genes. As principais variantes encontradas em *P. aeruginosa* incluem CTX-M-1 (*Cefotaxime Munich*), CTX-M-2 e CTX-M-43 (OLIVER et al., 2015).

As ESBLs (*Extended Spectrum Beta-Lactamases*) são um grupo de enzimas que podem hidrolisar uma variedade de beta-lactâmicos incluindo cefalosporinas de quarta geração e são inibidas por inibidores de beta-lactamases, além de comprometer a eficácia dos demais com exceção das cefamicinas e carbapenêmicos. No mundo, as ESBLs são amplamente encontradas, sendo responsáveis por infecções graves (MUTHUPANDIAN; BALAJEE; BARABADI, 2017).

A primeira ESBL detectada em *P. aeruginosa* foi PER-1 (*Pseudomonas extended resistant*) em um isolado clínico em 1991 na França.

Atualmente, nove variantes desta enzima foram descritas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 20/02/2018), sendo somente a PER-1 e PER-2 detectadas em *P. aeruginosa*. Outras ESBLs, como as enzimas VEB-1 (*Vietnam Extended-Spectrum beta-lactamase*), GES (*Guiana extended spectrum*), BEL (*Belgium extended spectrum beta-lactamase*), e variantes de TEM e SHV, também já foram detectadas em *P. aeruginosa* conferindo a capacidade de gerar um alto nível de resistência aos beta-lactâmicos e estão descritas na tabela 1.

As carbapenemases atualmente encontradas em *P. aeruginosa* pertencentes à classe A de Ambler, tais como as enzimas GES e KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas de forma mais eficiente do que os carbapenêmicos e são inibidas pelos clavulanato, exceto para

algumas variantes, tais como KPC-2. As variantes encontradas em *P. aeruginosa* estão descritas na tabela 1 (SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2017).

Tabela 1. Variantes de beta-lactamases da classe A de Ambler descritas em *P. aeruginosa*.

| Espectro de ação<br>das beta-<br>lactamases da<br>classe A | Características  | Variantes  |
|--|--|--|
| Beta-lactamases de espectro limitado                       | Confere resistência às penicilinas, carbenicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração e são inibidas por inibidores de serino-beta-lactamases (ácido clavulânico e tazobactam) | TEM-1; TEM-2; TEM-90; TEM-110; SHV-1; PSE-1; PSE-4; CARB-3; CARB-4; AER-1;   |
| Beta-lactamases de espectro estendido                      | Confere resistência às penicilinas, cefalosporinas (1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> e 4 <sup>a</sup> geração) e aztreonam e podem ser sensíveis aos inibidores de serino-beta-lactamases   | PER-1; PER-2; TEM-4; TEM-21; TEM-24; TEM-42; TEM-92; TEM-116; SHV-2a; SHV-5; SHV-12; VEB-1; VEB-2; VEB-3; GES-1; GES-8; GES-9; GES-13; CTX-M-1; CTX-M-2; CTX-M-3; CTX-M-14; CTX-M-15; CTX-M-43; PME-1; BEL-1; BEL-2; BEL-3; GES-1; GES-8; GES-9; GES-13; GES-24; |
| Carbapenemases   | Confere resistência às penicilinas, aztreonam, cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam   | GES-2; GES-5; GES-6; GES-13; GES-18; KPC-2; KPC-5;   |

Fonte: POTRON et al., 2015; OLIVER et al., 2015; PHILLIPPON et al., 2016.

Os genes que codificam as metalo-beta-lactamases são mediados por plasmídeos, podendo ser integrados ao cromossomo. A primeira metalo-beta-lactamase descrita em *P. aeruginosa*, uma imipenemase (IMP-1), foi detectada no Japão e desde então a incidência tem aumentado mundialmente. Outras metalo-beta-lactamases que podem estar associadas a elementos genéticos móveis incluem VIM e GIM e também foram detectados em *P. aeruginosa* com taxas de prevalência que estão aumentando gradualmente (SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2017).

### 2.5.2. *Guiana Extended-Spectrum (GES)*

A enzima GES é uma beta-lactamase da classe A, que vem sendo detectada, na última década, de forma alarmante, em patógenos multirresistentes. As beta-lactamases do tipo GES foram inicialmente classificadas como ESBLs por possuírem amplo espectro de ação, que incluíam a hidrólise de aztreonam, penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro. No entanto, a atividade de carbapenemase foi observada em algumas variantes cujos genes codificadores sofreram mutações pontuais que resultaram em modificações em seu espectro de hidrólise (TAVAJJOHI; MONIRI; ZARRABI, 2013; CUZON et al., 2016).

O gene *bla<sub>GES</sub>* está, em geral, localizado em genes cassetes associados a um integron de classe 1 ou da classe 3 os quais estão presentes em plasmídeos. (PETROLINI, 2013).

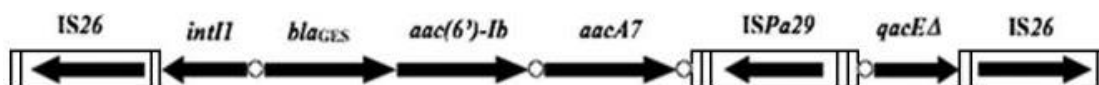


FIGURA 2. Representação esquemática do contexto genético dos genes codificadores de beta-lactamases do tipo GES, identificados em isolados de *P. aeruginosa*. As regiões codificantes dos genes estão representados por setas indicando sua orientação de transcrição e as 59-bases comum do integron que representam o local de recombinação são indicadas como círculos brancos.

Fonte: PICÃO et al., 2009.

Atualmente foram descritas trinta e uma enzimas pertencentes ao grupo GES (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 20/02/2018). Dentre as variantes da enzima GES com atividade de ESBL descritas em *P. aeruginosa* estão: GES-1 detectada na França, Brasil e Argentina; GES-8 e GES-13 reportadas na Grécia; GES-9 relatada na França; e GES-24 descrita na Coreia. As enzimas variantes com atividade de carbapenemase descritas em *P. aeruginosa* são: GES-2 isolada na África do Sul; GES-5 isolada na China, África do Sul, Brasil, Turquia, Índia, México, Espanha e Japão; GES-6 isolada em Portugal; GES-13 isolada na Grécia e Canadá e GES-18 isolada na Bélgica (PETROLINI, 2013; CUZON et al., 2016; NAAS; DORTET; IORGA, 2016).

### **1.5.3. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)**

As enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) são carbapenemases pertencentes à classe A de Ambler e ao subgrupo 2f de Bush, Jacoby e Medeiros. Estas enzimas são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam e possuem a habilidade de hidrolisar uma grande variedade de beta-lactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e inclusive, os carbapenêmicos, porém a KPC-2 tem pouca atividade sobre as cefamicinas e a ceftazidima. Foi encontrada pela primeira vez em *K. pneumoniae* isolada na Carolina do Norte em 2001 e desde então rapidamente se disseminou em todo o mundo (GEORGIOS; MARIA, 2014).

A KPC-2, identificada em isolados de *P. aeruginosa* no Brasil, possui um importante papel na resistência aos antimicrobianos, visto a facilidade de transferência do seu determinante de resistência no ambiente hospitalar por meio de elementos genéticos móveis (DE ARAÚJO, JÁCOME et al., 2012).

A presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi reportado em várias espécies de *Enterobacteriaceae*, além de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., tornando-se global a disseminação de isolados produtores de KPC em poucos anos e causando surtos de infecções hospitalares em diferentes localizações (MARTINS, 2010; NAAS; DORTET; IORGA, 2016).

Os genes codificadores das variantes da enzima KPC possuem alto potencial de disseminação devido à sua localização em plasmídeos sendo mais frequentemente detectados em *K. pneumoniae*. O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi encontrado associado a plasmídeos transferíveis de diferentes tamanhos e estruturas contendo o transposon Tn4401, da família Tn3. Este elemento é capaz de fazer transposição em alta frequência e pode ser o responsável por sua rápida disseminação, dificultando o controle de epidemias, tornando o tratamento destas infecções extremamente difícil e elevando as taxas de mortalidade (NAAS; DORTET; IORGA, 2016).

Em *P. aeruginosa*, o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* pode estar localizado no cromossomo ou em plasmídeos e pode estar associado a diferentes estruturas genéticas e isoformas derivadas de Tn4401. Nos isolados de *P. aeruginosa* da Colômbia, o gene *bla<sub>KPC</sub>* estava inserido em uma isoforma truncada de Tn4401. Os plasmídeos que abrigam o gene *bla<sub>KPC</sub>* podem conter ainda genes codificadores de ESBL (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*). (GIRLICH et al., 2017).



FIGURA 3. Representação esquemática do transposon Tn4401a associado ao gene *bla<sub>KPC-2</sub>*. Este transposon apresenta um gene da transposase (*tnpA*), um gene de resolvase (*tnpR*), bem como as sequências de inserção *ISKpn6* e *ISKpn7*.

Fonte: CUZON et al., 2010.

Atualmente vinte e quatro variantes enzimáticas de KPC são conhecidas, as quais apresentam diferença de uma ou duas substituições de aminoácidos e possuem baixo grau de diversidade (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 19/02/2018). Inicialmente acreditava-se que havia distinção, quanto a sequência de nucleotídeos, entre as enzimas KPC-1 e KPC-2, porém após estudos as duas passaram a ser consideradas KPC-2. A enzima KPC-2 foi detectada em isolados de *P. aeruginosa* na Colômbia, Porto Rico, Trinidad e Tobago, Estados Unidos, China, Brasil e Argentina, e

a variante KPC-5 em Porto Rico (VILLEGAS et al., 2007; WOLTER et al., 2009a; AKPAKA et al., 2009; POIREL et al., 2010a; GE et al., 2011; DE ARAÚJO JÁCOME et al., 2012; RAMÍREZ et al., 2013; WOLTER et al., 2009b).

#### **1.5.4. Metallo-beta-lactamases (MBL)**

As metallo-beta-lactamases são as carbapenemases mais comumente descritas em *P. aeruginosa*. São capazes de hidrolisar a maioria dos membros da classe de beta-lactâmicos incluindo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e inibidores de beta-lactamases com exceção dos monobactâmicos. Estas são produzidas pelas bactérias como enzimas extracelulares ou periplasmáticas e requerem um cátion bivalente, geralmente o zinco ( $Zn^{2+}$ ), como cofator metálico para a atividade hidrolítica; são resistentes à ação dos inibidores das serino-beta-lactamases, porém são inibidas por quelantes de metal como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), derivados do tiol e ácido dipicolínico. As MBLs podem ser codificadas tanto por genes cromossomais como genes adquiridos pela transferência de elementos móveis (GEORGIOS; MARIA, 2014).

O grupo das MBLs é representado por diferentes classes de enzimas, como: IMP (*imipenemase metallo-beta-lactamase*) com 58 variantes; VIM (*Verona integron - encoded metallo-beta-lactamase*) com 51 variantes; SPM-1 (*São Paulo metallo-beta-lactmase*), GIM (*German imipenemase metallo-beta-lactamase*) com duas variantes; SIM-1 (*Seoul imipenemase metallo-beta-lactamase*), NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) com 16 variantes, AIM-1 (*Adelaide imipenemase metallo-beta-lactamase*), KHM-1 (*Kyorin Health Science metallo-beta-lactamase*), DIM-1 (*Dutch Imipenemase metallo-beta-lactamase*), SMB-1 (*Serratia metallo-beta-lactamase*), TMB (*Tripoli metallo-beta-lactamase*) com 2 variantes, FIM-1 (*Florence imipenemase metallo-beta-lactamase*) e, mais recentemente a BKC-1 (*Brazilian Klebsiella carbapenemase*) (OSANO et al., 1994; LAURETTI et al., 1999; TOLEMAN et al., 2002; CASTANHEIRA et al., 2004; LEE et al., 2005; YONG et al., 2009; YONG et al., 2012; SEKIGUCHI et al., 2008; POIREL et al., 2010b; WACHINO et al., 2011; EL SALABI et al., 2012; POLLINI et al., 2013; NICOLETTI et al., 2015).

As MBLs têm sido descritas em diversas espécies bacterianas de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Em *Pseudomonas* spp. já foram descritas mundialmente as MBLs das classes IMP, VIM, SPM, GIM, AIM e FIM. As variantes de IMP e VIM foram descritas em *P. aeruginosa* na Europa, África, Ásia, América do Norte e América do Sul. A MBL SPM-1 foi descrita no Brasil, Suíça e Reino Unido (EL SALABI et al., 2010; HOPKINS et al., 2016), a GIM-1 apenas na Alemanha, a AIM-1 na Austrália e a FIM-1 apenas na Itália. Já a NDM foi relatada em países da Europa, África e no Brasil. Entretanto, as MBLs de maior destaque e que são relatadas mundialmente contribuindo para os estudos epidemiológicos e clínicos são as enzimas das classes IMP, VIM, SPM e NDM (CAMPANA, 2013; RIOS; DE ALMEIDA, 2014; SHEIKH et al., 2014; HONG et al., 2015, POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

Tabela 2. Variantes de metalo-beta-lactamases da classe B de Ambler descritas em *P. aeruginosa*.

| <b>MBL</b> | <b>Variantes</b>   |
|------------|--|
| IMP        | IMP-1; IMP-2; IMP-4; IMP-5; IMP-6; IMP-7; IMP-9; IMP-10;<br>IMP-11; IMP-13; IMP-14; IMP-15; IMP-16; IMP-18; IMP-19;<br>IMP-20; IMP-21; IMP-22; IMP-25; IMP-26; IMP-29; IMP-30;<br>IMP-31; IMP-33; IMP-35; IMP-37; IMP-40; IMP-41; IMP-43;<br>IMP-44; IMP-45; IMP-48; |
| VIM        | VIM-1; VIM-2; VIM-3; VIM-4; VIM-5; VIM-6; VIM-7; VIM-8; VIM-9;<br>VIM-10; VIM-11; VIM-13; VIM-14; VIM-15; VIM-16; VIM-17;<br>VIM-18; VIM-20; VIM-28; VIM-30; VIM-36; VIM-37; VIM-38;   |
| NDM        | NDM-1  |
| SPM        | SPM-1  |
| GIM        | GIM-1  |
| FIM        | FIM-1  |
| AIM        | AIM-1  |

Fonte: POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; OLIVER et al., 2015; PHILLIPPON et al., 2016;

No Brasil, diferentes variantes foram descritas em isolados de *P. aeruginosa*: IMP-1, IMP-16, IMP-18, VIM-1, VIM-2 e VIM-7, porém isolados produtores de SPM-1 são os mais frequentes devido à disseminação de um clone (denominado ST277) no território brasileiro (CASTANHEIRA et al., 2007; RIZEK et al., 2014; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; DE PAULA et al., 2017).

A maioria dos genes que codificam as MBLs, como por exemplo, os genes *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*, estão na forma de genes cassetes, em uma diversidade de integrons, tornando a disseminação da resistência facilitada quando estes se integram em transposons ou plasmídeos conjugativos. Os genes cassetes, geralmente, estão inseridos em integrons de classe 1 ou classe 3, que também pode carrear outros genes de resistência a antimicrobianos e compostos derivados de quaternário de amônia e sulfonamidas (SACHA et al., 2008).

De acordo com Poirel e colaboradores (2004) o gene *bla<sub>SPM</sub>*, que codifica a enzima SPM-1, localiza-se no cromossomo e está integrado em um elemento genético móvel denominado *ISCR4* (*Insertion Sequences Common Regions*), composto por regiões comuns que contém recombinases e sequências promotoras responsáveis pela mobilização e expressão deste gene. Os elementos *ISCR* podem estar associados a integrons e mobilizar diferentes genes de MBL e são frequentemente descritos em *P. aeruginosa* produtoras destas enzimas (TOLEMAN et al., 2006). Porém como o gene *bla<sub>SPM-1</sub>* está localizado no cromossomo do clone brasileiro de *P. aeruginosa*, sua transferência para outro gênero bacteriano não foi relatada até o momento. Este fato pode ser explicado também por um achado recente que revelou que o gene *bla<sub>SPM</sub>* está localizado em uma ilha genômica integrada ao cromossomo de *P. aeruginosa*. Isto pode limitar a disseminação rápida quando comparado às demais variantes de MBL localizadas em plasmídeos e estar frequentemente relacionada a um ST específico - ST277, o que demonstra a estabilidade deste gene (KALLUF et al., 2017). Estudos recentes, relatam que o gene *bla<sub>SPM-1</sub>* estava localizado dentro de um transposon (Tn4371) integrativo e conjugativo em isolados de *P. aeruginosa* (HOPKINS et al., 2016).

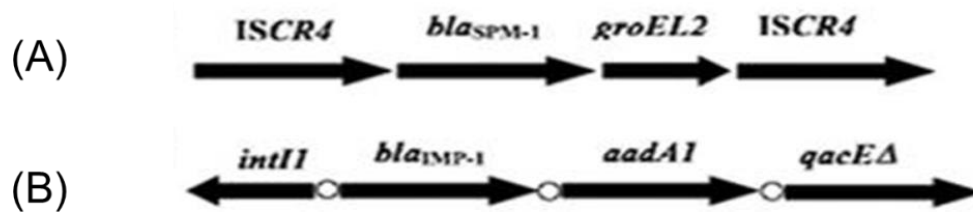


FIGURA 4. Representação esquemática do contexto genético dos genes codificadores de MBL SPM-1 e IMP-1 identificados em isolados de *P. aeruginosa*. As regiões codificantes estão representadas por setas indicando suas orientações de transcrição. (A) Ambiente genético do gene *bla*<sub>SPM-1</sub>. (B) Ambiente genético do gene *bla*<sub>IMP-1</sub>.

Fonte: PICÃO et al., 2009.

### 1.5.5. Oxacilinas (OXA)

As oxacilinas pertencem a classe molecular D de Ambler, e ao grupo funcional 2, subgrupo 2d da classificação de Bush. São enzimas que hidrolisam as oxacilinas, oxi-imino-cefalosporinas e carbapenêmicos. De acordo com a sequência de aminoácidos, as oxacilinas de espectro limitado e seus mutantes de espectro ampliado são divididos em subgrupos. As enzimas do subgrupo OXA-2de são de amplo espectro e hidrolisam a cloxacilina e oxacilina, incluindo oximino-beta-lactâmicos, mas não hidrolisam carbapenêmicos. Inativam a cloxacilina e oxacilina fracamente e são pouco inibidas pelo ácido clavulânico. As beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) do tipo OXA são estruturalmente semelhantes e já foram encontradas em plasmídeos, transposons e/ou integrons de bactérias Gram-negativas. O subgrupo OXA-2df tem atividade de carbapenemase - *Carbapenem-Hydrolyzing Class D beta-lactamase* (CHDL) e geralmente os genes codificadores destas enzimas estão localizados no cromossomo, porém já foram descritas em plasmídeos de *Enterobacteriaceae* (POIREL et al., 2004). Todas as OXA beta-lactamases são ativas contra amino e carboxipenicilinas (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH; JACOBY, 2010; OPAZO et al., 2011).

Embora tenham sido reportadas em outros bacilos Gram-negativos, elas ocorrem predominantemente em *P. aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter*. As

variantes de OXA-2 e OXA-10 são tipicamente descritas em *P. aeruginosa*. A atividade carbapenemase exibida pelas oxacilinasas é consideravelmente mais fraca comparada à atividade hidrolítica das MBLs, e isolados que exibem as oxacilinasas requerem mecanismos adicionais de resistência para causar um aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos carbapenêmicos. Grupos distintos de oxacilinasas têm sido descritos em *P. aeruginosa* como mostrado na tabela 2 (ZHAO; HU, 2010; POIREL et al., 2010c; ANTUNES; FISHER, 2014; POTRON et al., 2015):

Tabela 3. Variantes de oxacilinasas descritas em *P. aeruginosa*.

| <b>Espectro de ação das oxacilinasas</b>                    | <b>Variantes</b>  |
|---|---|
| Oxacilinasas de espectro limitado                           | OXA-3; OXA-4; OXA-5; OXA-6; OXA-10; OXA-13; OXA-20; OXA-21; OXA-30; OXA-46; OXA-50; OXA-56; OXA-198;  |
| Oxacilinasas de espectro estendido                          | OXA-1; OXA-2; OXA-11; OXA-14; OXA-15; OXA-16; OXA-17; OXA-18; OXA-19; OXA-28; OXA-31; OXA-32; OXA-34; OXA-35; OXA-36; OXA-45; OXA-56; OXA-128; OXA-129; OXA-141; OXA-142; OXA-145; OXA-147; OXA-161; OXA-183; OXA-210; OXA-240 e OXA-251; |
| <i>Carbapenem-hydrolyzing Class D beta-lactamase (CHDL)</i> | OXA-40; OXA-198; OXA-181;   |
| Oxacilinase de espectro indeterminado                       | OXA-74 e OXA-224  |

Fonte: ZHAO; HU, 2010; POIREL et al., 2010c; ANTUNES; FISHER, 2014; POTRON et al., 2015.

Atualmente sabe-se que a enzima OXA-50 de espectro limitado é uma oxacilinase intrínseca em *P. aeruginosa*, e as CHDL OXA-40 e OXA-198 são as únicas descritas em *P. aeruginosa*. A enzima OXA-48 considerada uma CHDL emergente em

enterobactérias ainda não foi descrita em *P. aeruginosa*. Porém já houve o primeiro relato de resistência a carbapenêmicos mediada pelo gene *bla<sub>OXA-181</sub>* em um isolado de *P. aeruginosa* (MEUNIER et al., 2016).

## 1.6. Resistência às Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são antimicrobianos sintéticos de amplo espectro, utilizados para o tratamento de infecções bacterianas. Possui atividade bactericida, devido a inibição da DNA girase e da topoisomerase IV. Estudos anteriores, mostram que os pacientes infectados com isolados de *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas apresentaram uma doença mais prolongada e uma taxa de mortalidade três vezes maior do que os infectados com isolados sensíveis. O ciprofloxacina é a quinolona mais eficaz contra *P. aeruginosa*, porém um alto nível de resistência foi relatado em certas regiões do mundo (SULLIVAN et al., 2014).

Devido a sua origem sintética, pressupõe-se que a resistência não evoluiria e não seria transmissível, porém, devido ao seu uso extensivo, isolados resistentes são relatados em todo o mundo. A resistência a fluoroquinolonas se dá por três mecanismos diferentes: mutações que alteram os alvos do fármaco (DNA girase e topoisomerase IV), mudanças que reduzem a permeabilidade da membrana e produção de proteínas que protegem o alvo da ação do antimicrobiano (OLIVER et al., 2015).

O mecanismo de resistência às fluoroquinolonas mais comum em bactérias Gram-negativas é cromossomal e ocorre por meio de mutações no DNA envolvendo substituições pontuais nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, conferindo níveis de resistência, que podem estar diretamente associados ao aumento no número de substituições presentes nos genes alvo (HORII; MURAMATSU; IINUMA, 2007; CHO et al., 2014).

Os mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos, geralmente conferem baixos níveis de resistência e incluem: expressão de sistemas de efluxo *qepA* e *oqxAB*; produção da acetiltransferase-modificada *aac(6')-Ib-cr*, que até então era comum conferir resistência a aminoglicosídeos, mas que devido a duas mutações no gene *aac(6')-Ib* adquiriu a habilidade de acetilar o ciprofloxacina; e a

produção da proteína de resistência a quinolona (Qnr - *Quinolone resistance*) que impede a interação da quinolona com o complexo DNA/DNA girase durante a replicação do DNA (CHO et al., 2014).

O sistema de efluxo QepA tem uma semelhança estrutural significativa com as subunidades transmembrana dos sistemas MFS (*Major Facilitator Superfamily*) e leva à diminuição da sensibilidade da parte hidrofílica da fluoroquinolona. E o sistema OqxAB, que é expresso a partir de dois genes *oqxA* e *oqxB*, pertence ao grupo de sistemas RND (*Resistance Nodulation Division*), conferindo resistência não só às fluoroquinolonas, mas também a outros antimicrobianos (KULKOVÁ et al., 2014).

As proteínas Qnr são proteínas compostas por pentapeptídeos que podem se ligar à DNA girase e topoisomerase IV e protegê-las da ação das fluoroquinolonas. O primeiro gene de resistência à quinolona mediado por plasmídeo (*qnr*) foi detectado em 1998 em um isolado clínico de *K. pneumoniae*. Estes genes estão relacionados com baixos níveis de resistência à quinolona, mas facilitam a seleção de isolados resistentes que apresentam níveis altos. Atualmente seis famílias com algumas variantes de genes codificadores de Qnr foram relatadas em bactérias Gram-negativas: *qnrA* (*qnrA1 a qnrA8*), *qnrB* (*qnrB1 a qnrB89*) *qnrC*, *qnrD* (*qnrD1 a qnrD2*), *qnrS* (*qnrS1 a qnrS9*) e *qnrVc* (*qnrA1 a qnrA7*). Esses genes estão localizados em plasmídeos de Gram-negativos, com exceção do gene *qnrVC* que em *Vibrio cholerae* foi descrito no cromossomo (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998; JACOBY et al., 2006).

Em 2007 foi relatado o primeiro caso de um determinante *qnr* em uma espécie de *Pseudomonas*, um isolado de *P. fluorescens* recuperado da água do aquário de uma tartaruga em um zoológico no Japão carreando o determinante *qnrB* que apresentou resistência ao ácido nalidíxico e sulfametoxazol+trimetoprim (AHMED et al., 2007). Também foi detectado os determinantes *qnrA* e *qnrB* localizados em um mesmo plasmídeo em dois isolados de *P. putida*, recuperados de camarões congelados nos EUA que foram importados da Índia, mostrando-se não sensíveis ao ácido nalidíxico e ciprofloxacina (TRAN et al., 2007). No geral, as taxas globais de resistência às fluoroquinolonas variam geograficamente, mas são superiores a 30-40% em muitos países (HONG et al., 2016).

## 1.7. Resistência aos Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos (AGA) são antimicrobianos quimicamente estáveis de amplo espectro contra bactérias. Possui efeito sinérgico com outros antibacterianos, como beta-lactâmicos, e geralmente são bactericidas contra a maioria das bactérias Gram-negativas. O principal mecanismo de ação se dá pela sua ligação ao RNA ribossômico (rRNA) 16S da subunidade 30S de ribossomos bacterianos e interferindo, assim, em diversos aspectos da síntese proteica. Após a ligação ao sítio de ação, o rRNA sofre uma mudança conformacional que leva à leitura errada do RNA mensageiro, resultando no não alongamento da cadeia peptídica, formando proteínas defeituosas. Essas proteínas são inseridas e se acumulam na membrana celular alterando a permeabilidade e permitindo assim que a concentração intracelular de AGA aumente. Os AGA também se ligam ao componente 23S rRNA da subunidade 50S afetando a mobilidade das subunidades ribossômicas, o que interfere na tradução e reciclagem de ribossomos (TAKAHASHI; IGARASHI, 2017).

Apesar da alta toxicidade para células eucarióticas, os aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomicina e tobramicina) foram utilizados por muitos anos no tratamento de infecções por *Pseudomonas*. A resistência aos aminoglicosídeos começou a se manifestar na década de 1960 e, atualmente, em *P. aeruginosa* é comum e é relatada em todo o mundo (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016).

A resistência aos aminoglicosídeos em *P. aeruginosa* pode ser devido a uma combinação de fatores como: diminuição da permeabilidade celular, hiperexpressão de sistemas de efluxo, alterações nos ribossomos, modificação de destino do fármaco por mutação e mutações pontuais de rRNA. Entretanto, os mecanismos mais importantes para este microrganismo são por alteração enzimática dos grupos químicos ativos nos antimicrobianos por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME) e modificação do sítio ativo por 16S rRNA metiltransferases (16S RMTases). As AMEs são adquiridas por meio de plasmídeos e podem modificar grupos amino e glicosídeos específicos da molécula que são vitais para a atividade do antimicrobiano. A semelhança funcional sugere que esses genes de resistência

originaram de organismos que os codificam intrinsicamente e estão frequentemente presentes em plasmídeos e/ou elementos genéticos móveis (OLIVER et al., 2015, DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016).

De acordo com os tipos de reações e os grupos funcionais alvos, as enzimas foram divididas em: aminoglicosídeo fosforiltransferase (APH), aminoglicosídeo nucleotidiltransferase (ANT) e aminoglicosídeo acetiltransferase (AAC). Variantes dessas proteínas estão relacionadas a diferentes perfis de resistência. Assim, cada classe é categorizada em diferentes tipos e é designada por números e letras romanas. Por exemplo, AAC(6') age por acetilação do grupo 6' amino dos aminoglicosídeos. Os símbolos *I*, *II*, *III*, denotam um perfil de resistência particular e *a*, *b*, *c*, denotam designações de proteínas únicas. Assim, AAC(3)-Ia e AAC(3)-Ib têm o mesmo perfil de resistência, mas variam em sua composição de aminoácidos (KRAUSE et al., 2016).

As aminoglicosídeos acetiltransferases das famílias AAC(3') (gentamicina) e AAC(6') (tobramicina/amicacina) e a nucleotidiltransferase ANT(2')-I (gentamicina e tobramicina) são as mais frequentemente detectadas em *P. aeruginosa*. Contudo, as 16S RMTases adquiridas horizontalmente, Rmt e Arm, que conferem resistência a todos os aminoglicosídeos clinicamente disponíveis, também são uma importante ameaça. Novas variantes destas enzimas foram detectadas em elementos genéticos móveis de *P. aeruginosa*. O gene *aac(3')* já foi localizado em um transposon no cromossomo de *P. aeruginosa*, e associado a um integron, juntamente com outros genes que codificam beta-lactamases (OLIVER et al., 2015, DHAR et al., 2017).

Os relatos de bactérias Gram-negativas produzindo 16S rRNA metiltransferase (16S RMTase) têm aumentado nos últimos anos. Essas enzimas conferem altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos e até o momento, onze tipos de 16S RMTases (ArmA, RmtA-RmtH e NpmA) foram relatados. Em *P. aeruginosa* já foram descritas as enzimas RmtA no Japão, RmtB no Nepal, RmtC na Índia, RmtD em amostras clínicas e ambientais no Brasil, RmtF na Índia e ArmA na Coreia e Irã (YOKOYAMA et al., 2003; DOI et al., 2007; CASTANHEIRA et al., 2008; GURUNG et al., 2010; RAHMAN et al., 2015; TADA et al., 2017; SHARIATI et al., 2018.).

## 1.8. Resistência às Polimixinas

As polimixinas foram descobertas na década de 1950 e foram muito utilizadas até a década de 1970 quando o uso clínico diminuiu, devido a administração intravenosa que resultou em numerosos casos de nefrotoxicidade. Atualmente, o uso clínico de polimixinas é frequente para o tratamento das infecções causadas por isolados de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos. A taxa atual de resistência às polimixinas (polimixina B e colistina) é baixa, no entanto, a resistência surge devido ao uso frequente desses antimicrobianos como o último recurso para o tratamento das infecções causadas por bactérias MR/XDR (VELKOV et al., 2017).

As polimixinas de uso clínico, polimixina B e colistina (polimixina E), são peptídeos de carga positiva que se ligam ao LPS bacteriano. Isto provoca uma interação eletrostática entre a carga positiva do antimicrobiano e dos grupos fosfato do lipídeo A, levando ao deslocamento de cátions bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ), que são responsáveis por manter a estabilidade da membrana celular. Este processo altera a estrutura e a permeabilidade da parede celular, permitindo a entrada do antimicrobiano que causa a lise e morte celular (BIALVAEI; SAMADI; KAFIL, 2015).

A resistência às polimixinas resulta, mais frequentemente, da modificação do lipopolisacarídeo (LPS) causada pela adição de uma porção 4-amino-4-desoxi-l-arabinose à parte hidrofóbica do grupamento fosfato do lipídeo A, que resulta na redução da carga negativa diminuindo a atração do fármaco a esta estrutura. As mutações subjacentes são frequentemente monitoradas para os reguladores de dois componentes PmrAB ou PhoPQ, que levam à ativação do operon *arnBCADTEF* devido a uma proteína sensora quinase. Esta por estímulos ambientais, como o desequilíbrio hidroeletrólítico do meio, sofre autofosforilação, conduzindo a ativação de uma segunda proteína citoplasmática responsável por regular a expressão dos genes que levam a produção da arabinose. Estudos mais recentes revelaram que mutações no regulador de dois componentes da ParRS, além de conferir resistência à colistina devido à ativação do operon *arnBCADTEF*, levam a um perfil de MR causado pela super-expressão de MexXY e pela repressão de OprD. Dois reguladores adicionais de dois

componentes, ColRS e CprRS também mostraram desempenhar um papel na resistência à polimixina. Os reguladores ParRs e CprRS diferem dos demais por serem dependentes da presença do antimicrobiano para sua ativação (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; OLIVER et al., 2015; BIALVAEI; SAMADI; KAFIL, 2015).

A resistência adquirida às polimixinas é rara e foi primeiramente descrita em 2015 na China. O gene *mcr* (*plasmid-mediated colistin resistance*) mediado por plasmídeo é responsável por conferir essa resistência. Após 2015, as pesquisas se intensificaram e foi visto que a presença deste gene é comum em isolados de *E. coli* de origem veterinária, e algumas variantes *mcr-1* (*mcr-1.2*), *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* já foram relatadas. Este gene produz uma proteína que possui similaridade com a fosfoetanolamina transferase, uma enzima que catalisa a adição da fosfoetanolamina no lipídeo A, e leva a diminuição da afinidade da colistina ao LPS. Estudos revelam que este gene se encontra em plasmídeos conjugativos passíveis de transferências para outros gêneros bacterianos (LIU et al., 2016; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017).

### **1.9. Resistência aos antimicrobianos no ambiente**

O aumento da resistência bacteriana está difundido em todo o mundo, como consequência do processo seletivo de microrganismos seguido do uso incorreto de antimicrobianos. A seleção de cepas resistentes aos antimicrobianos no meio ambiente, nos hospitais, indústrias, e nas atividades veterinárias, onde grandes quantidades de antimicrobianos são utilizados, resultam na aumentada detecção de genes de resistência a estes fármacos. As reservas naturais desses genes como o ambiente e efluentes são meios que contribuem para o surgimento de patógenos multirresistentes resultantes da transferência lateral de genes, e os esgotos hospitalares são considerados “hot spots” para a disseminação de resistência aos antimicrobianos (O'BRIEN, 2002; KUMMERER, 2009; BOUKI et al, 2013).

A propagação de microrganismos multirresistentes, principalmente bacilos gram-negativos como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli* no meio ambiente originou um problema de

saúde pública devido ao aumento das taxas de infecção hospitalar e comunitária com consequente elevação das taxas de morbidade e mortalidade (RESENDE, 2009).

No Brasil 58.4% (5.751) dos distritos municipais não têm rede coletora de esgoto, sendo a maior parte lançada nos cursos d'água, principalmente nos rios (SANTOS, 2010).

Um grande número de isolados de *P. aeruginosa* resistente são continuamente liberados em bacias de águas naturais através de esgoto. Nos corpos de água afetados, a resistência é adquirida através do contato com isolados resistentes de *P. aeruginosa* derivados de esgoto, que retêm a sua resistência, quer sob o impacto prolongado de antimicrobianos, independentemente das suas concentrações no corpo de água, ou mesmo na ausência. A transferência horizontal de genes desempenha um importante papel na disseminação da resistência entre os isolados de *P. aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas. Estudos indicaram a presença de determinantes genéticos como ESBL e MBL em ambientes aquáticos, como rios, água do mar, água doce, águas residuais, água potável e sistemas de distribuição. A presença de bactérias carreadoras de genes que promovem a resistência a antimicrobianos em rios e águas superficiais tem sido documentada em diferentes países como China, Brasil e África do Sul nas últimas décadas (YOUNG, 1993; FUENTEFRÍA et al., 2008; CHAGAS et al., 2011; ZHANG et al., 2012; MAO et al., 2015; MIRANDA et al., 2015; ODJADJARE et al., 2015).

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde** (2017). Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Plano+Nacional+para+a+Preven%C3%A7%C3%A3o+e+o+Controle+da+Resist%C3%Aancia+Microbiana+nos+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde/9d9f63f3-592b-4fe1-8ff2-e035fcc0f31d>

AHMED, A. M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y., E Shimamoto, T. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6686-6690, 2007.

ALIPOUR, N., Karagoz, A., Taner, A., Gaeini, N., Alipour, N., Zeytin, H., Durmaz, R. Outbreak of Hospital Infection from Biofilm-embedded Pan Drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Due to a Contaminated Bronchoscope. **Tap chi y hoc du phong= Journal of preventive medicine**, v. 2, n. 2, 2017.

AKHI, M. T., Khalili, Y., Ghottaslou, R., Kafil, H. S., Yousefi, S., Nagili, B., e Goli, H. R. Carbapenem inactivation: a very affordable and highly specific method for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared with other methods. **Journal of chemotherapy (Florence, Italy)**, v. 9478, n. July, p. 1–6, 2016.

AKPAKA, P. E., Swanston, W. H., Ihemere, H. N., Correa, A., Torres, J. A., Tafur, J. D., e Villegas, M. V. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2670-2671, 2009.

AMBLER, R. P. The Structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

ANTUNES, N. T., Fisher, J. F. Acquired class D  $\beta$ -lactamases. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 398-434, 2014.

BIALVAEI, A. Z., E Samadi Kafil, H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. **Current medical research and opinion**, v. 31, n. 4, p. 707-721, 2015.

BOUKI, C., Venieri, D., e Diamadopoulos, E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 91, p. 1-9, 2013.

BRETONNIÈRE, C., Maitte, A., Caillon, J., Potel, G., Boutoille, D., Jacqueline, C., e Guitton, C. MIC score, a new tool to compare bacterial susceptibility to antibiotics application to the comparison of susceptibility to different penems of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of antibiotics**, 2016.

BUSH, K., Jacoby, G. A., e Medeiros, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

BUSH, K., Jacoby, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CAMPANA, Eloiza Helena. **Resistência aos carbapenens e sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*: estudo dos mecanismos de resistência envolvidos**. 2013. 151 f. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

CARRARA-MARRONI, F. E., Cayô, R., Streling, A. P., Silva, A. C. R. D., Palermo, R. L., Romanin, P., Venâncio, E. J., Perugini, M. R. E., Pelisson, M., Gales, A. C. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian

teaching hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 4, p. 304-306, 2015.

CASTANHEIRA, M., Toleman, M. A., Jones, R. N., Schmidt, F. J., e Walsh, T. R. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4654-4661, 2004.

CASTANHEIRA, M., Sader, H. S., Jones, R. N., Debbia, E., Picão, R. C., e Gales, A. C. In71, an *Enterobacter cloacae bla*<sub>VIM-1</sub>-carrying integron related to In70. 2 from Italian *Pseudomonas aeruginosa* isolates: a SENTRY Antimicrobial Surveillance Program report. **Microbial Drug Resistance**, v. 13, n. 2, p. 130-134, 2007.

CASTANHEIRA, M., Fritsche, T. R., Sader, H. S., E Jones, R. N. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1587-1588, 2008.

CHAGAS, T. P. G., Seki, L. M., Cury, J. C., Oliveira, J. A. L., Dávila, A. M. R., Silva, D. M., E Asensi, M. D. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 3, p. 572-581, 2011.

CHAPAVAL, L., de Souza Olivindo, C., de Souza, F. G. C., Alves, F. S. F., & Frota, I. M. A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 1, p. 49, 2010.

CHO, H. H., Kwon, K. C., Kim, S., E Koo, S. H. Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Annals of laboratory medicine**, v. 34, n. 4, p. 286-292, 2014.

CHOLLEY, P., Thouverez, M., Hocquet, D., Van Der Mee-Marquet, N., Talon, D., e Bertrand, X. Most multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belongs to a few clonal types. **Journal of clinical microbiology**, p. JCM. 00102-11, 2011.

CORREA, A., Del Campo, R., Perenguez, M., Blanco, V.M., Rodríguez-Baños, M., Perez, F., Villegas, M. V. Dissemination of high-risk clones of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2421-2425, 2015.

CUZON, G., Bogaerts, P., Bauraing, C., Huang, T. D., Bonnin, R. A., Glupczynski, Y., e Naas, T. Spread of plasmids carrying multiple GES variants. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 00360-16, 2016.

DE ARAÚJO JÁCOME, P. R. L., Alves, L. R., Cabral, A. B., Lopes, A. C. S., e Maciel, M. A. V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990-4990, 2012.

DE PAULA, S. B., Cayô, R., Streling, A. P., Nodari, C. S., Matos, A. P., Perugini, M. R. 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. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 89, n. 1, p. 80-82, 2017.

DE PAULA-PETROLI, S. B., Campana, E. H., Bocchi, M., Bordinhão, T., Picão, R. C., Yamada-Ogatta, S. F., E Carrara-Marroni, F. E. Early detection of a hypervirulent KPC-2-producing *P. aeruginosa* ST235 in Brazil. **Journal of global antimicrobial resistance**, 2018.

DHAR, S., Kumari, H., Balasubramanian, D., E Mathee, K. Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*—their role in the

development of resistance. **Journal of medical microbiology**, v. 67, n. 1, p. 1-21, 2017.

DOI, Y., de Oliveira Garcia, D., Adams, J., E Paterson, D. L. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 852-856, 2007.

DOI, Y., Wachino, J. I., E Arakawa, Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 2, p. 523-537, 2016.

DROUIN, F., Mélançon, J., E Roy, P. H. The IntI-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* is active as an integron integrase. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 6, p. 1811-1815, 2002.

EL SALABI, A., Toleman, M. A., Weeks, J., Bruderer, T., Frei, R., & Walsh, T. R. First report of the metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 582-582, 2010.

EL SALABI, A., Borra, P. S., Toleman, M. A., Samuelsen, O., e Walsh, T. R. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2241-2245, 2012.

FAEZI, S., Nikokar, I., Elmi, A., Ghasemi, Y., Farahbakhsh, M., Chirani, A. S., Mahdavi, M. Molecular characterization and Functional Analysis of the PilQ380-706: a Novel Secretin Domain in *Pseudomonas aeruginosa*. **Avicenna journal of medical biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 34, 2018.

FAJARDO, A., Hernando-Amado, S., Oliver, A., Ball, G., Filloux, A., E Martinez, J. L. Characterization of a novel Zn<sup>2+</sup>-dependent intrinsic imipenemase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 11, p. 2972-2978, 2014.

FUENTEFRIA, D. B., Ferreira, A. E., Gräf, T., E Corção, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 5, p. 470-3, 2008.

GALES, A. C., Castanheira, M., Jones, R. N., e Sader, H. S. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GE, C., Wei, Z., Jiang, Y., Shen, P., Yu, Y., e Li, L. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1184-1186, 2011.

GEISINGER, E., E Isberg, R. R. Interplay Between Antibiotic Resistance and Virulence During Disease Promoted by Multidrug-Resistant Bacteria. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. suppl\_1, p. S9-S17, 2017.

GEORGESCU, M., Gheorghe, I., Curutiu, C., Lazar, V., Bleotu, C., E Chifiriuc, M. C. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 92, 2016.

GEORGIOS, M., E Maria, B. Beta-lactamase and Carbapenemase Detection Methods: An Overview of Recent Patents. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2014.

GIRLICH, Bonnin, R. A., Jousset, A., E Naas, T. Promoter characterization and expression of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1597-1601, 2017.

GONÇALVES, Iara Rossi et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 211-217, 2017.

GURUNG, M., Moon, D. C., Tamang, M. D., Kim, J., Lee, Y. C., Seol, S. Y., ... E Lee, J. C. Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla*<sub>IMP-1</sub> in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 68, n. 4, p. 468-470, 2010.

HONG, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., e Lee, K. Epidemiology and characteristics of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection e chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 81-97, 2015.

HONG, J. S., Yoon, E. J., Lee, H., Jeong, S. H., E Lee, K. Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 isolates carrying *bla*<sub>IMP-6</sub> and emergence of *bla*<sub>GES-24</sub> and *bla*<sub>IMP-10</sub> on novel genomic islands PAGI-15 and-16 in South Korea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7216-7223, 2016.

HOPKINS, K. L., Meunier, D., Findlay, J., Mustafa, N., Parsons, H., Pike, R., Woodford, N. SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 7, p. 696-697, 2016.

HORII, T., Muramatsu, H., E linuma, Y. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones and carbapenems in *Pseudomonas putida*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 643-647, 2005.

JACOBY, G. A., Walsh, K. E., Mills, D. M., Walker, V. J., Oh, H., Robicsek, A., E Hooper, D. C. *qnrB* another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1178-1182, 2006.

JEANNOT, K., Bolard, A., E Plésiat, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 526-535, 2017.

JUAN, N. C., e Oliver, A. Carbapenemases in *Pseudomonas* spp. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 28, p. 19-28, 2010.

KALLUF, K. O., Arend, L. N., Wuicik, T. E., Pilonetto, M., E Tuon, F. F. Molecular epidemiology of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* by rep-PCR in hospitals in Parana, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 130-133, 2017.

KHALIFA, A. B. H., Moissenet, D., Thien, H. V., Khedher, M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. **Annales de biologie clinique**, v. 69, n. 4, p. 393-403, 2011.

KLOCKGETHER, J., E Tümmler, B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. **F1000Research**, v. 6, 2017.

KRAUSE, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., E Connolly, L. E. Aminoglycosides: an overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 6, p. a027029, 2016.

KULKOVÁ, N., Babálová, M., Brnová, J., E Krcméry, V. Transferable fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hemocultures. **Cent. Eur. J. Public Health**, v. 22, p. 60-63, 2014.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435-441, 2009.

LAURETTI, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G. M. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LEE, K., Yum, J. H., Yong, D., Lee, H. M., Kim, H. D., Docquier, J. D., e Chong, Y. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla<sub>SIM-1</sub>*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485-4491, 2005.

LI, J., Zou, M., Dou, Q., Hu, Y., Wang, H., Yan, Q. Characterization of clinical extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Hunan province of China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 35, 2016.

LIAKOPOULOS, A., Mavroidi, A., Katsifas, E. A., Theodosiou, A., Karagouni, A. D., Miriagou, V., e Petinaki, E. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

LIU, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Yu, L. F. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LYCZAK, J. B., Cannon, C. L., Pier, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist<sup>1</sup>. **Microbes and infection**, v. 2, n. 9, p. 1051-1060, 2000.

MAO, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu Q., Alvarez, P. J. J. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. **Water research**, v. 85, p. 458-466, 2015.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., Pascual, A., E Jacoby, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **The Lancet**, v. 351, n. 9105, p. 797-799, 1998.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. **International Journal of Infectious Diseases**, n. 45, p. 3-4, 2016.

MARTINS, W. M. B. S., Almeida, A. C. S., Silva, B. O., Vilela, M. A. Morais, M. M. C. Prevalência do gene *bla<sub>KPC</sub>* em isolados clínicos de *Enterobacteriaceas* e não fermentadores encontrados em amostras clínicas em um hospital universitário do recife. In: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – **JEPEX 2010** – UFRPE: Recife, 2010.

MEHTA, S. C., Rice, K., E Palzkill, T. Natural variants of the KPC-2 carbapenemase have evolved increased catalytic efficiency for ceftazidime hydrolysis at the cost of enzyme stability. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004949, 2015.

MELETIS, G., e Bagkeri, M. Beta-lactamase and Carbapenemase Detection Methods: An Overview of Recent Patents. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2014.

MEUNIER, D., Doumith, M., Findlay, J., Mustafa, N., Mallard, K., Anson, J., Panagea, S., Pike, R., Wright, L., Woodford, N., Hopkins, K. L. Carbapenem resistance mediated by *bla<sub>OXA-181</sub>* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 2056-2057, 2016.

MIRANDA, C. C., Filippis, I., Pinto, L. H., Coelho-Souza, T., Bianco, K., Cacci, L. C., Picão, R.C., Clementino, M. M. Genotypic characteristics of multidrug-resistant

*Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1276-1286, 2015.

MORADALI, M. Fata; GHODS, Shirin; REHM, Bernd HA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, 2017.

MULCAHY, L. R., Isabella, V. M., E Lewis, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

MUTHUPANDIAN, S., Balajee, R., E Barabadi, H. The prevalence and drug resistance pattern of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) producing *Enterobacteriaceae* in Africa. **Microbial pathogenesis**, 2017.

MURRAY, P. R.; Rosenthal, K. S; Pfaller, M. A. **Microbiologia médica**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2010.

NAAS, T., DORTET, L., IORGA, B. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. **Curr Drug Targets**, v. 17, p. 1006–1028, 2016.

NICOLETTI, A. G., Marcondes, M. F., Martins, W. M., Almeida, L. G., Nicolás, M. F., Vasconcelos, A. T., Gales, A. C. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, 2015.

O'BRIEN, T. F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. Supplement 3, p. S78-S84, 2002.

ODJADJARE, E. C., E Olaniran, A. O. Prevalence of Antimicrobial Resistant and Virulent *Salmonella* spp. in Treated Effluent and Receiving Aquatic Milieu of Wastewater Treatment Plants in Durban, South Africa. **International journal of environmental research and public health**, v. 12, n. 8, p. 9692-9713, 2015.

OLAITAN, A. O., Morand, S., E Rolain, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.

OLIVER, A., Mulet, X., López-Causapé, C., E Juan, C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. **Drug Resistance Updates**, v. 21, p. 41-59, 2015.

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).

OPAZO, A., Domínguez, M., Bello, H., Amyes, S. G., e González-Rocha, G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 04, p. 311-316, 2011.

OSANO, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., Kato, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p. 71-78, 1994.

PAPPAS, G., Saplaoura, K., e Falagas, M. E. Current treatment of pseudomonal infections in the elderly. **Drugs e aging**, v. 26, n. 5, p. 363-379, 2009.

PEREIRA, C. A., 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., Carneiro, I., Brites, C.,

Reis, M., de Souza, M. A., Tranchesi, R., Barata, C.U., Edmond, M. B. Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology, and clinical features. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68144, 2013.

PETROLINI, F. V. B. **Estudo da frequência temporal e padronização de uma PCR Multiplex para a detecção de oxacilinases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***. 2013. 150 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

PHILIPPON, A., et al. A structure-based classification of class A  $\beta$ -lactamases, a broadly diverse family of enzymes. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 29-57, 2016.

PICÃO, R. C., Poirel, L., Gales, A. C., E Nordmann, P. Diversity of  $\beta$ -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3908-3913, 2009.

PICÃO, R. C., Carrara-Marroni, F. E., Gales, A. C., Venâncio, E. J., Xavier, D. E., Tognim, M. C. B., Pelayo, J. S. Metallo- $\beta$ -lactamase-production in meropenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk for silent spread. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 747-751, 2012.

POIREL, L., Héritier, C., Tolun, V., Nordmann, P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2004.

POIREL, L., Pitout, J. D., E Nordmann, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 501-512, 2007.

POIREL, L., Nordmann, P., Lagrutta, E., Cleary, T., e Munoz-Price, L. S. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3072-3072, 2010a.

POIREL, L., Rodríguez-Martínez, J. M., Al Naiemi, N., Debets-Ossenkopp, Y. J., e Nordmann, P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2420-2424, 2010b.

POIREL, L., Naas, T., e Nordmann, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2010c.

POLLINI, S., Maradei, S., Pecile, P., Olivo, G., Luzzaro, F., Docquier, J. D., e Rossolini, G. M. FIM-1, a new acquired metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 410-416, 2013.

POTRON, A., Poirel, L., Nordmann, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015.

PRAGASAM, A. K., Sahni, R. D., Anandan, S., Sharma, A., Gopi, R., Hadibasha, N., Veeraraghavan, B. A Pilot Study on Carbapenemase Detection: Do We See the Same Level of Agreement as with the CLSI Observations. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 10, n. 7, p. DC09, 2016.

RAHMAN, M., Prasad, K. N., Pathak, A., Pati, B. K., Singh, A., Ovejero, C. M., ... E Gonzalez-Zorn, B. RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 11, p. 2059, 2015.

RAMÍREZ, D. G., Nicola, F., Zarate, S., Relloso, S., Smayevsky, J., e Arduino, S. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital: an 8-year study. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 10, p. 1565-1570, 2013.

RESENDE, A. C. B., Soares, R., de Bastos, A., dos Santos, D. B., Montalvão, E. R., E do Carmo Filho, J. R. Detection of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria in hospital effluents and in the sewage treatment station of Goiânia Brazil. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2009.

RIBEIRO, P. C. S., Monteiro, A. S., Marques, S. G., Monteiro, S. G., Monteiro-Neto, V., Coqueiro, M. M. M., E Bomfim, M. R. Q. Phenotypic and molecular detection of the *bla<sub>KPC</sub>* gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in Sao Luis, MA, Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 737, 2016.

RIOS, V. M., e de Almeida, M. T. G. Carbapenemases: um problema em evolução. **ACeT Científica**, v. 4, n. 1, 2014.

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. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

SACHA, P., Wieczorek, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Olszańska, D., E Tryniszewska, E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. **Folia Histochemica et cytobiologica**, v. 46, n. 2, p. 137-142, 2008.

SANTOS, P. P., Miranda, T. D. M. T., Barthasson, D. L., Souza, K. M. C. D., Brito, W. M. E. D. D., André, M. C. D. P. B., Serafini, Á. B. Qualidade microbiológica de afluentes e

efluentes de estações de tratamento de água e esgoto de Goiânia, Goiás. **Revista de patologia tropical**, 2010.

SATLIN, M. J., E Walsh, T. J. Multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and vancomycin-resistant enterococci: Three major threats to hematopoietic stem cell transplant recipients. **Transplant Infectious Disease**, 2017.

SAWA, T., Shimizu, M., Moriyama, K., E Wiener-Kronish, J. P. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 668, 2014.

SEKIGUCHI, J. I., Morita, K., Kitao, T., Watanabe, N., Okazaki, M., Miyoshi-Akiyama, T., Kirikae, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- $\beta$ -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194-4197, 2008.

SHARIATI, A., Azimi, T., Ardebili, A., Chirani, A. S., Bahramian, A., Pormohammad, A., Hashemi, A. Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. **New microbes and new infections**, v. 21, p. 75-80, 2018.

SHEIKH, A. F., Rostami, S., Jolodar, A., Tabatabaiefar, M. A., Khorvash, F., Saki, A., Shoja, S., Sheikhi, R. Detection of metallo-beta-lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 7, n. 11, 2014.

SINGH, G., Kulharia, M. Insights from the analysis of alginate lyase protein model from *Pseudomonas fluorescens* towards the understanding of mucoid biofilm disruption. **Bioinformation**, v. 13, n. 9, p. 318, 2017.

SMITH, W. D., Bardin, E., Cameron, L., Edmondson, C. L., Farrant, K. V., Martin, I., Alton, E. W. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 14, 2017.

SUBEDI, Dinesh; VIJAY, Ajay Kumar; WILLCOX, Mark. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. **Clinical and Experimental Optometry**, 2017.

SULLIVAN, E., Bensman, J., Lou, M., Agnello, M., Shriner, K., E Wong-Beringer, A. Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Critical care medicine**, v. 42, n. 1, p. 48-56, 2014.

TADA, T., Shimada, K., Satou, K., Hirano, T., Pokhrel, B. M., Sherchand, J. B., Kirikae, T. Metallo- $\beta$ -lactamases (DIM-1, NDM-1, VIM-2) and a 16S rRNA methyltransferase (RmtB4, RmtF2) producing *Pseudomonas aeruginosa* in Nepal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 00694-17, 2017.

TAKAHASHI, Y., Igarashi, M. Destination of aminoglycoside antibiotics in the 'post-antibiotic era'. **The Journal of antibiotics**, 2017.

TATARELLI, P., e Mikulska, M. Multidrug-resistant bacteria in hematology patients: emerging threats. **Future microbiology**, v. 11, n. 6, p. 767-780, 2016.

TAVAJJOHI, Z., Moniri, R., e Zarrabi, M. Detection of GES-2, a Class A  $\beta$ -Lactamase Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in a Teaching Hospital in Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 10, 2013.

TOLEMAN, M. A., Simm, A. M., Murphy, T. A., Gales, A. C., Biedenbach, D. J., Jones, R. N., e Walsh, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase

isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TOLEMAN, M. A., Bennett, P. M., e Walsh, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 296-316, 2006.

TRAN, Q. T., Nawaz, M. S., Deck, J., Nguyen, K. T., E Cerniglia, C. E. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas putida* isolates from imported shrimp. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1885-1887, 2011.

VAN HOEK, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., E Aarts, H. J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in microbiology**, v. 2, 2011.

VELKOV, T., Dai, C., Ciccotosto, G. D., Cappai, R., Hoyer, D., E Li, J. Polymyxins for Cns infections: Pharmacology and neurotoxicity. **Pharmacology E therapeutics**, 2017

VILLEGAS, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A., Quinn, J. P., e Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, 2007.

WACHINO, J. I., Yoshida, H., Yamane, K., Suzuki, S., Matsui, M., Yamagishi, T., Arakawa, Y. SMB-1, a novel subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5143-5149, 2011.

WOLTER, D. J., Khalaf, N., Robledo, I. E., Vázquez, G. J., Santé, M. I., Aquino, E. E., e Hanson, N. D. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18  $\beta$ -

lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1660-1664, 2009a.

WOLTER, D. J., Kurpiel, P. M., Woodford, N., Palepou, M. F. I., Goering, R. V., e Hanson, N. D. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 557-562, 2009b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Tacconelli, E. C. E., Savoldi, A., Kattula, D., Burkert. F. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Geneva: World Health Organization**, 2017.

YOKOYAMA, Keiko et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **The Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1888-1893, 2003.

YONG, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., e Walsh, T. R. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

YONG, D., Toleman, M. A., Bell, J., Ritchie, B., Pratt, R., Ryley, H., e Walsh, T. R. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>AIM-1</sub>, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6154-6159, 2012.

YOUNG, H. K. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 31, n. 5, p. 627-635, 1993.

ZHANG, X., Lü, X., Zong, Z. Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 2, p. 204-206, 2012.

ZHAO, W. H., e Hu, Z. Q.  $\beta$ -lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Critical reviews in microbiology**, v. 36, n. 3, p. 245-258, 2010.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar determinantes de resistência adquirida e genes de virulência em uma coleção de isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas* spp. do Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos (LEMRA) recuperados entre os anos de 2003 a 2016.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

**3.2.1** Realizar a identificação das espécies de *Pseudomonas* por meio de métodos fenotípicos e moleculares.

**3.2.2** Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, de isolados de *Pseudomonas* spp. não sensíveis a ceftazidima e/ou carbapenêmicos (PA-CAZ/CARB-NS).

**3.2.3** Detectar a produção de carbapenemases nos isolados de *Pseudomonas* spp. selecionados no estudo por meio de métodos fenotípicos.

**3.2.4** Detectar a presença dos genes codificadores de resistência adquirida aos beta-lactâmicos, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e colistina nos isolados de *Pseudomonas* spp não sensíveis a ceftazidima e/ou carbapenêmicos

**3.2.5** Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem), Ceftazidima, Polimixina B e Colistina dos isolados portadores de genes codificadores de resistência aos antimicrobianos.

**3.2.6** Detectar genes codificadores de fatores de virulência em isolados de *Pseudomonas* spp. portadores de genes codificadores de carbapenemases.

**3.2.7** Estabelecer a relação clonal entre os isolados portadores de genes codificadores de resistência aos antimicrobianos.

**3.2.8** Detectar genes codificadores de integrases de integrons das classes I, II e III.

**3.2.9** Determinar o contexto genético dos genes codificadores de resistência aos antimicrobianos detectados.

#### 4 ARTIGO A – (European Journal of Microbiology and Immunology)

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PRODUTORES DE KPC-2 DURANTE UM PERÍODO DE 9 ANOS (2008-2016)

CHARACTERIZATION OF KPC-2-PRODUCING *Pseudomonas aeruginosa* isolates OVER 9 YEARS (2008-2016)

Raquel Lima Palermo<sup>1,2</sup>, Floristher Elaine Carrara-Marroni<sup>2</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Clínica, Hospital Universitário de Londrina, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

### RESUMO

O surgimento de isolados de *P. aeruginosa* resistentes a múltiplos antimicrobianos (MR-PA) é um importante problema de saúde pública, uma vez que os determinantes da resistência antimicrobiana são adquiridos por meio da transferência lateral de genes. Este estudo teve como objetivo detectar genes de resistência antimicrobiana adquirida em isolados MR-PA e estabelecer uma relação clonal e o contexto genético entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores de KPC-2, recuperados de janeiro de 2008 a dezembro de 2016 no Hospital Universitário de Londrina (HU). Os testes de identificação e sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo sistema automatizado Vitek-2 (BioMérieux®) e pelos testes bioquímicos convencionais. Os seguintes genes codificadores de resistência antimicrobiana adquirida foram rastreados por PCR multiplex para: carbapenemases das classes A, B e D de Ambler, genes *mcr-1*, 16S rRNA metiltransferases (16S-RMTases), *qnr* e genes codificadores de fatores de virulência. A identificação molecular foi realizada para *P. aeruginosa* e a relação clonal

foi analisada por ERIC-PCR e o contexto genético do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi determinado por PCR-mapping. Um total de 19 isolados de MR-PA produtores de KPC-2 foram analisados e, com exceção das polimixinas (100% suscetíveis), altas taxas de resistência foram obtidas para todos os antimicrobianos testados. O aumento preocupante no número de isolados produtores de KPC foi observado comparado com pesquisas anteriores no mesmo hospital, onde o determinante de resistência prevalente em *P. aeruginosa* era o gene *bla*<sub>SPM</sub>. Não foram detectados os genes: *mcr-1*, 16S-RMTases e *qnr*, porém foi detectado a presença de genes associados a virulência em todos os isolados. Os 19 isolados MR-PA codificadores do gene *bla*<sub>KPC</sub> foram tipados em 8 clones (A-H) distribuídos durante o período analisado em diversas unidades hospitalares. Os 8 clones obtidos revelam a adaptação deste determinante de resistência em nosso hospital, provavelmente movido pela pressão seletiva do uso de carbapenêmicos. *P. aeruginosa* é considerada um microrganismo altamente patogênico devido à presença de inúmeros fatores de virulência que podem ser encontrados em seu genoma. Estes resultados mostram que as taxas e a distribuição dos genes de resistência adquirida aos antimicrobianos podem flutuar em uma instituição ao longo dos anos e que a vigilância e detecção é essencial para estabelecer as medidas de controle de infecção para resguardar a eficácia dos medicamentos no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*.

**Palavras-chave:** Resistência. Carbapenemase. Antimicrobianos. Carbapenêmicos. Transposon.

## ABSTRACT

The emergence of Multidrug Resistant *P. aeruginosa* (MDR-PA) isolates is a major public health concern, since antimicrobial resistance determinants are acquired through lateral gene transfer. This study aimed to detect genes of acquired antimicrobial resistance in MDR-PA and to establish a clonal relation and genetic context among isolates of KPC-2-producing *P. aeruginosa* recovered from January 2008 to December 2016 at the Hospital Universitário de Londrina (HU). The identification and antimicrobial susceptibility tests were performed by Vitek-2 (BioMérieux®) automated system and conventional biochemical tests. The following antimicrobial resistance codifying genes were screened by multiplex PCR to: carbapenemases A, B and D of Ambler classes, *mcr-1*, 16S rRna methyltransferases (16S-RMTases) *qnr* and genes encoding virulence factors. Molecular identification was performed for *P. aeruginosa* and the clonal relation was analyzed by ERIC-PCR and the genetic context of *bla*<sub>KPC</sub> gene was determined by PCR-mapping. A total of 19 MDR-PA isolates KPC-2-producing were analysed and with exception of polymyxins (100% susceptible) high resistance rates were obtained for all tested antimicrobials. Worrisome increase of KPC-producing isolates were found in comparison with previous searches in the same hospital, where the prevalent

antimicrobial resistant determinant in *P. aeruginosa* was the *bla*<sub>SPM</sub> gene. None of the investigated genes for *mcr-1*, 16S-RMTases and quinolones were detected in the isolates; however, multiple genes associated with virulence were detected in all isolates. The 19 MDR-PA isolates codifying *bla*<sub>KPC</sub> gene were typed in 8 clones (A-H) distributed over the period analysed in diverse hospital units. The 8 clones obtained reveal the adaptation of this resistance determinant in our hospital, probably moved by the selective pressure of the carbapenem usage. *P. aeruginosa* is considered a highly pathogenic microorganism due to the presence of innumerable virulence factors that can be found in its genome. These results show that the rates and the distribution of acquired antimicrobial resistance genes can floating in an institution over the years and that the surveillance and detection of them is essential to establish the infection control measures in order to safeguard the effectiveness of the drugs in the treatment of *P. aeruginosa* infections.

**Key words:** Resistance. Carbapenemase. Antimicrobials. Carbapenens. Transposon.

## INTRODUCTION

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen capable of causing life-threatening acute and chronic infections, mostly in patients with compromised immune defence or hospitalized at intensive care units (ICU). It is one of the leading causes of nosocomial infections that can lead to sepsis, pneumoniae, endocarditis and urinary tract infections. Around 30% of isolates recovered from patients admitted at the hospitals display antibiotic resistance (DEGLI ATTI et al., 2014).

*P. aeruginosa* is a major cause of morbidity and mortality in patients with cystic fibrosis due to pulmonary tract colonization. It mainly affect the patients in intensive care units and those having catheterization, burn, and/or chronic illnesses due to the large number of virulence factors such as exotoxin A, exoenzymes, elastase and sialidase. Exotoxin A inhibited protein biosynthesis and the exoenzymes are secreted by a type III secretory system. Las B is a zinc metalloprotease that has an elastolytic activity on lung tissue. The gene *nan1* encodes a sialidase responsible for adherence to the respiratory tract (NIKBIN et al., 2012).

The emergence of extensively drug-resistant *P. aeruginosa* (XDR-Pa) isolates is becoming a major public health concern. These isolates acquire numerous drug-resistance determinants through lateral gene transfer that are mediated by mobile

genetic elements. In addition, genes encoding the antibiotic-inactivating enzymes beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs), and 16S rRNA methylases (16S-RMTases) are frequently associated with antibiotic resistance profile in XDR-Pa isolates. An over-expression of drug-efflux pumps and diminished expression of outer membrane proteins also play a role in drug resistance (MAGIORAKOS et al., 2012, LI et al., 2016).

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) are Ambler's class A beta-lactamases that efficiently hydrolyze almost all beta-lactams, including carbapenems. The *bla*<sub>KPC</sub> was first described in *K. pneumoniae* in 1996 and have been frequently reported all over the world among the *Enterobacteriaceae* species. KPC-producing *P. aeruginosa* isolates were primarily described in 2006 in Colombia and since then, it has being reported in America continent and China, indicating a potential worldwide spread of KPC-producing *P. aeruginosa*. The *bla*<sub>KPC</sub> from *P. aeruginosa* are located on chromosome or plasmids (SHI et al., 2017).

Among the variants, KPC-2 is the most prevalent enzyme found in *Pseudomonas* spp., being considered the most clinically significant enzyme. It is effective in hydrolyzing penicillins, cephalosporins and carbapenems. The presence of *bla*<sub>KPC-2</sub> gene on the mobile transposon *Tn4401* has facilitated its dissemination among Gram-negative bacteria (MEHTA, RICE E PALZKILL, 2015).

In this study we characterized 19 *P. aeruginosa* harboring the *bla*<sub>KPC</sub> gene to confirm the carbapenemase production, to investigate the presence of other acquire resistance determinants, as well as to determine the *bla*<sub>KPC</sub> gene variant and the genetic context involved. Furthermore, we detected the virulence genes among these isolates and used the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR to determine the genetic relatedness of the isolates.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Bacterial isolates and antimicrobial susceptibility**

We studied a total of 19 clinical isolates of *P. aeruginosa* harboring the *bla*<sub>KPC</sub> gene recovered at the Clinical Microbiology Laboratory of Hospital Universitário de Londrina (HU) from 2008 to 2016.

The isolates were previously identified by MicroScan® (Siemens) and Vitek2 systems (*bioMérieux, Marcy 1'Etoile, France*) using AST-N201 and AST-N203 Gram-negative susceptibility card and conventional biochemical tests. Molecular identification as *P. aeruginosa* was confirmed by amplification of 16S ribosomal rDNA according to SPILKER et al. (2004).

The evaluation of antimicrobial susceptibility were performed by the Kirby-Bauer disk diffusion method and automated systems. The results were analyzed and interpreted according to the guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) considering breakpoints for *P. aeruginosa*.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined for carbapenemase producing isolates by broth microdilution for the following antimicrobials: ceftazidime, imipenem, meropenem, polymyxin and colistin according to recommendations of the document M07-A9 of the CLSI (2012). For the interpretation and classifications to the antimicrobials tested was considered the breakpoints recommended by the document M100-S27 of the CLSI, 2017.

### **Phenotypic detection of carbapenemase**

The Blue-Carba test (BCT) was performed according to PIRES et al., (2013) for detection of carbapenemase production in *P. aeruginosa* isolates. The test consists to inoculate a loop of bacterial growth cultured in Muller Hinton plates, during at least 16 hours, and suspended in 100 µL 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 µL of the control solution (without imipenem, final pH 7.0). The test was incubated at 37°C for 2h and the change of color from blue/green to yellow in the test solution was considered positive for production of carbapenemase. No color alteration of blue or green on the control and test solutions was interpreted as negative result.

## Detection of antibiotic resistance and virulence encoding genes

The presence of genes encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>PER</sub> and *bla*<sub>VEB</sub>), carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>OXA-143</sub>), plasmid mediated quinolone resistance genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* and *qnrVC*), 16S-RMTases (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF* and *rmtG*), *mcr-1* gene was detected by PCR using the Top Taq Master Mix (QIAGEN, Germany) and specific primers and cycling parameters described elsewhere (KRAYCHETE et al., 2016; WANG et al., 2006; MENDES et al., 2007; DALLENE et al., 2010; DOYLE et al., 2012; WOODFORD et al., 2005, 2006; HIGGINS et al., 2010; WANG et al., 2016; LIU et al., 2016). All amplicons were purified using the Purelink Kit (Invitrogen, USA), sequenced by Sanger using the Top Taq Master Mix (QIAGEN, Germany) at the ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) equipment and then analyzed using the BLAST algorithm in the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

PCR assays using specific primers for the most relevant virulence factors: *aprA*, *algD*, *exoU*, *exoY*, *exoS*, *toxA*, *nanI*, *plcH*, *lasB* and *lasI* encoding genes were also performed as previously described (LANOTTE et al., 2004; STRATEVA E MITOV, 2008; SABHARWAL et al., 2014).

## Transposon typing

The genetic environment of *bla*<sub>KPC-2</sub> was performed using specific primers previously published; targeting the transposon Tn4401 structure *tnpA*, *tnpRI*, *ISKpn6* and *ISKpn7* to investigated the flanking sequences by PCR-mapping scheme (LEAVITT et al., 2009; NASEER et al., 2009).

## ERIC-PCR assays and profile analysis

ERIC-PCR was used for molecular typing of all isolates analyzed in this study. PCR assays were performed with ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') and ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3') primer as previously described (MARTINS et al., 2014). ERIC-PCR profiles were used to construct a genotype dendrogram based on the average similarity of the matrix using the unweighted pair group method with arithmetic mean and the DICE similarity coefficient (2% of tolerance) using BioNumerics Software (New York, NY, USA). The interpretation criteria was according to TENOVER et al., 1995. The nearest neighbor-joining clustering method was used to show relationships between similar groups using a 90% cut off (VAN BELKUM et al., 2007).

## RESULTS AND DISCUSSION

Carbapenems are one of the most effective drugs against severe infections caused by *P. aeruginosa*, considered one of the primary cause of hospital-acquired infections. The production of carbapenemases is an important antibiotic resistance mechanism, as a result, an increase in the prevalence of clinical MDR-PA and XDR-PA isolates correlates with a rise in mortality and morbidity rates (SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2017).

The first detection of KPC-2-producing *P. aeruginosa* was in Colombia in 2006 (VILLEGAS et al., 2007) and in Brazil the first report was in Recife, in an isolate recovered from 2010 (ARAÚJO JÁCOME et al., 2012). Although, in 2011 was published a report of the first detection of this gene in our hospital (CARRARA-MARRONI et al., 2015), recently in a retrospective study an isolate from 2008 was the first one detected in Brazil and in our hospital by chronological order that carried the gene *bla<sub>KPC-2</sub>* (DE PAULA-PETROLI et al., 2018). After that, the frequency of the gene at the hospital was considered low until 2015, since it was detected in an outbreak in 2011 (2 isolates), in 2012 (3 isolates) and 2013 (3 isolates). In 2015, only 1 isolate was reported, but, in 2016 9 isolates harbored the *bla<sub>KPC-2</sub>*. The epidemic carbapenemase commonly found at the hospital since 2005 in *P. aeruginosa* with high frequency is the metallo-beta-lactamase SPM-1 present in different clones. However, the profile of carbapenemases detection

has change in the last few years when new carbapenemases as KPC and VIM variants started to shown in isolates of *P. aeruginosa*. It was observed that only one clone of SPM-producer *P. aeruginosa* has maintained in 2016 while a diversity of new profiles of MDR and XDR KPC-2-producing *P. aeruginosa* began to establish itself. This phenomenon may be happened due to the selective pressure of new antimicrobials that started to be used more frequently and made it easier to spread determinants of resistance like plasmids, integrons and transposons inter and intra- species and genus.

The predominant type of samples from which KPC isolates were isolated was urine 10 (52.6%) tracheal secretion 5 (26.3%), tissue 2 (10.5%) and colonization swab 2 (10.5%). Of note, 8 (42.1%) of isolates were isolated from patients in common ward, 4 (21.0%) in ICU, 3 (15.7%) in isolation ward, 2 (10.5%) in ICU for burn patients and 2 (10.5%) from patients attended but with no hospitalization (Table 1).

All KPC-Pa isolates were non-susceptible to amikacin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, levofloxacin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, imipenem, meropenem, and piperacillin tazobactam, but were sensitive to polymyxin and colistin. Some studies suggested that higher levels of transcription of *bla<sub>KPC</sub>* genes were associated with increased carbapenem MICs. However, another study suggests that elevated mRNA transcription and higher plasmid copy number were not systematically correlated with decreased susceptibility patterns. The levels of transcription of the *bla<sub>KPC</sub>* gene were not correlated with the carbapenem MICs in *A. baumannii* or in *P. aeruginosa*. Promoter structures variations, Post-transcriptional or translational regulation and other mechanisms, such as porin down-regulation and yet unidentified mechanisms, have to be investigated (GIRLICH et al., 2017).

A previous study show that mutants isolates KPC-2-producing have the ability of expanded substrate profile and hydrolyze the oxyimino-cephalosporin ceftazidime being considered evolved versions of KPC-2 variants that exhibit no reduced activity towards carbapenems, creating a further threat to antibiotic therapy (MEHTA, RICE E PALZKILL, 2015).

Pathogenicity of *P. aeruginosa* is multifactorial. LasB is one of the most important proteases of *P. aeruginosa*, since that a mutation of *lasB* gene reduces potentially *P. aeruginosa* invasion, becoming an important factor for bacteria survival.

The presence of *exoU* (encoding exotoxin U) is related to cytotoxicity and *exoS* (encoding exotoxin S) invasion phenotypes. The *exoU* production is correlated with the clonal complex of sequence type ST235, which is considered an epidemic clone worldwide disseminated related to acute infection that lead to a mortality outcome for patients.

In this study the frequency of virulence-associated genes on the isolates was 31.5% to *nanI*, 47.3% to *exoU*, 57.8% to *exoS*, 73.6% to *exoY* and 100.0% to *lasB*, *lasI*, *algD*, *aprA*, *plcH* and *toxA*. The differences in the distributions of virulence factor genes in the populations strengthen the probability that some *P. aeruginosa* isolates are better adapted to the specific conditions found in specific infectious sites.

Positive results were observed for *plcH*, *exoS*, *toxA* and *lasB* genes, which encodes the haemolytic phospholipase C, the exoenzyme S, the exotoxin A and an elastase, respectively. It is noteworthy that *LasB* degrades different proteins, like elastin and casein; therefore, this enzyme also destroys host tissue components and interferes with its defense mechanisms against infection (STRATEVA E MITOV, 2011). PCR assays also revealed the presence of the auto-induced synthase *LasI* encoding gene, *lasI*, which is involved in quorum sensing (QS). The *nan-1*, a neuraminidase-encoding gene an extracellular neuraminidase that play a key role in the adhesion of the isolate (COREHTASH et al., 2015).

Using ERIC-PCR, the 19 XDR-PA isolates were classified into 8 genetic groups (A-H) using 90% as a similarity cut-off (Fig. 1). The main clusters type found was E (5 isolates) followed by B (3 isolates), G (3 isolates), A (2 isolates), C (2 isolates), H (2 isolates), D (1 isolates) and F (1 isolates). There was no correlation between clinical origin of *P. aeruginosa* isolates and their distribution in the 8 genetic groups. High mortality rates was observed predominant in all clusters with exception of group C, F and G which had one patient recovered from each.

The XDR-PA isolates previously isolated in other countries were shown to be clonally related (MARTA et al., 2014); in contrast, XDR-PA isolates from HU were shown to be genetically diverse. The high heterogeneity of the ERIC-PCR types suggest that the mobile genetic elements may play a role in the emergence of clinical XDR-PA isolates.

We detected the presence of the transposon *Tn4401* in all isolates. Mobile genetic elements, including integrons, plasmids, transposons, and insertion sequences, play a key role in the horizontal transfer of resistance genes.

Studies of the genetic structure surrounding *bla<sub>KPC-2</sub>* genes have identified a Tn3-based transposon; *Tn4401*, which has 10 kb, delimited by two 39-bp imperfect inverted repeat sequences, and harbors transposase and resolvase genes. Additionally, two insertion sequences *ISKpn6* and *ISKpn7* can be present in addition to *bla<sub>KPC-2</sub>*. Five isoforms of *Tn4401*, differing by polymorphisms located upstream of the *bla<sub>KPC</sub>* gene, are known and correspond to no deletion (isoform b) and to 68-bp (isoform d), 99-bp (isoform a), 215-bp (isoform c), and 255-bp deletions (isoform e) (NAAS et al., 2012). Although the *bla<sub>KPC-2</sub>* gene was flanked downstream by insertion sequence *ISKpn6* in all of the studied isolates, it was only flanked upstream by *tnpR* in the 2188 isolate, which carries on a plasmid.

The transposon of all isolates showed to be the *Tn4401d* based in the similarity of isoforms of *Tn4401* since no *ISKpn7* was not detected in any of isolates (CUZON et al., 2010).

This resistance determinant has already spread widely and the emergence and dissemination of isolates of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp producing carbapenemases has been reported in different parts of the world. Given the ability to limit therapeutic options by KPC-producing microorganisms, urgent measures are necessary to control the worldwide and hospital dissemination of antimicrobial resistance and thus improve the prognosis of patients as well to develop alternative therapies for the treatment of infections caused by MDR microorganisms that carry this determinant.

## **CONCLUSION**

Our analysis of several *P. aeruginosa* isolates indicates the spread of different clones with an identical genetic structure, *Tn4401d*, which sustained a *bla<sub>KPC</sub>* gene acquisition, that contribute with the worldwide spread of this gene. This determinant of resistance is disseminated in HU in different hospital units and the *bla<sub>KPC</sub>*

gene present in HU for 9 years is associated with XDR phenotypes and its location facilitate their rapid spread. Although the isolates were not all clonally related, the frequency in 2016 of KPC-producing *P. aeruginosa* at the hospital increases significantly as a major clinical and public health concern since polyclonality was observed among isolates. Strict infection control policies, together with joint efforts, can aid in limiting the further dissemination of *bla*<sub>KPC</sub>.

Table 1. Antibiotic susceptibility testing results and associated genes of clinical isolates of *bla*<sub>KPC-2</sub> producing *P. aeruginosa* isolated at the Hospital Universitário de Londrina from 2008 to 2016

| <i>P. aeruginosa</i> isolate | Date of isolation | Isolation site     | Hospital Unit  | ERIC cluster | Virulence genes                                     | Tn4401 genes |             |              |              | MIC (µg/ml) |      |      |     |     |     | Disk diffusion |     |     |     |     |     | Patient outcome |            |
|------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|--------------|---|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|------|------|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|------------|
|                              |                   |                    |                |              |   | <i>tnpR</i>  | <i>tnpA</i> | <i>ISKp6</i> | <i>ISKp7</i> | CAZ         | IMP  | MEM  | POL | COL | AMI | GEN            | CIP | LEV | PPT | AZT | CEF |                 |            |
| 1461                         | 12/15/2008        | Urine              | BCU            | B            | <i>exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>           | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 1773                         | 01/15/2011        | Urine              | Male ward      | E            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>           | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Discharged |
| 1787                         | 01/18/2011        | Tissue             | ICU            | E            | <i>algD aprA plcH</i>                               | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 2188                         | 01/01/2012        | Urine              | Male ward      | E            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH nanI</i>      | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 2228                         | 01/31/2012        | Urine              | Ambulatory     | E            | <i>exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>           | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Discharged |
| 2278                         | 02/20/2012        | Swab               | Male ward      | E            | <i>exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>           | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 2611                         | 01/03/2013        | Tissue             | Male ward      | A            | <i>exoY exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 2622                         | 01/29/2013        | Tracheal secretion | Male ward      | B            | <i>exoY exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 2641                         | 01/04/2013        | Swab               | ICU            | B            | <i>exoY exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 1   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 293/15                       | 06/19/2015        | Urine              | Male ward      | D            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 4   | 2   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 06/16                        | 01/10/2016        | Urine              | Isolation ward | F            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 0,5 | 2   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Discharged |
| 100/16                       | 02/22/2016        | Urine              | Isolation ward | C            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | +            | +           | +            | -            | 32          | >256 | >256 | 1   | 2   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 208/16                       | 05/05/2016        | Urine              | ER             | C            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 1   | 2   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Discharged |
| 240/16                       | 06/18/2016        | Tracheal secretion | Male ward      | A            | <i>exoY exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | +            | +           | +            | -            | 16          | >256 | >256 | 0,5 | 2   | S   | S              | S   | S   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 242/16                       | 06/19/2016        | Tracheal secretion | Female ward    | G            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH nanI</i> | +            | +           | +            | -            | >256        | >256 | >256 | 2   | 4   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 243/16                       | 06/19/2016        | Urine              | BCU            | H            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH nanI</i> | +            | +           | +            | -            | 32          | 128  | 8    | 2   | 4   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 363/16                       | 07/18/2016        | Tracheal secretion | Isolation ward | H            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH nanI</i> | +            | +           | +            | -            | 32          | >256 | >256 | 1   | 2   | S   | S              | S   | S   | R   | R   | R   | R               | Death      |
| 477/16                       | 10/06/2016        | Tracheal secretion | ICU            | G            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH nanI</i> | +            | +           | +            | -            | 32          | 128  | 64   | 2   | 4   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Discharged |
| 613/16                       | 12/20/2016        | Urine              | ICU            | G            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH nanI</i> | +            | +           | +            | -            | 32          | 64   | >256 | 2   | 4   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R               | Death      |

BCU-Burn care unit; ER-Emergency room; CAZ-ceftazidime; IMP-imipenem; MEM-meropenem; POL-polymyxin; COL-colistin; AMI-amikacin; GEN-gentamicin; CIP-ciprofloxacin; LEV-levofloxacin; PPT-piperacilin+tazobactam; AZT-aztreonam; CEF-cefepime

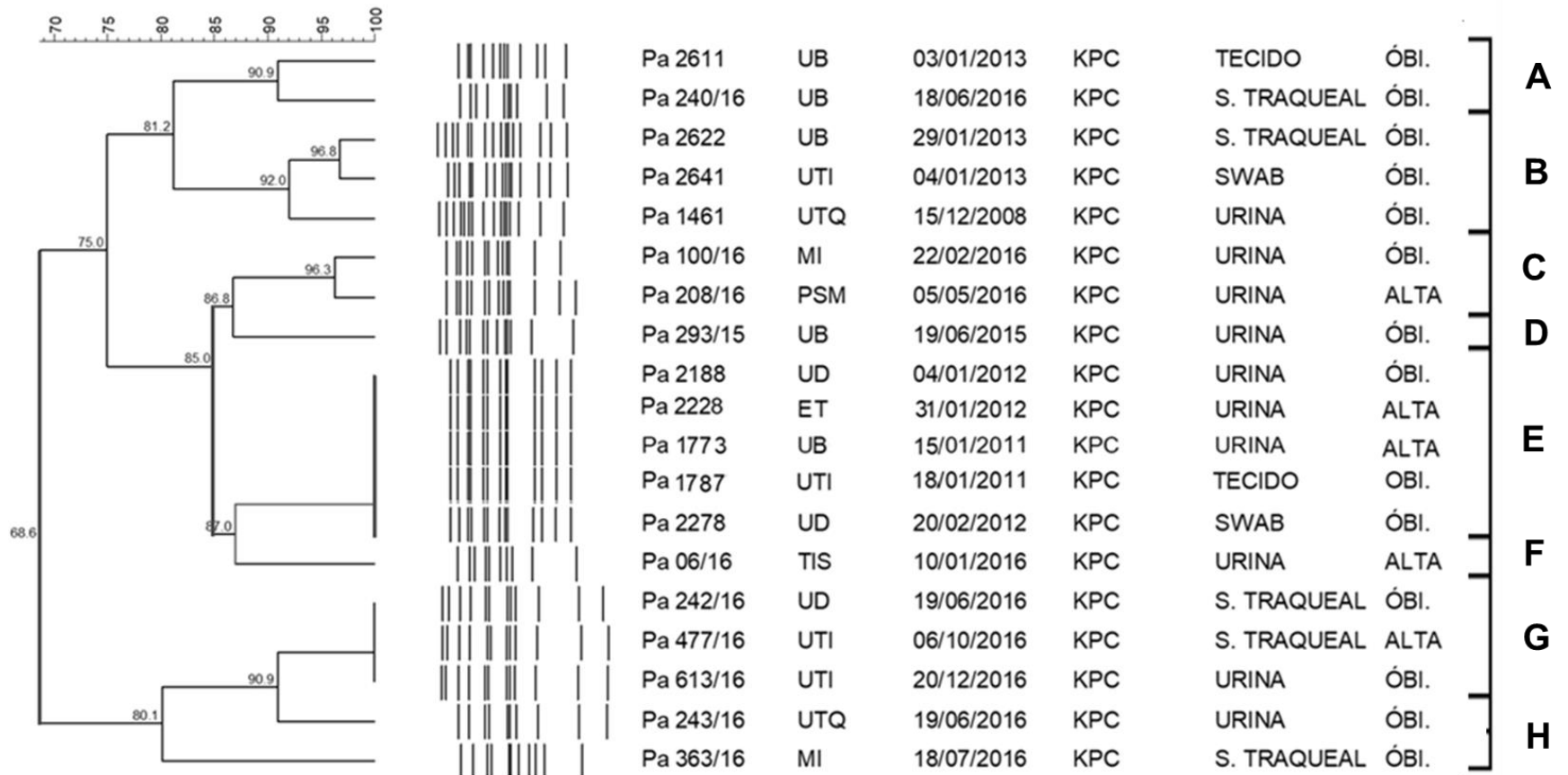


Figure 1. Dendrogram of clinical isolates of *bla<sub>kpc-2</sub>* producing *P. aeruginosa*. The isolates are grouped according to ERIC-PCR results following additional data as isolated name, hospital unit, date of isolation, carbapenemase production, isolation site, patient outcome and ERIC cluster. UB- Male ward; UTI-Intensive care unit; UTQ-Burn care unit; PSM-Emergency room; UD-Female ward; ET-Ambulatory; TIS- Isolation ward; MI- Isolation ward; TECIDO-Tissue; S. TRAQUEAL- Tracheal secretion; URINA-Urine; ÓBI-Death; ALTA-Discharged.

## REFERENCES

CARRARA-MARRONI, F. E., Cayô, R., Streling, A. P., da Silva, A. C. R., Palermo, R. L., Romanin, P., Venancio, E., Perugini, M. R. E., Pelisson, M., Gales, A. C. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 3, n. 4, p. 304-306, 2015.

CLINICAL and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

COREHTASH, Zahra Ghanbarzadeh et al. Biofilm formation and virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 8, n. 10, 2015.

CUZON, G., Naas, T., Truong, H., Villegas, M. V., Wisell, K. T., Carmeli, Y., Nordmann, P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> gene. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 9, p. 1349, 2010.

DALLENNE, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., E Arlet, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490-495, 2010.

DE ARAÚJO JÁCOME, P. R. L., Alves, L. R., Cabral, A. B., Lopes, A. C. S., e Maciel, M. A. V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990-4990, 2012.

DE PAULA-PETROLI, S. B., Campana, E. H., Bocchi, M., Bordinhão, T., Picão, R. C., Yamada-Ogatta, S. F., E Carrara-Marroni, F. E. Early detection of a hypervirulent KPC-

2-producing *P. aeruginosa* ST235 in Brazil. **Journal of global antimicrobial resistance**, 2018.

DOYLE, D., Peirano, G., Lascols, C., Lloyd, T., Church, D. L., e Pitout, J. D. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.

DEGLI ATTI, M. C., Bernaschi, P., Carletti, M., Luzzi, I., García-Fernández, A., Bertaina, A. E Raponi, M. An outbreak of extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care pediatric hospital in Italy. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 494, 2014.

GIRLICH, Bonnin, R. A., Jousset, A., E Naas, T. Promoter characterization and expression of the *bla<sub>KPC-2</sub>* gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1597-1601, 2017.

HIGGINS, P. G., Lehmann, M., E Seifert, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 3, p. 305, 2010.

KRAYCHETE, G. B., Botelho, L. A. B., Campana, E. H., Picão, R. C., E Bonelli, R. R. Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated qnr gene families. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7524-7526, 2016.

LANOTTE, P., Watt, S., Mereghetti, L., Dartiguelongue, N., Rastegar-Lari, A., Goudeau, A., E Quentin, R. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **Journal of medical microbiology**, v. 53, n. 1, p. 73-81, 2004.

LEAVITT, A., Chmelnitsky, I., Ofek, I., Carmeli, Y., E Navon-Venezia, S. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 243-248, 2009.

LI, J., Zou, M., Dou, Q., Hu, Y., Wang, H., Yan, Q., Liu, W. Characterization of clinical extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Hunan province of China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 35, 2016.

LIU, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Yu, L. F. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

MAGIORAKOS, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmelli, 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. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MARTINS, H. S. I., Bomfim, M. R. Q., França, R. O., Farias, L. M., Carvalho, M. A. R., Serufo, J. C., e Santos, S. G. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 2, p. 1465-1478, 2014.

MEHTA, S. C., Rice, K., E Palzkill, T. Natural variants of the KPC-2 carbapenemase have evolved increased catalytic efficiency for ceftazidime hydrolysis at the cost of enzyme stability. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004949, 2015.

MENDES, R. E., Kiyota, K. A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S. S., Gales, A. C., Pignatari, A. C.; Tufik, S. Rapid detection and identification of metallo- $\beta$ -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.

MORADALI, M. F., Ghods, S., E Rehm, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, 2017.

NAAS, T., Cuzon, G., Truong, H. V., E Nordmann, P. Role of ISKpn7 and deletions in *bla<sub>KPC</sub>* gene expression. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4753-4759, 2012.

NASEER, U., Haldorsen, B., Tofteland, S., Hegstad, K., Scheutz, F., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant st131 (o25: H4) and st964 (o102: H6) strains in Norway. **Apmis**, v. 117, n. 7, p. 526-536, 2009.

NIKBIN, V. S., Aslani, M. M., Sharafi, Z., Hashemipour, M., Shahcheraghi, F. E Ebrahimipour, G. H. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. **Iranian journal of microbiology**, v. 4, n. 3, p. 118, 2012.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281-4283, 2013.

SABHARWAL, N., Dhall, S., Chhibber, S., E Harjai, K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. **International journal of molecular epidemiology and genetics**, v. 5, n. 3, p. 125, 2014.

SHI, L., Liang, Q., Feng, J., Zhan, Z., Zhao, Y., Yang, W. E Li, X. Coexistence of two novel resistance plasmids, *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying p14057A and tetA (A)-carrying p14057B, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*, p. 1-6, 2017.

SILBERT, S., Pfaller, M. A., Hollis, R. J., Barth, A. L., E Sader, H. S. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infection Control E Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 847-851, 2004.

SPIPKER, T., Coenye, T., Vandamme, P., e LiPuma, J. J. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2074-2079, 2004.

STRATEVA, T., Mitov, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 4, p. 717-732, 2011.

SUBEDI, Dinesh; VIJAY, Ajay Kumar; WILLCOX, Mark. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. **Clinical and Experimental Optometry**, 2017.

TENOVER, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., e Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233, 1995.

VAN BELKUM, Alex et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 1-46, 2007.

VILLEGAS, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A., Quinn, J. P., e Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, 2007.

WANG, C., Cai, P., Chang, D., E Mi, Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261-1262, 2006.

WOODFORD, N., Fagan, E. J., E Ellington, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154-155, 2005.

WOODFORD, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Livermore, D. M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.

## 2 ARTIGO B – (Journal of Antimicrobial Chemotherapy)

PRIMEIRA DESCRIÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* CO-CARREANDO OS GENES *bla*KPC-2, *bla*GES-5 E 16S rRNA METILASE *rmt*-D1 PERTENCENTE AO ST1560 RECUPERADO DE EFLUENTE NO BRASIL

FIRST DESCRIPTION OF *Pseudomonas aeruginosa* CO-CARRYING THE GENES *bla*KPC-2, *bla*GES-5 AND 16S rRNA METHYLASE *rmt*-D1 BELONGING TO ST1560 RECOVERED OF EFFLUENT IN BRAZIL

Raquel Lima Palermo<sup>1</sup>, Floristher Elaine Carrara-Marroni<sup>2</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Clínica, Hospital Universitário de Londrina, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

Sir,

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen worldwide spread in the environment and hospital settings. Antimicrobial resistance is common in this microorganism due to intrinsic mechanisms and ability to acquired resistance determinants by mobile genetic elements. The beta-lactamases KPC and GES are serine carbapenemases belong to class A of Ambler that show activity against carbapenems, one of the main therapeutic options for treatment of infections caused by multi-drug resistant *P. aeruginosa* (MDRPa). In Brazil, the first report of KPC-producing *P. aeruginosa* was reported in 2012 and involved two isolates recovered from a hospital located in Recife - Pernambuco in 2010 (JÁCOME et al., 2012). The 16S rRNA

methylase, RmtD, accounted high-level resistance to all aminoglycosides, such as amikacin, tobramycin, and gentamicin. RmtD shared a moderate degree of identity with RmtA – (40%), another 16S rRNA methylase that was initially reported to occur in *P. aeruginosa* in Japan in 2003 (YOKOYAMA et al., 2003; DOI et al., 2007). *P. aeruginosa* has a nonclonal epidemic population structure, however recent studies showed evidences of the existence of multidrug resistant global clones, denominated high-risk clones. These are worldwide disseminate and responsible for infections in immunocompromised patients, indicating that isolates from patient may contaminate the environment and vice versa. Here, we report the first occurrence of co-carrying of two carbapenemases KPC-2 and GES-5 and a 16S rRNA methyltransferases RmtD1 harboring *Pseudomonas aeruginosa* isolated from effluent in Brazil in the ST1560. The MDRPa isolate, was recovered in November 2012 at the final effluent, after sewage treatment, of wastewater sewage treatment in Londrina, Brazil. This effluent receives the wastewater that come from 5 mainly hospital in the city. The isolate was firstly identified by conventional biochemical tests and the antimicrobial susceptibility profile was determined using the disk diffusion and broth microdilution methods and the minimum inhibitory concentrations (MICs) was interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016). The molecular identification and carbapenemase, 16S rRNA methylase, oxacilinases and plasmid-mediated quinolone resistance genes detection were performed by PCR as described previously. The amplicon sequencing was performed using the Purelink Kit (Invitrogen, USA) for purification, sequenced by Sanger using the Top Taq Master Mix (QIAGEN, Germany) at the ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) equipment and then analyzed using the BLAST algorithm in the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The genetic context of carbapenemases and multi locus sequence type (MLST) were performed using primers previously described (CACCI et al., 2016). The EF90 strain showed sensibility only to polymyxin B (MIC 0.5 mg/L) and colistin (MIC 0.5 mg/L) and resistance to amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin, piperacillin/tazobactam, aztreonam, ceftazidime (MIC > 256 mg/L), imipenem (MIC >256 mg/L) and meropenem (MIC > 256 mg/L). Sequencing results confirmed that *bla*<sub>GES-5</sub> gene was class 1 integron borne and the *bla*<sub>KPC-2</sub> is associated with the transposon *Tn4401d*. The RmtD1 variant

already has been associated with coproduction of a metallo-beta-lactamase SPM-1 in clinical and environmental isolates of MDRPa in Brazil, but that is the first description of coproduction with two others carbapenemases of class A. The MLST analysis showed that the isolate EF90 belong to the ST1560 which has been found in others states from Brazil since 2015 and associated with acquired determinants of antimicrobial resistance as *bla*<sub>GES-1</sub> and *aac(6)-Ib* (CAVALCANTI et al., 2015). The carbapenemase KPC-2, identified in isolates of *P. aeruginosa* in Brazil, plays an important role in antimicrobial resistance, since it is easy to transfer its resistance determinant in the hospital environment by mobile genetic elements. The *bla*<sub>KPC</sub> gene was found to be associated with transferable plasmids of different sizes and structures containing the transposon Tn4401, from the Tn3 family capable of transposing at high frequency and may be responsible for their rapid dissemination, which makes it difficult to control epidemics, and the treatment of these infections extremely difficult, increasing mortality rates. The enzyme KPC-2 was detected in isolates of *P. aeruginosa* in Colombia, Puerto Rico, Trinidad and Tobago, United States, China, Brazil and Argentina. The GES variant enzymes with carbapenemase activity already described in *P. aeruginosa* were: GES-2 isolated in South Africa; GES-5 isolated in China, South Africa, Brazil, Turkey, India, Mexico, Spain and Japan; GES-6 isolated in Portugal; GES-13 isolated in Greece and Canada and GES-18 isolated in Belgium (WANG et al., 2006; MAURYA et al., 2014), but in our hospital the first report of *bla*<sub>GES-5</sub> in *P. aeruginosa* was in 2015, since then it has disseminated at the hospital setting. We can think of this isolate as a possible precursor of the transmission of this gene to bacterial species that can reach the hospital surroundings through routes of interaction between humans, animals and the environment. Aminoglycosides are considered one of the few options for treatment of infections caused by *P. aeruginosa* carbapenem resistant and the presence of a variant as the 16S rRNA methyltransferase *RmtD1*, that confers high levels of resistance to amikacin and gentamicin is alarming and extremely worrying when highlighted the accumulation of multiple acquired resistance determinants in a single isolate. In conclusion, the presence of *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>GES-5</sub> and 16S rRNA methyltransferase *RmtD1* in *P. aeruginosa* from environment is worrisome considering the dynamic transmission that occurs inter and intra-species at “hot spots” as effluents, mainly due to

the persistence of the MDRPa at water after sewage treatment and the limitation of therapeutic alternatives used for clinical infections. This resistance genotype has never been previously reported in clinical or environmental isolates of *P. aeruginosa* and most likely, it can contribute to the endemicity of multi-resistant phenotypes in Brazilian hospitals.

## REFERENCE

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.

CAVALCANTI, Felipe. L. S. et al. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1003-1009, 2015.

DOI, Yohei et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 852-856, 2007.

JÁCOME, Paula Regina Luna et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990-4990, 2012.

MAURYA, Anand Prakash et al. A report on the presence of GES-5 extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with urinary tract

infection from north-east India. **The Indian journal of medical research**, v. 140, n. 4, p. 565, 2014.

WANG, C., Cai, P., Chang, D., E Mi, Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261-1262, 2006.

YOKOYAMA, Keiko et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **The Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1888-1893, 2003.

## 6 ARTIGO C – (European Journal of Microbiology and Immunology)

*Pseudomonas* spp PRODUTORA DE IMP-16: EVIDÊNCIA MOLECULAR DA DIVERSIDADE CLONAL ENTRE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS

IMP-16 PRODUCING *Pseudomonas* spp: MOLECULAR EVIDENCE OF THE CLONAL DIVERSITY AMONG CLINICAL AND ENVIRONMENTAL ISOLATES

Raquel Lima Palermo<sup>1,2</sup>, Floristher Elaine Carrara-Marroni<sup>2</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Clínica, Hospital Universitário de Londrina, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

### RESUMO

Ao longo da última década, o surgimento e propagação de isolados multirresistentes aos antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos, tornaram-se uma preocupação clínica em muitos países. Os carbapenêmicos são antimicrobianos de amplo espectro altamente potentes, amplamente utilizados na terapia clínica de infecções graves e de difícil tratamento causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. O mecanismo de resistência adquirido mais comum a esta classe é devido a produção de carbapenemases (serino e metalo-beta-lactamases - MBL) em isolados clínicos e ambientais. Entretanto, a resistência ao imipenem ocorre principalmente por alteração da porina específica do imipenem OprD. As MBL são carbapenemases que necessitam de íons de zinco para sua atividade enzimática e são emergentes em todo o mundo, principalmente devido à mobilização de IMP e VIM. Os genes que codificam MBL tem a capacidade de rápida propagação entre bactérias de interesse clínico e ambiental. Esta pesquisa teve como objetivo evidenciar a relação clonal de *Pseudomonas* spp produtoras de IMP-16

isoladas da estação de tratamento de esgoto da região sul de Londrina em 2012 e 2013 e isolados clínicos recuperados do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná - Londrina (HU) durante o período de 2003 a 2016. Os testes de identificação e sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo sistema automatizado Vitek-2 (BioMérieux®) e pelos testes bioquímicos convencionais. Os seguintes genes que codificam a resistência aos antimicrobianos foram pesquisados por PCR multiplex para: beta-lactamases e carbapenemases das classes A, B e D de Ambler, genes de resistência adquirida as quinolonas (*qnr*), aminoglicosídeos (*Rmt*) e colistina (*mcr-1*), e sequenciados pelo método de *Sanger*. A identificação molecular foi realizada para espécies de *Pseudomonas* por análises do gene 16S rRNA e a relação clonal foi analisada por ERIC-PCR. O contexto genético do gene *bla*<sub>IMP-16</sub> foi avaliado por PCR-*mapping* visando elementos constituintes dos integrons. Um total de onze isolados de *Pseudomonas* spp produtores de *bla*<sub>IMP</sub> foram estudados, sendo 6 isolados clínicos recuperados ao longo de 14 anos e 5 isolados ambientais recuperados do afluente hospitalar. Dos onze isolados, 9 (81,8%) foram confirmados como *P. aeruginosa*, incluindo todas as amostras clínicas, e 2 (18,1%) dos isolados ambientais foram identificados pelo RNA16S como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas mendocina*. Todos os isolados carregavam integron de classe 1 associado ao gene *bla*<sub>IMP-16</sub>. Uma alteração no perfil de resistência foi observada para isolados clínicos. Desde 2015, os isolados clínicos foram resistentes a todos os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, assim como os isolados ambientais, divergindo dos isolados previamente recuperados no mesmo hospital que apresentava o gene *bla*<sub>IMP-16</sub> silenciado. A análise de dendrograma mostrou 7 grupos (A-G), que revelam a manutenção do mesmo clone A no hospital em 10 anos exibindo o mesmo perfil de resistência, o que implica que o clone estava bem adaptado em nosso hospital. Nos dois últimos anos, 2 isolados pertencentes aos clones B e C, foram classificados como extensivamente resistentes, assim como as amostras ambientais, sugerindo que a aquisição do gene *bla*<sub>IMP-16</sub>, juntamente com mecanismo de resistência intrínseca contribuem para elevar as taxas de resistência aos antimicrobianos. Considerando que, o gene *bla*<sub>IMP-16</sub> é um determinante de resistência que pode ser adquirido através da transferência lateral de genes e que estava presente nos outros clones recuperados no ambiente, há uma indicação de que outros clones individuais do ambiente hospitalar possam adquirir das cepas ambientais e adaptar-se às unidades hospitalares.

**Palavras-chave:** Diversidade clonal. IMP-16. *Pseudomonas* spp. Efluente. Carbapenemase.

## ABSTRACT

Over the past decade, the emergence and spread of isolates resistant to multiple antibiotics, including carbapenems, have become a serious clinical concern in many

countries. Carbapenem compounds are highly potent broad-spectrum antimicrobial agents largely used in the clinical therapy of severe and difficult to treat infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. The production of carbapenemases (serine- and metallo- $\beta$ -lactamases - MBL) is the most common mechanism of acquired resistance in clinical and environmental isolates to this class of antibiotics. Resistance to carbapenems is usually due to mutational alteration of the imipenem specific porin OprD. MBL are distinguished by need zinc ions for their enzymatic activity and is emerging worldwide mostly due to the mobilization of IMP- and VIM-type. The genes encoding MBL are very threatening because of their ability to spread rapidly among bacteria of clinical and environmental interest. This research aimed to evidence the clonal relation of IMP-16 producing *Pseudomonas* spp. isolated from clinical and environmental samples in southern Brazil during 2003 to 2016. The identification and antimicrobial susceptibility tests were performed by Vitek-2 (BioMérieux®) automated system and conventional biochemical tests. The following antimicrobial resistance codifying genes were screened by multiplex PCR to: beta-lactamases and carbapenemases A, B and D of Ambler classes, acquired resistance genes for quinolones (*qnr*), aminoglycosides (*Rmt*) and colistin (*mcr-1*), and sequenced by the Sanger method. Molecular identification was performed for *Pseudomonas* species based on analyzes of the 16S rRNA gene and the clonal relation was analyzed by ERIC-PCR. The genetic context of *bla*<sub>IMP-16</sub> was evaluated by mapping-PCR targeting integron structure. A total of eleven *Pseudomonas* spp. isolates were studied, 6 clinical isolates recovered along of fourteen years and 5 environmental isolates recovered from the hospital affluent carrying the gene that encode the IMP-16 enzyme. From the eleven 9 (81.8%) were confirmed to be *P. aeruginosa*, including all the clinical samples, and 2 (18.1%) of the environmental isolated were *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. All isolates carried a class 1 integron associated with *bla*<sub>IMP-16</sub> gene and a change on the resistance profile was observed for clinical isolates. Since 2015 the clinical isolates became resistant to all beta-lactams, aminoglycoside and fluoroquinolones as the environmental isolates, diverging of the previously isolates recovered at the same hospital that had the gene silent without activity against carbapenems. The dendrogram analysis displayed 7 cluster (A-G), which revealed the maintenance of the same clone A at the hospital in 10 years exhibiting the same resistance profile implying that the clone A was well adapted at our hospital. In the last two years 2 different clones (B and C) exhibited an extensively resistance profile as the environmental, suggesting that the acquisition of the *bla*<sub>IMP-16</sub> gene along with additional intrinsic resistance mechanism contribute to elevate the resistance rates to antimicrobials. Whereas, the *bla*<sub>IMP-16</sub> gene is a resistance determinant that can be acquired through lateral gene transfer and it was present in the other clones (B-G) present at the environment, there is an indication those others environmental individual clones present in the hospital can acquire the *bla*<sub>IMP-16</sub> gene from the environmental isolates and adapt to the hospital units.

**Keywords:** Clonal diversity. IMP-16. *Pseudomonas* spp. Wastewater. Carbapenemase.

## INTRODUCTION

The extensive use of antimicrobials in agriculture, livestock and human and veterinary medicine activity has led to the increase of antimicrobial resistance among clinical and environmental isolates. Aquatic environments like rivers and sewage plants can act as reservoirs of multidrug-resistance (MDR) bacteria, making easier their transmission to humans and animals (TURANO et al., 2016).

*Pseudomonas* spp are non-fermenting Gram-negative bacilli frequently isolated from soil and water. In the last decades, these bacteria have been isolated in water derived from surface water and sewage treatment plants (OLGA et al., 2016). These species present high potential for adapting to various environments, including in humans, colonizing several anatomical sites in immunocompromised individuals. However, these bacteria are also important opportunistic pathogens associated with serious nosocomial infections (OLGA et al., 2016).

Carbapenems are first-line therapeutic options for treating infections caused by multidrug resistant (MDR) *Pseudomonas* spp (GEORGIOS E MARIA, 2014).

However, *Pseudomonas* spp are capable of modulate and combine different intrinsic mechanisms of antimicrobial resistance such as down regulation or loss of porins, overexpression of efflux pumps, substantial production of chromosomal encoded AmpC beta-lactamase and target alterations (PICÃO et al., 2012).

The overexpression of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and MexXY-OprM efflux systems and alteration in the OprD porin expression has been implicated in multidrug resistance phenotypes that can contribute to carbapenem resistance, especially imipenem and meropenem. In addition, acquired beta-lactamases, such as extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) and carbapenemases, metallo-beta-lactamases (MBLs), and oxacilinases (OXAs), have been extensively reported worldwide as determinants of beta-lactam resistance among *P. aeruginosa* clinical isolates (FEHLBERG et al., 2012).

Acquired resistance to carbapenems can be mediated by the production of specific carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases (carbapenemases), such as the metallo-beta-lactamases (MBLs) IMP, VIM and SPM. These enzymes are frequently

reported in *Pseudomonas* spp and considered the most clinically significant mechanism of carbapenem resistance. Metallo-beta-lactamases (MBLs, Ambler class B) are usually zinc dependent enzymes which hydrolyse the cyclic amide bond of the beta-lactam ring (SADER et al., 2005).

MDR bacteria have found several routes of entry into the environment, such as sewage from the community or hospitals, which have become hot spots for horizontal transfer of antibiotic resistance genes (LABARCA et al., 2016).

Most mobile MBL genes are part of a gene cassette consisting of a single gene and a downstream recombination site usually associated with class 1 and 3 integrons, apart from SPM-1, for which the genetic environment is chromosomal. Integrons are considered as potentially mobile DNA elements with a site-specific recombination site (*attI*) able to capture genes (PELLEGRINI et al., 2009).

The risk is that typical resistance genes from nosocomial isolates could be transferred to environmental bacteria, spreading into several compartments due to the mobilization of mobile genetic elements as integron (PELLEGRINI et al., 2009).

*Pseudomonas* spp carrying IMP-16 was first reported in Brazil and since then is becoming a major concern as it is revealing the second main MBL type in Brazil. This research aimed to show the clonal relation of *Pseudomonas* spp producing IMP-16 isolated from the Southern Treatment Plant Sewage of Londrina in 2012 and 2013 and clinical isolates recovered from the Hospital Universitário de Londrina (HU) during 2003 to 2016.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Bacterial isolates and antimicrobial susceptibility**

A total of 11 clinical and environmental isolates of *Pseudomonas* spp. were included in this study. The six clinical isolates were recovered at the Clinical Microbiology Laboratory of Hospital Universitário de Londrina (HU) during 2003 to 2016.

The environmental isolates were obtained from water samples collected in the effluent of the HU and of the affluent at the Sewage Treatment Station of Limoeiro

(EETE Limoeiro), where the hospital wastewater is discarded along with the waste from the South and Central regions of Londrina city. Other samples were obtained at the affluent of the sewage treatment plant in the southern region called ETE-SUL, where the sewage of EETE Limoeiro and other parts of the city meet and the treatment is processed. The collections were at two different points in the ETE-SUL effluent and at the Cambezinho River, 200 meters from the ETE-SUL, where the water drain. The samples collection was performed two times with a 4 month interval (November, 2012 and February, 2013).

The identification were performed by automated and conventional biochemical tests. The antimicrobial susceptibility profile was determined by disk-diffusion method (Kirby-Bauer) and broth microdilution as standardized in CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), document M07-A11 (2012) and document M07-A9 respectively.

The automated systems Vitek® II (BioMérieux), MicroScan® (Siemens) and Phoenix (Becton Dickinson) were also used. The following antimicrobials were tested by disc-diffusion: Aztreonam (ATM), Cefotaxime (CTX), Cefepime (CPM), Ceftazidime (CAZ), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Piperacillin+Tazobactam (PPT), Amicacin (AMI), Gentamicin (GEN), Levofloxacin (LVX), Ciprofloxacin (CIP), Polymyxin B (POL) and Colistin (COL).

The minimal inhibitory concentration (MIC) were obtained for ceftazidime, imipenem, meropenem, polymyxin and colistin. *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality-control strains with results within acceptable ranges. The results were interpreted and classified according to document M100-S27 (CLSI, 2017).

### **Molecular identification**

The identification of *P. aeruginosa* isolates were confirmed by PCR according to SPILKER et al., 2004. Non-*P. aeruginosa* species were identified after the 16S RNA sequencing (MENDES et al., 2007).

## Phenotypic detection of carbapenemase production

The *Pseudomonas* spp isolates were tested for the presence of carbapenemases by Modified Hodge test and Blue Carba Test. The detection of metallo beta-lactamases was performed by the Arakawa disc-approximation test (ARAKAWA et al., 2000; LEE et al., 2010; PIRES et al., 2013).

## Detection of antibiotic resistance and virulence encoding genes

The presence of genes encoding extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>PER</sub> and *bla*<sub>VEB</sub>), carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>OXA-143</sub>), quinolone resistance genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* and *qnrVC*), 16S-RMTases (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF* and *rmtG*), *mcr-1* gene was detected by PCR using the Top Taq Master Mix (QIAGEN, Germany) and specific primers and cycling parameters described elsewhere (KRAYCHETE et al., 2016; WANG et al., 2006; MENDES et al., 2007; DALLENE et al., 2010; DOYLE et al., 2012; WOODFORD et al., 2005, 2006b; HIGGINS et al., 2010; WANG et al., 2016; LIU et al., 2016). All amplicons were purified using the Purelink Kit (Invitrogen, USA), sequenced by Sanger using the Top Taq Master Mix (QIAGEN, Germany) at the ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) equipment and then analyzed using the BLAST algorithm in the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## Detection of virulence-associated genes

Detection of the genes encoding for elastase (*lasB*), hemolytic phospholipase (*plcH*), exotoxin A (*toxA*), type III secretion system (*exoU*, *exoS* and *exoY*), extracellular neuraminidase (*nanI*), alginate (*algD*), alkaline phosphatase (*aprA*) and a component of quorum sensing (*lasI*), was performed by PCR using primers

previously described (LANOTTE et al., 2004; MITOV et al., 2010 SABHARWAL et al., 2014; SAWA et al., 2014).

### **Integron PCR-mapping**

To detect genes associated with mobile genetic elements *intI*, *intII* and *intIII*, genetic context of genes encoding acquired determinants of antimicrobial resistance was performed by PCR mapping using specific –IMP primers in combination with 5´CS and 3´CS primers of the conserved regions of class I integrons (PICÃO et al., 2012).

The metallo-beta-lactamase gene can also be flanked by two gene cassettes, *aacA4* and *aadA2*, and genes encoding the aminoglycoside-modifying enzymes AAC(6)-Ib and ANT(3)´ (MAZEL et al., 2000; PLOY et al., 2000; GOLDSTEIN et al., 2001, PELLEGRINI et al., 2009).

### **Clonal relation**

The clonal relatedness was determined by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) between the isolates producing carbapenemases using primers previously described and are as follow ERIC1R (5'-GTGAATCCCCAGGAGCTTACAT) and ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) (MARTINS et al., 2014). The results were interpreted by BioNumerics Software (Applied Maths) using the Dice coefficient for similarity and a 90% cut off (VAN BELKUM et al., 2007).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

A total of 11 *Pseudomonas* spp isolates were studied, 6 clinical isolates recovered along of fourteen years and 5 environmental isolates recovered from the hospital affluent carrying the gene that encode the IMP-16 enzyme. Out of 11, nine

(81.8%) isolates were confirmed to be *P. aeruginosa*, including all the clinical isolates, and 2 (18.1%) from the environment, being identified as *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. An IMP-16 variant has been described before in a clinical isolate of *P. aeruginosa* isolated from a 60-year-old man in a hospital in Brasília, Brazil (MENDES et al., 2004) and in environmental species of *P. putida* and *Pseudomonas stutzeri* recovered from blood and cerebrospinal fluid, respectively, of two children in Rio de Janeiro, Brazil, presents in chromosome of both isolates associate to class1 integron (ANA et al., 2010).

The diversity of *Pseudomonas* species isolated from environmental IMP-16 producing confirm that the microorganisms interaction with clinical isolates that also are IMP-16 producing may contribute for the horizontal transfer of determinants of acquired antimicrobial resistance such mobile genetic elements since resistant bacteria may be released directly into wastewater systems from hospitalized and non-hospitalized patients. The mobile genetic elements still can carry genes encoding beta-lactamases, 16S rRNA methyltransferases and plasmid-mediated quinolone resistance gene (*qnr*), which contribute to the accumulation of resistance determinants limiting even more the antimicrobial therapy.

An in vitro study in 2005 characterized a clinical isolate of *P. aeruginosa* IMP-16 producing and the isolated showed resistance profile for cefepime, ceftazidime and meropenem and susceptible to aztreonam and piperacillin/Tazobactam (SADER, RHOMBERG, JONES, 2005). On the other hand, two samples include in this study, Pa30 and Pa43 that were isolated from HU in 2003 showed susceptibility to aztreonam, piperacillin-tazobactam, imipenem and meropenem, but resistance to ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, gentamicin and tobramycin (PICÃO et al., 2012).

IMP-16 showed that its hydrolyzes for beta-lactams is less efficiently than IMP-1, demonstrating an overall preference for cephalosporins and carbapenems rather than penicillins (MENDES et al., 2004). IMP-16 metallo-beta-lactamase was shown to be phylogenetically related to IMP-22 (94% amino acid identity), although IMP-16 has better activity against cephalosporins, while poorly hydrolyse penicillins and imipenem and meropenem at the respective rates of 100 and 10 times lower than did IMP-22 (PELLEGRINI et al., 2009).

The 4 clinical *P. aeruginosa* recovered from 2003 until 2013 encode the virulence-associated genes *exoS*, *exoU*, *toxA*, *lasB*, *lasI*, *algD*, *aprA* and *plcH*, and the other 2 clinical isolates and 1 environmental that shows higher similarity with these last 2 were positive for *exoS*, *toxA*, *lasB*, *lasI*, *algD*, *aprA* and *plcH* differ only by *exoU*. The others 3 environmental isolates exhibited no virulence genes with exception of the *P. putida* with *toxA*, *lasI*, *algD* and *plcH*. These results show that environmental isolated have less pathogenicity factors that decrease the possibility of infect health people but does not rule out the chance of environmental isolates similar to hospital clones be more pathogenic, increasing frequency of nosocomial infection.

All organisms showed a class 1 integron with the same 5' CS. The 5' CS of the all integrons carried the integrase gene *IntI1* of 1014 bp, the promoter region and the *attI1* site. The 3' CS end included *qacED1* and *sul1* genes, conferring resistance to quaternary ammonium compounds and sulphonamides, respectively, however it was found only by the *P. putida*. For the others isolates we could not determine the final structure of the integron by this technic, since long fragments cannot be determine by conventional PCR assays, although it may also mean that the integrons are composed only by the cassette gene carrying *bla<sub>IMP-16</sub>*. Class 1 integrons contribute significantly to the prevalence and dissemination of antimicrobial resistance genes in clinical and in environmental isolates.

The genetic context of the *bla<sub>IMP-16</sub>*-carrying integron previously described also included a fused form of aminoglycoside-modifying resistance gene *aac(6)-30/aac(6)-Ib*, found in a *P. aeruginosa* isolate (MENDES et al., 2004). Thus in this study we could not associate the aminoglycoside-modifying resistance at the same integron of the *bla<sub>IMP-16</sub>* all isolates were positives to aminoglycoside acetyltransferase *aac(6')-Ib* and/or aminoglycoside adenylyltransferase *aad(2'')*. The aminoglycoside resistance genes appear to be functional and confer significant resistance. Together those determinants confer broad-spectrum-lactam resistance resulting in a situation of great concern regarding the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacilli.

The dendrogram analysis displayed 8 cluster (A-H) (Table 1), which revealed the maintenance of the same clone F at the HU in 10 years exhibiting the same

resistance profile for ceftazidime and imipenem and susceptibility to meropenem, implying that the clone F was well adapted at our hospital. However, in the last two years 2 different clones (G and H) exhibited a different resistance profile to the carbapenems and furthermore antimicrobials anti-*Pseudomonas* other than polymyxins, hence considering these extensively resistance isolates, suggesting that the acquisition of the *bla*<sub>IMP-16</sub> gene along with additional intrinsic resistance mechanism contribute to elevate the resistance rates to antimicrobials. Whereas, the *bla*<sub>IMP-16</sub> gene is a resistance determinant that can be acquired through lateral gene transfer and it was present in the other environment isolates, it is possible that clinical isolates can acquire the *bla*<sub>IMP-16</sub> gene from the environmental isolates and adapt to the hospital units.

MBL genes are rapidly emerging and disseminating among species and the emergence and dissemination of mobile MBL genes represent the most important factor leading to increasing resistance to carbapenems in *Pseudomonas* species.

## CONCLUSION

The monitoring of pathogenic bacteria it is important since it can potentially serve as a source of resistance genes against clinical antimicrobial agents. The environmental spread of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp can be occurring in different countries around the world. Multidrug-resistance *Pseudomonas* spp are not limited to hospital.

The *bla*<sub>IMP-16</sub> gene remained at the HU for 16 years and was associated with MDR isolates. Over 10 years, there was a silent dissemination of the gene *bla*<sub>IMP-16</sub> at the HU and IMP-16 is considered the second most widespread metallo-beta-lactamase at this hospital and for all isolates, the gene *bla*<sub>IMP-16</sub> was associated with mobile genetic elements.

Hospital effluents represent a reservoir for bacteria and antimicrobials, which can contribute to resistance due to the lateral transfer of resistance genes and the selective pressure of MDR isolates. The effluent are significant vehicles of dissemination of antimicrobial resistance in the environment. This research lay emphasis on the need

to create measures of controls and surveillance of discharge of hospital wastewater in order to inhibit the spread of MDR pathogens to outside hospitals.

Table 1. Antibiotic susceptibility testing results and associated genes of clinical and environmental isolates of *bla*<sub>IMP-16</sub> producing *Pseudomonas* spp.

| Isolate | Specie               | Date of isolation | Isolation site    | Material           | ERIC cluster | Resistance and Virulence genes                 | Integron class I genes   | MIC (ug/ml) |     |     |     |     | Disk diffusion |     |     |     |     | Patient outcome |     |            |
|---------|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------|--|--|-------------|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----------------|-----|------------|
|         |                      |                   |                   |                    |              |  |  | CAZ         | IMP | MEM | POL | COL | AMI            | GEN | CIP | LEV | PPT |                 | AZT | CEF        |
| EF 26   | <i>P. aeruginosa</i> | 12/11/2012        | E.E.T.E. Limoeiro | Water              | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub>                             | 128         | 128 | 32  | 1   | 2   | R              | R   | S   | S   | R   | R               | R   | -          |
| EF 27   | <i>P. mendocina</i>  | 12/11/2012        | E.E.T.E. Limoeiro | Water              | B            | <i>qnrVc plcH</i>                              | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub>                             | 64          | 8   | 8   | 0.5 | 1   | R              | R   | R   | R   | S   | S               | R   | -          |
| EF 63   | <i>P. putida</i>     | 12/11/2012        | Affluent          | Water              | C            | <i>toxA lasI algD plcH</i>                     | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub><br><i>qacEΔE/s uI1 3'CS</i> | 64          | 8   | 64  | 2   | 1   | R              | R   | R   | R   | R   | R               | R   | -          |
| EF 142  | <i>P. aeruginosa</i> | 12/11/2012        | HU                | Water              | D            | <i>exoS</i>                                    | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub>                             | 64          | 8   | 64  | 0.5 | 1   | R              | R   | R   | R   | R   | R               | R   | -          |
| EF 673  | <i>P. aeruginosa</i> | 27/02/2013        | Affluent          | Water              | E            | -  | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub>                             | 128         | 128 | 2   | 0.5 | 0.5 | R              | R   | R   | R   | R   | R               | R   | -          |
| 30      | <i>P. aeruginosa</i> | 29/04/2003        | Male ward         | Tissue             | F            | <i>exoS exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i> | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub><br><i>qacEΔE/s uI1 3'CS</i> | 128         | 8   | 2   | 0.5 | 0.5 | R              | R   | R   | R   | S   | R               | R   | Discharged |
| 43      | <i>P. aeruginosa</i> | 16/06/2003        | Ambulatory        | Urine              | F            | <i>exoS exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i> | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub><br><i>qacEΔE/s uI1 3'CS</i> | 128         | 8   | 2   | 0.5 | 0.5 | S              | R   | R   | S   | S   | S               | S   | Discharged |
| 2665    | <i>P. aeruginosa</i> | 14/02/2013        | Male ward         | Urine              | F            | <i>exoS exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i> | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub><br><i>qacEΔE/s uI1 3'CS</i> | 128         | 8   | 2   | 0.5 | 0.5 | R              | R   | R   | R   | S   | S               | R   | Death      |
| 2792    | <i>P. aeruginosa</i> | 11/04/2013        | ICU               | Swab               | F            | <i>exoS exoU toxA lasB lasI algD aprA plcH</i> | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub><br><i>qacEΔE/s uI1 3'CS</i> | 128         | 8   | 2   | 0.5 | 0.5 | R              | R   | R   | R   | S   | S               | R   | Death      |
| 123/15  | <i>P. aeruginosa</i> | 21/05/2015        | ER                | Urine              | G            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub>                             | 32          | 32  | 32  | 2   | 8   | R              | R   | R   | R   | R   | R               | R   | Death      |
| 515/16  | <i>P. aeruginosa</i> | 20/09/2016        | ER                | Tracheal secretion | H            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | 5'CS <i>Int1 bla</i> <sub>IMP-16</sub>                             | 32          | 128 | 16  | 1   | 4   | R              | R   | R   | R   | R   | R               | R   | Death      |

ICU-Intensive care unit; ER-Emergency room; CAZ-ceftazidime; IMP-imipenem; MEM-meropenem; POL-polymyxin; COL-colistin; AMI-amikacin; GEN-gentamicin; CIP-ciprofloxacin; LEV-levofloxacin; PPT-piperacilin+tazobactam; AZT-aztreonam; CEF-cefepime

## REFERENCE

ANA, P. A., Gomes, M. Z., Silva, A. R., Werneck, L., Rodrigues, C. A., Souza, M. J., Asensi, M. D. IMP-16 in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*: potential reservoirs of multidrug resistance. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 9, p. 1130-1131, 2010.

ARAKAWA, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., E Goto, M. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 1, p. 40-43, 2000.

CLINICAL and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

DALLENNE, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., E Arlet, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490-495, 2010.

DOYLE, D., Peirano, G., Lascols, C., Lloyd, T., Church, D. L., e Pitout, J. D. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.

FEHLBERG, L. C., Xavier, D. E., Peraro, P. P., Marra, A. R., Edmond, M. B., E Gales, A. C. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 402-407, 2012.

GEORGIOS, M., E Maria, B. Beta-lactamase and Carbapenemase Detection Methods: An Overview of Recent Patents. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2014.

GOLDSTEIN, C., Lee, M. D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A. O., White, D. G., Maurer, J. J. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 723-726, 2001.

HIGGINS, P. G., Lehmann, M., E Seifert, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 3, p. 305, 2010.

KRAYCHETE, G. B., Botelho, L. A. B., Campana, E. H., Picão, R. C., E Bonelli, R. R. Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated qnr gene families. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7524-7526, 2016.

LABARCA, Jaime A. et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 276-292, 2016.

LANOTTE, Philippe et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **Journal of medical microbiology**, v. 53, n. 1, p. 73-81, 2004.

LEE, K., Lim, Y. S., Yong, D., Yum, J. H., E Chong, Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4623-4629, 2010P.

LIU, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Yu, L. F. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

MENDES, R. E., Kiyota, K. A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S. S., Gales, A. C., Pignatari, A. C.; Tufik, S. Rapid detection and identification of metallo- $\beta$ -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.

MARTINS, H. S. I., Bomfim, M. R. Q., França, R. O., Farias, L. M., Carvalho, M. A. R., Serufo, J. C., e Santos, S. G. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 2, p. 1465-1478, 2014.

MAZEL, D., Dychinco, B., Webb, V. A., e Davies, J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1568-1574, 2000.

MENDES, R. E., Kiyota, K. A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S. S., Gales, A. C., Pignatari, A. C.; Tufik, S. Rapid detection and identification of metallo- $\beta$ -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.

MENDES, R. E., Toleman, M. A., Ribeiro, J., Sader, H. S., Jones, R. N., Walsh, T. R. Integron carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>IMP-16</sub>, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac* (6')-30/*aac* (6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4693-4702, 2004.

MITOV, Ivan; STRATEVA, Tanya; MARKOVA, Boyka. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 588-595, 2010.

OLGA, P., Apostolos, V., Alexis, G., George, V., E Athena, M. Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various Greek aquatic environments. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. 5, 2016.

PELLEGRINI, Cristina et al. Identification of bla IMP-22 in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. 901-908, 2009.

PICÃO, R. C., Carrara-Marroni, F. E., Gales, A. C., Venâncio, E. J., Xavier, D. E., Tognim, M. C. B., E Pelayo, J. S. Metallo- $\beta$ -lactamase-production in meropenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk for silent spread. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 747-751, 2012.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281-4283, 2013

PLOY, M. C., Denis, F., Courvalin, P., e Lambert, T. Molecular Characterization of Integrons in *Acinetobacter baumannii*: Description of a Hybrid Class 2 Integron. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2684-2688, 2000.

SABHARWAL, Neha et al. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. **International journal of molecular epidemiology and genetics**, v. 5, n. 3, p. 125, 2014.

SAWA, Teiji et al. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 668, 2014.

SPIPKER, T., Coenye, T., Vandamme, P., e LiPuma, J. J. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2074-2079, 2004.

TENOVER, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., e Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233, 1995.

TURANO, Helena et al. 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. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 86, n. 1, p. 80-82, 2016.

VAN BELKUM, Alex et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 1-46, 2007.

WANG, C., Cai, P., Chang, D., E Mi, Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261-1262, 2006.

WOODFORD, N., Fagan, E. J., E Ellington, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154-155, 2005.

WOODFORD, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Livermore, D. M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.

## 7 CONCLUSÃO

- Determinantes de resistência adquirida foram detectados em isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas* spp.
- A identificação das espécies de *Pseudomonas* foi determinada por testes moleculares baseados no gene 16S rRNA.
- Os testes fenotípicos confirmaram a produção de carbapenemases nos isolados carreando genes codificadores de carbapenemases, embora a atividade da enzima IMP-16 apresenta-se diminuída quando comparada a outras variantes de MBL ou serino-carbapenemases.
- Foram detectados genes codificadores de carbapenemases da classe A e B em isolados clínicos, e nos isolados ambientais, além das carbapenemases da classe A e B, foi detectado um isolado portador do gene *qnrVC* e dois isolados produtores de *RmtD-1*.
- Os isolados produtores de genes de resistência aos antimicrobianos foram classificados como extensivamente resistentes, apresentando sensibilidade apenas à classe das polimixinas, com exceção de dois isolados produtores de *bla<sub>IMP-16</sub>* recuperados dos anos de 2015 e 2016, que mostraram-se não sensíveis a colistina no teste de determinação da concentração inibitória mínima ao antimicrobiano por microdiluição em caldo, sugerindo que a resistência pode ser devido ao fenômeno de heteroresistência, quando uma subpopulação é resistente ao antimicrobiano, ou um novo mecanismo ou gene pode estar envolvido.
- As metodologias de análise do contexto genético dos genes codificadores de carbapenemases revelou a inserção dos mesmos em integrons de classe 1, para os genes *bla<sub>IMP-16</sub>* e *bla<sub>GES-5</sub>*, ou transposons *Tn4401* para o gene *bla<sub>KPC2</sub>*. Entretanto, novas metodologias devem ser aplicadas em estudos posteriores para determinar a composição completa de cassetes inseridos nos integrons e o suporte genético dos elementos genéticos móveis encontrados, permitindo assim à análise completa do ambiente genético de tais genes.
- Não foi observada relação entre os genes de virulência e resistência aos antimicrobianos encontrados, exceto para os isolados ambientais que

produziram poucos fatores de virulência quando comparados aos isolados clínicos, que apresentaram uma frequência significativa desses genes, o que resulta na alta capacidade que este microrganismo tem de causar danos aos pacientes.

- A diversidade genotípica, observada pela determinação da relação clonal, entre os isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas* spp. produtores de carbapenemases indica que a pressão seletiva exercida pela utilização de antimicrobianos possa ocorrer no HU e no ambiente.

- A realização deste trabalho contribuiu para vigilância epidemiológica e controle de infecções hospitalares no HU. Os dados obtidos com esta pesquisa, forneceram subsídios para que a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar possa realizar o controle da disseminação de genes que conferem resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa*, o que permite, a adoção de medidas que possam contribuir para a diminuição das taxas locais de resistência e, conseqüentemente, diminuir o número de pacientes internados acometidos por infecções de origem hospitalar que contribuem para os elevados índices de mortalidade.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

Tabela de resultados dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de *bla<sub>SPM</sub>*

| <i>P. aeruginosa</i> isolate | Date of isolation | Isolation site      | Hospital Unit  | ERIC cluster | Virulence genes                                | MIC (ug/ml) |      |      |     |     |     |     |     | Disk diffusion |     |     |     |            | Patient outcome |
|------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|--------------|--|-------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|------------|-----------------|
|                              |                   |                     |                |              |  | CAZ         | IMP  | MEM  | POL | COL | AMI | GEN | CIP | LEV            | PPT | AZT | CEF |            |                 |
| Pa 357/15                    | 04/09/2015        | Urine               | Male ward      | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 4   | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | S   | R   | Death      |                 |
| Pa 428/15                    | 23/10/2015        | Tracheal secretion  | Isolation ward | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 1   | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | Death      |                 |
| Pa 438/15                    | 29/09/2015        | Abdominal secretion | ICU            | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 1   | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | S   | R   | Death      |                 |
| Pa 468/15                    | 15/07/2015        | Secretion of wand   | BCU            | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 1   | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | S   | R   | Discharged |                 |
| Pa 510/15                    | 17/10/2015        | Urine               | Female ward    | A            | <i>exoS toxA lasB lasI aprA plcH</i>           | >256        | >256 | >256 | 0.5 | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | Discharged |                 |
| Pa 528/15                    | 31/10/2015        | Tracheal secretion  | ICU            | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 0.5 | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | S   | R   | Discharged |                 |
| Pa 561/15                    | 25/11/2015        | Tracheal secretion  | ICU            | A            | <i>exoY exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i> | >256        | >256 | >256 | 0.5 | 2   | R   | R   | R   | R              | S   | S   | R   | Death      |                 |
| Pa 613/15                    | 17/11/2015        | Tracheal secretion  | ICU            | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 0.5 | 16  | R   | R   | R   | R              | R   | S   | R   | Death      |                 |
| Pa 614/15                    | 29/11/2015        | Tracheal secretion  | ICU            | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | 128  | 0.5 | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | Death      |                 |
| Pa 678/15                    | 14/08/2015        | Urine               | ICU            | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 2   | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | S   | R   | Death      |                 |
| Pa 05/16                     | 07/01/2016        | Urine               | Male ward      | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 1   | 2   | S   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | Discharged |                 |
| Pa 111/16                    | 08/03/2016        | Urine               | Isolation ward | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 1   | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | S   | R   | Death      |                 |
| Pa 165/16                    | 27/02/2016        | Tracheal secretion  | ICU            | A            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i>      | >256        | >256 | >256 | 0.5 | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | Death      |                 |
| Pa 344/16                    | 11/07/2016        | Urine               | Male ward      | A            | <i>exoS toxA lasB lasI aprA plcH</i>           | >256        | >256 | >256 | 1   | 2   | R   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | Discharged |                 |

ICU-Intensive care unit; BCU- Burn care unit; CAZ-ceftazidime; IMP-imipenem; MEM-meropenem; POL-polymyxin; COL-colistin; AMI-amikacin; GEN-gentamicin; CIP-ciprofloxacin; LEV-levofloxacin; PPT-piperacilin+tazobactam; AZT-aztreonam; CEF-cefepime

## APÊNDICE B

Tabela de resultados dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de *bla*<sub>GES</sub>

| <i>P. aeruginosa</i> isolate | Date of isolation | Isolation site     | Hospital Unit  | ERIC cluster | Virulence genes                           | Integron class I gene  | MIC (ug/ml) |     |     |     |     |     |     | Disk diffusion |     |     |     |     | Patient outcome |
|------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|--------------|---|--|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----------------|
|                              |                   |                    |                |              |   |  | CAZ         | IMP | MEM | POL | COL | AMI | GEN | CIP            | LEV | PPT | AZT | CEF |                 |
| 09/15                        | 23/01/2015        | Tracheal secretion | ICU            | B            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i> | 5'CS<br><i>Int1 bla</i> <sub>GES-5</sub><br><i>aad aac sul</i> | 32          | 64  | 128 | 1   | 16  | R   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | Death           |
| 212/15                       | 02/04/2015        | Tracheal secretion | ICU            | B            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i> | 5'CS<br><i>Int1 bla</i> <sub>GES-5</sub><br><i>aad aac sul</i> | 32          | 32  | 64  | 1   | 8   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | Death           |
| 449/15                       | 16/10/2015        | Tissue             | Ambulatory     | B            | <i>exoS toxA lasB lasI aprA plcH</i>      | 5'CS<br><i>Int1 bla</i> <sub>GES-5</sub><br><i>aad aac sul</i> | 32          | 64  | 128 | 1   | 2   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | Discharged      |
| 572/15                       | 02/12/2015        | Tracheal secretion | ICU            | B            | <i>exoS toxA lasB lasI algD aprA plcH</i> | 5'CS<br><i>Int1 bla</i> <sub>GES-5</sub><br><i>aad aac sul</i> | 32          | 128 | 128 | 1   | 2   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | Death           |
| 120/16                       | 13/03/2016        | Tracheal secretion | ICU            | B            | <i>exoS toxA lasB lasI aprA plcH</i>      | 5'CS<br><i>Int1 bla</i> <sub>GES-5</sub><br><i>aad aac sul</i> | 32          | 128 | 128 | 0,5 | 2   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | Death           |
| 562/16                       | 04/11/2016        | Urine              | Isolation ward | B            | <i>exoS toxA lasB lasI aprA plcH</i>      | 5'CS<br><i>Int1 bla</i> <sub>GES-5</sub><br><i>aad aac sul</i> | 32          | 128 | 128 | 1   | 2   | R   | R   | R              | R   | R   | R   | R   | Death           |

ICU-Intensive care unit; CAZ-ceftazidime; IMP-imipenem; MEM-meropenem; POL-polymyxin; COL-colistin; AMI-amikacin; GEN-gentamicin; CIP-ciprofloxacin; LEV-levofloxacin; PPT-piperacilin+tazobactam; AZT-aztreonam; CEF-cefepime

## APÊNDICE C

### Dendrograma dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemases

