



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA – CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

STEPHANIE DE ALMEIDA ALVES

**DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Pseudomonas*
aeruginosa MULTIDROGA RESISTENTES**

SOBRAL

2020

STEPHANIE DE ALMEIDA ALVES

DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Pseudomonas*
aeruginosa MULTIDROGA RESISTENTES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Microbiologia aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso
Barbosa

SOBRAL

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A482d Alves, Stephanie de Almeida.
Diversidade genômica de isolados nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes /
Stephanie de Almeida Alves. – 2020.
89 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa.

1. Beta-lactamases. 2. Carbapenemases. 3. Gene bla. 4. Infecção nosocomial. 5. Resistência
antimicrobiana. I. Título.

CDD 610

STEPHANIE DE ALMEIDA ALVES

DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGA RESISTENTES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Microbiologia aplicada.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

Prof. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle (Examinadora)
Universidade Estadual Vale do Acaraú

Prof. Dr. George Táccio de Miranda Candeiro (Examinador)
Centro Universitário Christus (Unichristus)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Joana Darque, meu exemplo de força, pelo amor dedicado a mim e apoio incondicional às minhas escolhas. Você é luz na minha vida!

Ao meu esposo Gustavo, pelo amor, dedicação e compreensão.

Ao meu irmão, Matheus, pela força, incentivo e torcida.

À minha avó Maria (*in memoriam*), que sempre torceu pela realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por cuidar de mim, abençoar os meus caminhos e permitir a realização dos meus objetivos.

À minha família, pelo apoio, torcida e dedicação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa, pelo apoio em todas as etapas desta pesquisa, pela disponibilidade, incentivo e gentileza dispensados a mim durante esses anos e, sobretudo, pelo exemplo.

À Ludmila, por todo o carinho com que me ajudou a vencer os desafios de um laboratório de Microbiologia, por toda a sua contribuição a esta pesquisa, por torcer juntamente comigo por bons resultados e pela amizade.

Ao Paulo de Tarso, pela disponibilidade em solucionar as minhas dúvidas de Biologia Molecular e pelas tantas vezes que me ajudou nos experimentos.

Aos colegas de vida acadêmica Guilherme, Édson, Jessyca, Érica, Marina e Rosineida, por prestarem apoio aos experimentos, por estarem sempre disponíveis quando precisei e pela amizade que construímos.

À Farmacêutica Bioquímica Izabelly Linhares e a Técnica Nádia do Laboratório de Microbiologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, pela concessão das amostras e pela organização cuidadosa dos relatórios.

À Profa. Dra. Suelen Balero de Paula Petrolí, do Laboratório Especial de Microbiologia Molecular e Resistência aos Antimicrobianos da Universidade Estadual de Londrina, pela concessão das cepas pré-caracterizadas e pela disponibilidade em solucionar as minhas dúvidas. A sua gentileza foi inspiração para que eu doasse o melhor de mim para esta pesquisa.

Aos meus amigos de graduação e de vida Ealber, Gisele, Brunno e Luzia, pelo carinho, pela amizade e por me incentivarem nessa caminhada acadêmica.

Aos meus queridos Denyssandra, Karla, Ednara, Gabriela e Nando, pelas orações, pela palavra acolhedora e pela torcida.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Santa Casa de Misericórdia de Sobral pelo apoio financeiro.

A minha gratidão a todos vocês!

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que
a fez tão importante.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo oportunista, multidroga resistente, comumente envolvido em infecções relacionadas à assistência à saúde. O objetivo desse estudo foi investigar o perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* coletados de pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia de Sobral, Ceará, Brasil, no período de março de 2019 a março de 2020 e pesquisar a ocorrência dos genes de resistência *bla*-TEM like, *bla*-SHV like, *bla*-CTX-M 1/2, *bla*-IMP-1, *bla*-KPC like, *bla*-GES like, *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, *bla*-VIM like. A identificação bacteriana e o teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) foram realizados pelo sistema automatizado Vitek®2. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi usada para amplificar os genes de interesse. Um total de 38 espécimes de *P. aeruginosa* foram coletadas no período do estudo e submetidas ao TSA, tendo sido realizada análise molecular de 31 isolados. Pode-se observar altas taxas de resistência às Cefalosporinas e Tigeciclina e menores taxas de resistência ao Imipenem e Meropenem, sendo que a maioria dos isolados foi sensível à Colistina. Dentre os genes que codificam ESBLs, *bla*-CTX-M 1/2 foi o mais prevalente (41,9%), enquanto que o *bla*-GES like foi o mais identificado entre os produtores de carbapenemases (12,9%). Os genes *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1 e *bla*-VIM não foram detectados. Os resultados demonstraram consideráveis taxas de resistência aos betalactâmicos, que podem ser atribuídas à pressão exercida pelo uso indiscriminado de antibióticos no hospital analisado, e cujo controle passa essencialmente pelo aprimoramento das políticas de prescrição de antimicrobianos. Além disso, a prevalência de genes *bla*-CTX-M 1/2 sugere que essas enzimas são as principais ESBLs responsáveis pelo fenótipo de resistência a betalactâmicos entre as cepas analisadas.

Palavras-chave: Beta-lactamases; Carbapenemases; Gene *bla*; Infecção nosocomial; Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic and multi-drug resistant bacillus commonly involved in infections related to healthcare assistance. This study aimed to investigate the antimicrobial susceptibility profile of nosocomial strains of *P. aeruginosa* isolated from inpatients of a teaching hospital in the City of Sobral, Ceará, Brazil (Santa Casa de Misericórdia de Sobral) from March/2019 to March/2020, as well as to assess the occurrence of resistance genes *bla*-TEM like, *bla*-SHV like, *bla*-CTX-M 1/2, *bla*-IMP-1, *bla*-KPC like, *bla*-GES like, *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, *bla*-VIM like. Bacterial identification and antimicrobial susceptibility tests (AST) were performed using the automated system Vitek®2. Conventional polymerase chain reaction (PCR) assays were used to amplify genes of interest. Thirty-eight specimens of *P. aeruginosa* were collected and subjected to AST, and thirty-one isolates were subjected to molecular biology analysis. High resistance rates to cephalosporin and tigecycline and low resistance rates to Imipenem and Meropenem were observed, whereas mostly isolates were sensible to colistin. Among the ESBL-coding genes, *bla*-CTX-M 1/2 prevailed the most (41.9%), while *bla*-GES like was highly identified among the carbapenemase-producing strains (12.9%). The genes *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, and *bla*-VIM were not detected. The results demonstrated considerable resistance rates to beta-lactam antibiotics, which could be attributable to the indiscriminate use of antibiotics in the analyzed hospital, whose control essentially relies on the improvement of antimicrobial prescription policies. Furthermore, the prevalence of *bla*-CTX-M 1/2 genes suggests that these enzymes are the major ESBL responsible for the beta-lactam resistance phenotypes among the analyzed strains.

Keywords: beta-lactamases; carbapenemases; *bla* genes; nosocomial infection; antimicrobial resistance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: *Primers* utilizados para amplificação dos genes de virulência.

Tabela 2: Distribuição dos isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* por setor de hospitalização, sítio de origem, gênero e prevalência dos genes de resistência.

Tabela 3: Influência da expressão gênica na resistência antimicrobiana apresentada por isolados nosocomiais de *P. aeruginosa*.

Tabela 4: Relação dos isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* com coexistência de genes de resistência, antimicrobianos e setor hospitalar.

Tabela 5: Influência do setor de hospitalização, sítio de origem e gênero na detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M ½}.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *P. aeruginosa* identificadas de março de 2019 a março de 2020 na SCMS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI-	Amicacina
BHI -	<i>Brain Heart Infusion</i>
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
CTX-M -	Cefotaximase
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DNase -	Enzima que degrada Ácido desoxirribonucleico
ER-	Extensivamente resistente
GES -	<i>Guiana Extended Spectrum</i>
IMI-	Imipenem
IMP -	Imipenemase
KPC -	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LAMP -	Laboratório de Microbiologia e Parasitologia
MER-	Meropenem
MDR-	Multidroga resistentes
NDM-	New Delhi metalobetalactamase
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PR-	Pan-resistência
PCR-	Reação em cadeia da polimerase / <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SCMS -	Santa Casa de Misericórdia de Sobral
SHV -	Sulphydryl-Variable β -Lactamase
SPM-	São Paulo metalobetalactamase
TEM -	Temoniera β -lactamase β
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCLE -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSA -	Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana
UFC -	Universidade Federal do Ceará
VIM -	Verona integron-encoded metallo- β -lactamase

LISTA DE SÍMBOLOS

% -	Porcentagem
® -	Marca registrada
μl-	Microlitro
μM -	Micromolar
MgCl ₂ -	Cloreto de magnésio
ml -	Mililitro
mM -	Milimolar
°C -	Grau Celsius
U -	Unidades
β -	Beta
h -	Horas
p -	Nível de Significância
s -	Segundos
X -	Veze (multiplicação)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2	Relevância clínica das <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.3	Resistência a antimicrobianos	19
2.4	Mecanismos de resistência	21
2.4.1	<i>Perda de porinas</i>	22
2.4.2	<i>Sistemas de efluxo</i>	23
2.4.3	<i>Betalactamases</i>	23
2.4.3.1	Famílias TEM e SHV.....	24
2.4.3.2	Família CTXM	26
2.4.3.3	Família IMP.....	28
2.4.3.4	Família VIM.....	29
2.4.3.5	Família KPC.....	30
2.4.3.6	Família SPM.....	31
2.4.3.7	Família NDM.....	31
2.4.3.8	Família GES.....	32
2.5	Fatores de virulência	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	Aspectos Éticos	37
4.2	Tipo de estudo	37
4.3	Critérios de inclusão e exclusão	37
4.4	Coleta de dados	37
4.5	Teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA)	38
4.6	Reativação de isolados	38
4.7	Extração de DNA	39
4.8	Deteccção dos genes de resistência por PCR	39
4.9	Análise estatística	41

5	RESULTADOS	42
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	52
8	REFERÊNCIAS	53
9	APÊNDICE I	64
10	APÊNDICE II	66
11	ANEXO I	67
12	ARTIGO GENOMIC DIVERSITY OF MULTIDRUG-RESISTANT <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ISOLATED FROM A BRAZILIAN TEACHING HOSPITAL. (SUBMETIDO AO THE JOURNAL OF INFECTION IN DEVELOPING COUNTRIES)	71

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo, comumente envolvido em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e que pode ser considerado um patógeno oportunista, uma vez que afeta pacientes imunocomprometidos (KIM *et al.*, 2016).

Esse microrganismo tem sido associado a uma ampla variedade de infecções, como, pneumonias, infecções do trato urinário, queimaduras, infecções do sítio cirúrgico, fibroses císticas, infecções ósseas e articulares e infecções sistêmicas em indivíduos imunossuprimidos, como pacientes portadores de HIV positivo, câncer e úlceras de leito. As infecções do trato urinário estão relacionadas ao uso de cateteres contaminados pela microbiota do paciente e por microrganismos presentes nas mãos dos profissionais (SADER *et al.*, 2017; RIQUENA *et al.*, 2020).

Uma capacidade notável de adquirir mais mecanismos de resistência a várias classes de agentes antimicrobianos é uma importante característica desse bacilo (SUBEDI *et al.*, 2017), sendo que as infecções causadas por espécimes multirresistentes (MDR) representam um desafio para a terapêutica, estando associadas ao aumento das taxas de morbimortalidade, bem como dos custos de hospitalização (ARCA-SUARÉZ *et al.*, 2019).

Os carbapenêmicos são potentes betalactâmicos utilizados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* MDR. No entanto, a produção de carbapenemases tem provocado o aumento das taxas de resistência a esses antimicrobianos, limitando o seu uso e reduzindo as opções de tratamento para essas enfermidades (BALEIRO-DE PAULA *et al.* 2017).

Carbapenemases são betalactamases com capacidades hidrolíticas versáteis. Apresentam a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Essas enzimas são codificadas por genes que podem ser transferidos lateralmente e que estão associados a determinantes de resistência de outras classes de antimicrobianos. Atualmente, a propagação de microrganismos produtores de carbapenemases, especialmente entre bactérias gram-negativas, é um problema de saúde pública de grande importância e que deve ser investigado, a fim de controlar sua disseminação (BIALVAEI *et al.*, 2015).

Além dos diversos mecanismos de resistência detectados entre isolados de *P. aeruginosa*, este microrganismo pode produzir fatores de virulência, que atuam

aumentando o dano tecidual, causando morte celular, necrose e auxiliando as bactérias a evadir o reconhecimento do sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento e manutenção do processo infeccioso (MORADALI *et al.*, 2017).

Assim, conhecer o perfil de sensibilidade e identificar os fatores genéticos envolvidos na resistência antimicrobiana em isolados de *P. aeruginosa* de um hospital de ensino da região Norte do Ceará é uma ferramenta útil na geração de informações epidemiológicas, as quais podem auxiliar os profissionais de saúde na prevenção da disseminação desses patógenos e na escolha de uma terapia medicamentosa adequada, bem como para a implementação de medidas necessárias para se evitar a disseminação destes patógenos no ambiente hospitalar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria pertencente à família Pseudomonaceae, sendo considerada a espécie mais importante do gênero *Pseudomonas*. Caracteriza-se como um bacilo gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito e não-fermentador de glicose, medindo em torno de 0,5-1,0 x 1,5 a 5 µm. Esse microrganismo é amplamente difundido no solo, na vegetação na matéria orgânica em decomposição, em animais e em ambientes aquáticos, podendo ocorrer como bactéria isolada ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (HIRSH e TAM 2010).

Esse patógeno é capaz de produzir quatro tipos de pigmentos: piocianina, pioverdina, piomelanina e piorrubina, sendo os dois primeiros os mais frequentemente detectados. A piocianina confere às colônias uma coloração azulada, enquanto que a pioverdina uma coloração amarelo-esverdeada. Quando ambos os pigmentos são produzidos, pode-se observar uma coloração verde-metálica. Piomelanina e piorrubina, que são sintetizados por aproximadamente 2% dos isolados, proporcionam às colônias colorações marrom/preta e avermelhada, respectivamente. A piocianina é considerada um fator de virulência, o qual retarda o crescimento de outras bactérias, facilitando a colonização dessa bactéria. Nenhum outro bacilo gram-negativo não fermentador produz piocianina, logo sua presença pode identificar a espécie. Somente cerca de 4% de espécimes de amostras clínicas não produzem piocianina, sendo chamadas de amostras apiocinogênicas (HOCQUET *et al.*, 2009; BROOKS *et al.*, 2014).

Suas colônias podem apresentar diversos morfotipos, até mesmo quando isoladas de um único paciente, sendo as colônias planas com bordas rugosas e brilho metálico as mais frequentemente isoladas, embora também possam se apresentar pequenas e lisas, ou ainda colônias grandes e mucoides, estando essa última geralmente associada a pacientes com fibrose cística e outras infecções respiratórias crônicas (SKOVEC *et al.*, 2012).

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

Esta espécie é capaz de utilizar muitos compostos orgânicos de baixo peso molecular como fontes de carbono e nitrogênio e, assim, apresenta necessidades

nutricionais simples, crescendo facilmente em muitos tipos de meios de cultura ou até mesmo em água destilada (CORNELIS, 2008; MURRAY *et al.*, 2017).

2.2 Relevância Clínica das *P. aeruginosa*

A infecção hospitalar, em todo o mundo, é considerada um grave problema de Saúde Pública, crescendo tanto em incidência quanto em complexidade, gerando implicações sociais e econômicas. Infecção hospitalar é qualquer infecção adquirida após a internação de um paciente em um hospital e pode se manifestar durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a hospitalização (BRASIL, 1998), podendo ser denominadas também de IRAS. São consideradas o evento adverso mais comum das hospitalizações e têm ameaçado a segurança dos pacientes em todo o mundo (ALBUQUERQUE, 2014), especialmente quando são causadas por bactéria MDR e de elevada patogenicidade, aumentando o tempo e os custos de internação e, principalmente, as taxas de morbimortalidade. Nos hospitais de ensino, as taxas de infecções nosocomiais são consideravelmente mais altas que em outros equipamentos de saúde (EVANS *et al.*, 2007).

No Brasil, apesar de não haver uma sistematização dos dados, estima-se que aproximadamente 5% a 15% dos pacientes hospitalizados e 25% a 35% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapias Intensivas (UTIs) adquiram algum tipo de infecção hospitalar, sendo esta, em geral, a quarta causa de mortalidade (OLIVEIRA *et al.*, 2016; LORENZINI *et al.*, 2013).

P. aeruginosa é um dos principais agentes etiológicos de infecções respiratórias no mundo, como pneumonias associadas ou não à ventilação mecânica, apresentando maior prevalência em UTIs. Em diversos hospitais europeus, esse foi o patógeno mais frequentemente isolado em episódios de pneumonias nosocomiais, sendo que, na Espanha, é o agente causador de 21% dos episódios de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV). (DJORDJEVIC *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2017). Outros estudos também apontam *P. aeruginosa* como principal bacilo gram negativo causador de PAV em pacientes hospitalizados no Brasil (SADER *et al.*, 2014; LUCENA *et al.*, 2014).

Dados do programa SENTRY mostraram que, no território nacional, *P. aeruginosa* foi o patógeno mais frequentemente isolado em pacientes com pneumonia hospitalar, a segunda causa mais frequente de infecção urinária e infecção de ferida cirúrgica e o sétimo patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea nos

hospitais avaliados pelo programa. Foi, também, o segundo patógeno mais frequente em pacientes queimados. Em crianças e neonatos, essa bactéria tem sido relacionada como um importante causador de infecções graves, levando a diversas consequências como sepse, infecções do trato urinário, PAV, infecções de pele e mucosas e infecções respiratórias associadas à fibrose cística (FERRAREZE *et al.*, 2007; RIQUENA *et al.*, 2020).

Numa compilação de dados entre os anos 1997 e 2017, realizada também pelo Programa SENTRY, a infecção mais comum da qual *P. aeruginosa* foi isolada foi a pneumonia em pacientes hospitalizados (44,6%) seguida por infecção da corrente sanguínea (27,9%), com pneumonia tendo uma taxa ligeiramente maior de MDR (27,7%) do que infecções da corrente sanguínea (23,7%). A região com a maior porcentagem de fenótipos MDR foi a América Latina (41,1%), seguida pela Europa (28,4%). As taxas de MDR foram mais altas em 2005–2008 e diminuíram no período mais recente. A colistina foi a droga mais ativa testada (99,4% suscetível), seguida pela amicacina (90,5% suscetível) (SHORTRIDGE *et al.*, 2019).

2.3 Resistência a antimicrobianos

A resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos pode variar entre países, regiões e de acordo com a origem do microrganismo, que pode ser hospitalar ou comunitária e pode ser um fenômeno genético ou não. Os fenômenos genéticos estão relacionados com a existência de genes ou elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) presentes nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação das drogas, sendo conhecidos como resistência adquirida (CHROMA; KOLAR, 2010).

Os plasmídeos são elementos extracromossomais de DNA circular presentes em bactérias, capazes de se replicar independente do hospedeiro. Dessa forma, a resistência proveniente de alterações fisiológicas ou estruturais pode ser levada a diversos ambientes e de diversas formas, principalmente através da transferência horizontal de genes de resistência dentro desses plasmídeos (MATHERS *et al.*, 2015).

Em relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), de 2019, foram estipuladas dez prioridades para o referido ano, sendo a resistência antimicrobiana considerada a quinta prioridade. Para essa organização, o desenvolvimento de antibióticos pode ser considerado um dos maiores êxitos da Medicina moderna, no entanto, a eficácia

dessas drogas está reduzindo consideravelmente, tornando-se um desafio para a humanidade.

A resistência intrínseca e a notável capacidade de *P. aeruginosa* em adquirir genes que codificam resistência são responsáveis pela múltipla resistência a diversos antimicrobianos como consequência da forte pressão que seleciona fenótipos adaptados a condições específicas do hospedeiro e do ambiente hospitalar (KAISER *et al.*, 2017). O aumento da prevalência de infecções hospitalares por *P. aeruginosa* MDR é um problema mundial e compromete severamente a terapêutica, conduzindo a desfechos clínicos adversos, incluindo o aumento das taxas de mortalidade. (PEÑA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015).

O isolamento de *P. aeruginosa* MDR tem sido frequente nos últimos anos. Vários agentes antimicrobianos têm se tornado menos ativos, reduzindo o número de opções medicamentosas e aumentando o impacto clínico de infecções nosocomiais (KARLOWSKY *et al.*, 2017).

Os carbapenêmicos Imipenem e Meropenem são betalactâmicos de amplo espectro, derivados da tienamicina, com atividade bactericida no tratamento de infecções provocadas por isolados MDR de *P. aeruginosa*. Possuem considerável estabilidade diante da maioria das betalactamases, incluindo as β -lactamases de Espectro Ampliado (ESBL); por essa razão, os carbapenêmicos são considerados fármacos de reserva, frequentemente empregados como último recurso no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias gram-negativas resistentes aos demais betalactâmicos ou a outros antibacterianos (CHUANG *et al.*, 2014).

A frequência de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos tem aumentado significativamente e como a indústria farmacêutica não tem lançado uma alternativa terapêutica com um espectro de atividade similar ou superior a eles, o atual prognóstico das infecções por bactérias MDR muitas vezes é desfavorável. Nesses casos, o panorama atual da antibioticoterapia restringe-se a alternativas terapêuticas com fármacos considerados inadequados devido à sua alta toxicidade, como, por exemplo, as polimixinas (polimixina B e colistina), as quais, muitas vezes, não se encontram disponíveis comercialmente no Brasil (OLIVEIRA, *et al.*, 2009).

A disseminação de resistência aos carbapenêmicos ocorre devido à produção de enzimas carbapenemases. Essas diferentes enzimas estão muito relacionadas com organismos com perfil de resistência a múltiplas drogas, como é o caso da *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, que ao adquirirem uma carbapenemase, podem se tornar

vetores de transmissão dessas enzimas a alguns membros da família *Enterobacteriaceae*. Além disso, a resistência devido à produção de carbapenemases em diversos isolados, frequentemente, está acompanhada de outro fator de resistência, como a produção de ESBL (NORDMANN *et al.*, 2012).

Um isolado de *P. aeruginosa* é definido como MDR quando não apresenta sensibilidade a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos. Isolados não sensíveis a pelo menos um agente em todas as 30 categorias de antimicrobianos com exceção de duas classes, ou seja, se os isolados bacterianos permanecerem sensíveis a uma ou duas categorias estes serão considerados extensivamente resistentes aos antimicrobianos (ER). Pan-resistência (PR) aos antimicrobianos foi definida como não sensibilidade a todos os agentes antimicrobianos, em todas as classes (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Aproximadamente 27,0% de *P. aeruginosa* isoladas na América Latina são MDR (VEGA e DOWZIKHY, 2017). Notadamente, nesta região, foram observadas maiores taxas de resistência em relação aos demais continentes, inclusive em relação aos isolados recuperados nos EUA (GALES *et al.*, 2012). Além disso, verificou-se que houve uma tendência global de aumento de resistência ao longo do tempo e que a distribuição se alterou entre as diversas regiões (LIU *et al.*, 2015). Ainda na América Latina, reportou-se, em média, 27,6% e 34,7% de isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao Imipenem e Meropenem, respectivamente. Além disso, observou-se taxas de resistência ao Meropenem na Argentina (53,8%), Brasil (46,7%), Chile (33,3%) e México (28,8%) (GALES *et al.*, 2012). Mais recentemente, nesta mesma região, foram observadas elevadas taxas de resistência ao Meropenem (36,9%) e esses valores foram ainda maiores em isolados MDR (90,0%) (VEGA e DOWZIKHY, 2017). Outro estudo relatou que 24,9% dos isolados foram resistentes aos carbapenêmicos e essas taxas aumentam ainda mais quando avaliadas amostras de UTIs (KARLOWSKY *et al.*, 2017). No Brasil há relatos de taxas de resistência aos carbapenêmicos entre 22,9% e 45,8% (DE ALMEIDA SILVA *et al.*, 2017).

2.4 Mecanismos de Resistência

O desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* tem um impacto clínico considerável já que compromete a eficácia de quase todas (ou mesmo todas) as drogas utilizadas para seu tratamento (DOI *et al.*, 2007).

Dentre os mecanismos de resistência aos betalactâmicos, o mais importante é a produção de enzimas betalactamases, no entanto, a resistência também pode ser ocasionada pela hiperexpressão de sistemas de efluxo, pela alteração da permeabilidade da membrana (FUENTEFRÍA *et al.*, 2009) e pela síntese de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) com baixa afinidade por β -lactâmicos. Em *P. aeruginosa*, todos esses mecanismos podem existir simultaneamente (STRATEVA *et al.*, 2009). Além disso, essa bactéria é intrinsecamente resistente a diversos antimicrobianos, como as cefalosporinas de primeira e segunda geração, macrolídeos, tetraciclinas, sulfametoxazol-trimetropim, clorafenicol, rifampicina e tigeciclina (XIA *et al.*, 2016). Abaixo, estão descritos os principais mecanismos.

2.4.1 Perda de Porinas

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

Geralmente, os carbapenêmicos, antibióticos pequenos e hidrofílicos, penetram na célula de *P. aeruginosa* através de porinas. A principal porina para entrada dos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* é a OprD, cuja inativação por mutações tem sido documentada como causadora de resistência ao Imipenem e, em menor escala, ao Meropenem e ao Doripenem. A OprD é uma porina que forma estreitos canais transmembranares, acessíveis a carbapenêmicos, mas não a outros β -lactâmicos (CHEVALIER *et al.*, 2017). As mutações no gene oprD podem conduzir à inativação da OprD, com perda da porina na membrana externa, o que aumenta as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os carbapenêmicos. Mas, em *P. aeruginosa*, a principal porina expressa é a OprF, a qual permite a entrada de diversos substratos e, por isso, é considerada inespecífica. OprF está associada à virulência deste patógeno, principalmente relacionada à adesão e reconhecimento de células do hospedeiro. Provavelmente, essa é a porina mais utilizada para penetração da maioria dos β -lactâmicos na célula bacteriana (NEVES *et al.*, 2011)

2.4.2 Sistemas de Efluxo

A habilidade de bombear antibióticos para fora das células é a forma mais comum de resistência à maioria das classes de antibióticos. Em *P. aeruginosa*, o efluxo ativo é um importante mecanismo não enzimático de resistência aos β -lactâmicos (STRATEVA *et al.*, 2009). Além de antibióticos, biocidas e detergentes, essas bombas exportam diversas outras moléculas (SCHWEIZER *et al.*, 2003). A expressão de bombas de efluxo é um dos mecanismos responsáveis pela resistência antimicrobiana em biofilmes (SOTO *et al.*, 2004). Os genes que codificam bombas de efluxo localizados no cromossomo estão frequentemente relacionados à resistência intrínseca. A resistência adquirida pode ocorrer devido a mutação e amplificação dos genes que codificam transportadores multidrogas, alterando seu nível de expressão ou atividade, a mutações em genes específicos ou genes regulatórios globais, resultando em uma maior expressão desses transportadores, e transferência de genes entre bactérias, através de plasmídios ou transposons. Uma bomba de efluxo pode apresentar especificidade por um determinado substrato ou pode agir sobre uma ampla variedade de drogas (bombas de efluxo multidrogas), de forma que um único sistema de efluxo pode diminuir a suscetibilidade da célula a um amplo espectro de antimicrobianos, o que representa um dos principais problemas em Medicina (MOREIRA *et al.*, 2004).

Os sistemas de efluxo de maior relevância clínica em bactérias Gram-negativas são os da família RND, vários dos quais são expressos por *P. aeruginosa*. Dentre eles, MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexEMexF-OprN e MexX-MexY-OprM são determinantes significativos para a resistência a diversas drogas (MORITA *et al.*, 2006). Essas bombas são sistemas com três componentes. O primeiro componente é uma proteína localizada na membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF e MexY), que opera como uma bomba dependente de energia com ampla especificidade de substratos. O segundo componente é uma proteína de membrana externa, uma porina (OprM, OprJ e OprN). E a terceira proteína (MexA, MexC, MexE e MexX) se localiza no espaço periplasmático e liga as outras duas. A energia utilizada para o transporte pode ser proveniente da hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) ou do gradiente eletroquímico de prótons (MOREIRA *et al.*, 2004).

2.4.3 Betalactamases

A produção de betalactamases é o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos betalactâmicos em bactérias gram-negativas clinicamente importantes (BUSH; JACOBY, 2010).

A primeira betalactamase codificada por elemento genético móvel foi identificada em *Escherichia coli*, isolada de um paciente chamado Temoniera, nome que designou a enzima TEM-1. A localização em plasmídeos e transposons de TEM-1 possibilitou sua disseminação por transferência horizontal, além de outras espécies de enterobactérias e *P. aeruginosa*. Da mesma forma, SHV-1 tornou-se mundialmente disseminada (SILVA e LICOPAN, 2012).

Estas enzimas podem ser classificadas com base em seu espectro hidrolítico em: Betalactamases ou Penicilinases, ESBL, Betalactamase cromossomal (AmpC) e Betalactamases que hidrolisam carbapenêmicos, também conhecidas como Carbapenemases (ROOD; LI, 2017). As betalactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel betalactâmico das penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, inativando sua ação antimicrobiana (LIVERMORE, 1995; BUSH, 2001). Exemplos deste grupo incluem as betalactamases de espectro restrito TEM-1, TEM-2, TEM-13, SHV-1, SHV-11 e SHV-89 que não têm atividade contra cefalosporinas de terceira e quarta geração (BUSH; JACOBY, 2010). No entanto, com a introdução das cefalosporinas de espectro estendido na prática médica, em meados dos anos de 1980, tais como cefotaxima e ceftazidima, as ESBLs começaram a ser identificadas em amostras clínicas resistentes a esses antimicrobianos (BRADFORD, 2001). Estas enzimas são capazes de hidrolisar antibióticos betalactâmicos de terceira e quarta geração, restando como opção terapêutica apenas os carbapenêmicos (DOI e PATERSON, 2007). São importantes representantes desse grupo as ESBL TEM-3, TEM-10, TEM-26, SHV-2, SHV-3 e SHV-115, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15, que representam as betalactamases mais estudadas (BUSH; JACOBY, 2010). A emergência e a disseminação de ESBLs entre os membros da família *Enterobacteriaceae* têm sido descritas mundialmente como ponto de urgência clínica, devido à grande incidência desses isolados em IRAS (SILVA e LICOPAN, 2012).

Já as carbapenemases são betalactamases com capacidades hidrolíticas versáteis, que apresentam a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Foram descritas pela primeira vez na década de 90 e passaram a ser notificadas todos os anos, com taxas crescentes. Essas diferentes enzimas estão muito relacionadas com organismos que possuem perfil de resistência a múltiplas drogas, como é o caso de *P. aeruginosa*. Esse patógeno, ao adquirir uma carbapenemase, pode se tornar

vetor de transmissão dessas enzimas a alguns membros da família *Enterobacteriaceae*. Além disso, a resistência associada à produção de carbapenemases, em diversos isolados, frequentemente está acompanhada de outro fator de resistência como a produção de ESBL (NORDMANN *et al.*, 2012). Logo, microrganismos com esse perfil apresentam resistência intrínseca a vários antimicrobianos, o que representa um grande risco para pacientes hospitalizados e um grande desafio para a terapêutica (VANEGAS *et al.*, 2016).

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

- Classe A de Ambler: hidrolisam as penicilinas (exceto temocilina), cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima, cefamandole, cefoperazona) e metoxicefalosporinas (cefamicinas) e carbapenêmicos. Estas enzimas não são inibidas por EDTA, mas podem ser inibidas por inibidores de betalactamase como ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam. Podem ser codificadas por plasmídeo ou cromossomos. As famílias GES e KPC estão entre as mais frequentemente identificadas;

- Classe B de Ambler: conferem resistência a todos os betalactâmicos, exceto ao aztreonam. Essas MBLs são geralmente codificadas por plasmídeos. Dentre as famílias mais comuns estão VIM, IMP, SPM e NDM. São detectadas principalmente em *P. aeruginosa*, porém, cada vez mais têm sido encontradas também em espécies de *Acinetobacter* e enterobactérias;

- Classe C de Ambler: denominada AmpC ou cefalosporinases cromossomais. Essas enzimas geralmente são codificadas por genes de localização cromossomal e sua produção confere a hidrólise de piperacilina, cefamicinas, monobactâmicos, e cefalosporinas de 3ª geração, mas não hidrolisam cefepime e nem carbapenêmicos;

- Classe D de Ambler: apresentam a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos, contudo, não apresentam atividade sobre o aztreonam e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração. Além disso, a associação na produção de betalactamases pode levar ao aumento de hidrólise dos antimicrobianos, por exemplo, cefalosporinas de 2ª geração não

são hidrolisadas por ESBLs, mas são hidrolisadas pela associação ESBL/AmpC (ROPY *et al.*, 2015).

2.4.3.1 Famílias TEM e SHV

As ESL tipo TEM e SHV são derivadas de enzimas de espectro restrito TEM -1 e TEM-2 (PATERSON e BONOMO, 2005) e SHV-1, codificadas por genes *bla*-TEM e *bla*-SHV localizados no cromossomo bacteriano (GUPTA *et al.*, 2007). Evoluíram através de mutações pontuais em *bla*-TEM e *bla*-SHV, respectivamente, o que permitiu a remodelagem de seu sítio ativo e expansão de sua atividade hidrolítica (JACOBY; BUSH, 2005). Mutações que codificam a substituição de glicina por serina na posição 238 ou de glutamato por lisina na posição 240, são as mais comuns nas ESBL do tipo SHV, sendo a variação na posição 238 responsável pela resistência à ceftazidima e a variação na posição 240 responsável pela resistência à cefotaxima. De forma geral, os espécimes produtores de TEM e SHV apresentam maior nível de resistência à ceftazidima do que à cefotaxima (BONNET, 2004).

SHV-2 foi a primeira ESBL tipo SHV descrita, sendo identificada em isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens* (KNOTHE *et al.*, 1983). Em 1987 foi descrita uma nova enzima TEM (TEM-3), a primeira ESBL desse tipo que foi identificada em isolados clínicos de *K. pneumoniae* (SIROT *et al.*, 1987). Em 1988, SHV-3 e SHV-4 foram descritas em amostras clínicas de *K. pneumoniae* recuperadas de hospitais na França (JARLIER *et al.*, 1988; BURÉ *et al.*, 1988). Desde então, inúmeros relatos de surtos envolvendo *K. pneumoniae* produtoras de ESBL têm sido reportados (COQUE *et al.*, 2008). Atualmente, ESBLs tipo TEM e SHV são de ocorrência mundial (BONNET, 2004), sendo descritas, inclusive, no Brasil (CORKILL *et al.*, 2001; MENDES *et al.*, 2004). Essas enzimas, codificadas por genes localizados em plasmídeos, disseminaram-se facilmente para outras espécies de bactérias, enfatizando seu significado clínico (JACOBY; MUNHOZ-PRICE, 2005).

2.4.3.2 Família CTXM

Dentre as ESBLs, as cefotaximases (CTX-M) têm provado ser as mais bem-sucedidas em termos de evolução e epidemiologia. Originado de *Kluyvera* sp., o gene *bla*-CTX-M é o responsável pela produção dessa beta-lactamase. Várias mutações nesse

gene originam toda a diversidade dessas enzimas, que se propagaram a um ritmo bastante acelerado, encontrando-se disseminadas por todo o mundo (HUMENIUK *et al.*, 2002).

As ESBL do tipo CTX-M têm a propriedade de conferir resistência a todas as cefalosporinas de espectro estendido, tendo a cefotaxima e ceftriaxona como substratos preferenciais. Além disso, são codificadas por genes localizados em plasmídios, os quais podem abrigar outros genes que podem conferir resistência aos aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas e trimetropim (LIVERMORE *et al.*, 2008).

A disseminação dessas enzimas pode ser dividida em três períodos: o primeiro foi o aparecimento de distintas CTX-M em diferentes e distantes pontos do mundo, e ocorreu entre 1989 a meados de 1990. O segundo é caracterizado pelo aparecimento das CTX-M-3, -9, -14 e -15 e ocorreu entre 1994 a 2000. O terceiro período, a partir de 2000, caracteriza-se pela dispersão mundial destas beta-lactamases, sendo que já foram identificadas 172 variantes dessa enzima (TOLLENTINO *et al.*, 2011).

A primeira CTX-M foi isolada em Munique, Alemanha, em 1989, tendo sido identificada em um isolado clínico de *E. coli*, de uma criança de quatro meses (SILVA e LICOPAN, 2012) e denominada CTX-M-1, por ser cefotaximase. Posteriormente, a mesma enzima foi isolada na França. Em 1992, foi descrita a CTX-M-2, isolada de cepas de *Salmonella*, resistentes à cefotaxima, durante uma epidemia na Argentina (BAUERNFEIND *et al.*, 1996).

No Brasil, a ocorrência de CTX-M foi relatada pela primeira vez no Rio de Janeiro, em 2000, onde foi descrita uma nova variante, a CTX-M-8, produzida por isolados clínicos de *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter amalonaticus* (BONNET *et al.*, 2000). Em 2001, foi descrita também no Rio de Janeiro uma nova enzima isolada de *E. coli*, denominada CTXM-16 (BONNET *et al.*, 2001). Em 2007, uma CTX-M foi pela primeira vez descrita como a ESBL predominante em um serviço de saúde nos EUA, país onde até então, estas enzimas eram consideradas raras. Em 2008, a rápida disseminação de CTX-M comprometendo a eficiência do tratamento de infecções por bacilos gram-negativos foi descrita em um estudo multicêntrico realizado em hospitais norte-americanos (CASTANHEIRA *et al.*, 2008).

Atualmente, as enzimas dos grupos CTX-M-2, CTX-M-15 são as mais prevalentes em território brasileiro, seguidas pelas variantes CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-59 (ROCHA *et al.*, 2016).

Rocha *et al.* (2019) estudaram o perfil genômico de 36 isolados de *K. pneumoniae* na região Norte do Ceará e identificaram que todos os isolados albergavam o gene *bla*_{CTX-M}, sugerindo que essas enzimas foram as principais ESBLs responsáveis pelo fenótipo de resistência a betalactâmicos nas cepas analisadas.

As enzimas CTX-M, difundidas entre várias espécies bacterianas, apresentam uma capacidade de disseminação além do ambiente hospitalar, o que explica seu perfil pandêmico. Isto tem sido demonstrado através do reconhecimento de múltiplos clones e elementos genéticos móveis que carregam genes *bla*_{CTX-M} e sua alta prevalência na comunidade (PITOUT *et al.*, 2008). Cassetes de genes contendo *bla*_{CTX-M}, localizados em transposons inseridos em plasmídeos conjugativos se disseminam horizontalmente entre diversas espécies bacterianas. (ENSOR *et al.*, 2008).

Além disso, a coexistência nos integrons com genes que codificam outras ESBL (*bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}), para a resistência a outras classes de antibióticos como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cefamicinas, sulfas e desinfetantes, como o quaternário de amônio, favorece sua manutenção em função da pressão seletiva exercida pela ampla terapia antimicrobiana e procedimentos de desinfecção (PITOUT *et al.*, 2008).

2.4.3.3 Família IMP

A primeira MBL descrita em *P. aeruginosa* foi a IMP-1 (Imipenemase) em 1988 no Japão, localizada em um integron de classe I. As variantes de IMP parecem ser mais prevalentes na Ásia, sendo comumente encontradas em bacilos Gram-negativos não-fermentadores, como *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. No entanto, já houve relatos da produção dessas enzimas por microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (OSANO *et al.*, 1994; YAN *et al.*, 2001). O primeiro relato de uma MBL no continente americano ocorreu em 2002 por Gibb *et al.* Os autores descreveram a detecção de uma cepa de *P. aeruginosa* num hospital canadense, que apresentava alto grau de resistência à ceftazidima e carbapenêmicos. Análises posteriores revelaram a presença de uma nova enzima, denominada IMP-7.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de amostras produtoras de MBL adquirida ocorreu também em 2002 (PELLEGRINO *et al.*, 2006). Entretanto, esse estudo não caracterizou o determinante de resistência envolvido. Mais tarde, em 2003, uma variante de IMP foi relatada por Gales *et al.* Esses autores descreveram o achado de um

isolado de *A. baumannii*, no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP, produtora de IMP-1. A pesquisa investigou a presença de MBL adquirida em *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes internados no referido hospital, entre maio de 1993 e novembro de 2001. Entre as amostras que apresentaram resistência aos carbapenêmicos, 54,8% eram produtoras de IMP-1, sendo que a emergência desse determinante de resistência foi detectada em amostras bacterianas isoladas a partir de 1998. Além disso, após este ano, a produção de MBL adquirida pareceu ser o mecanismo responsável pelo fenótipo de resistência aos carbapenêmicos nas amostras avaliadas (GALES *et al.*, 2003).

Em outro estudo realizado com isolados bacterianos de pacientes internados no Hospital São Paulo durante os anos de 2002 e 2003, foi detectado o gene *bla*_{IMP-1} em 7 *Acinetobacter* sp. e uma *P. aeruginosa* (CASTANHEIRA *et al.*, 2003). Posteriormente, uma *P. aeruginosa* apresentando fenótipo de resistência a todos os betalactâmicos, bem como ao Imipenem e Meropenem, foi isolada de um paciente internado no Hospital de Base de Brasília, em 2002. Estudos posteriores revelaram tratar-se da presença de uma nova variante de IMP, designada IMP-16 (MENDES *et al.*, 2004). Entre 2003 e 2004, foi evidenciada a primeira ocorrência de um surto hospitalar numa UTI causado por um clone de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e, mais tarde, testes moleculares confirmaram a presença do gene *bla*_{IMP-1} nessas amostras (TOGNIM, 2006).

Em todo mundo, já foram descritas 58 variantes de IMP, detectadas em diversas espécies, principalmente em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e enterobactérias (WATANABE *et al.*, 1991; SANTAJOIT *et al.*, 2016).

2.4.3.4 Família VIM

VIM-1 foi primeiramente descoberta em um isolado de *P. aeruginosa* em Verona, na Itália, em 1997, em seguida este gene foi detectado em um isolado de *Achromobacter xylosoxidans* recuperado no mesmo hospital (RICCIO *et al.*, 2001). Desde então, foram descritas 51 variantes, das quais 27 foram reportadas em *P. aeruginosa*, geralmente associadas a infecções nosocomiais (BALERO DE PAULA *et al.*, 2017).

A segunda variante é a VIM-2, que foi isolada logo depois da VIM-1, de uma amostra de *P. aeruginosa*, na França. Atualmente, é considerada a variante mais predominante, já tendo sido relatada em várias regiões e em diferentes espécies bacterianas (CASTANHEIRA *et al.*, 2003).

2.4.3.5 Família KPC

A primeira descrição de uma KPC (KPC-1) ocorreu em 1996 em um isolado de *K. pneumoniae* no estado da Carolina do Norte, Estados Unidos. Novos surtos de bactérias produtoras de KPC eram infreqüentes até 2001, quando então foram relatados diversos casos em hospitais de Nova Iorque e a partir desse período disseminou-se para diversos outros países (YIGIT *et al.*, 2001).

Na América do Sul, o primeiro relato de detecção de uma KPC (KPC-2) ocorreu em 2006, em dois espécimes de *K. pneumoniae* isolados em 2005 na Colômbia (VILLEGAS *et al.*, 2007). No Brasil, supostamente, o primeiro relato de uma KPC (KPC-2) também ocorreu em 2006, referente a espécimes de *K. pneumoniae* isolados a partir de quatro pacientes internados na UTI de um hospital da cidade de Recife, no Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2009). Apenas um mês após, a detecção de KPC-2 também foi relatada em seis isolados de *K. pneumoniae* provenientes de dois hospitais no Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (PEIRANO *et al.*, 2009).

Sobre a incidência de casos de KPC no Brasil, os dados de Pavez, Mamizuka e Lincopan (2009) revelam que já em 2005 haviam espécimes produtores de KPC-2 no Brasil. Os autores realizaram um estudo junto a oito centros médicos para analisar espécimes resistentes ao Imipenem. Além dos testes de Concentração Inibitória Mínima, foi realizada detecção do gene *bla_{KPC}* por PCR. Foram encontrados dois espécimes não clones de *K. pneumoniae* carregando o gene *bla_{KPC-2}*, isolados em maio de 2005 e novembro de 2007 a partir de culturas de sangue de dois pacientes em dois centros médicos distintos de São Paulo. Desta forma, compreende-se que, na verdade, os primeiros casos de KPC-2 no Brasil datam de 2005.

Atualmente, as bactérias produtoras de KPC são consideradas endêmicas nos Estados Unidos, Argentina, Brasil, Colômbia, China, Grécia, Israel, Itália, Polônia e Porto Rico (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). As enzimas do tipo KPC são freqüentemente encontradas em *K. pneumoniae* associadas com infecções nosocomiais, tais como infecções do trato urinário, sepse, pneumonia e infecções intra-abdominais, porém não é comum sua ocorrência em infecções adquiridas na comunidade (CHEN *et al.*, 2017). As betalactamases do tipo KPC podem hidrolisar todos os antibióticos betalactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e ácido clavulânico (YIGIT *et al.*, 2001; PAPP-WALLACE *et al.*, 2010).

2.4.3.6 Família SPM

A SPM-1, terceira subclasse de MBL adquirida, foi identificada em amostra de *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em 1997. Essa amostra bacteriana foi enviada ao programa SENTRY que, em parceria com o laboratório *Bristol Centre for Antimicrobial Research and Evaluation* (BCARE), da Universidade de Bristol, Inglaterra, caracterizou esse novo determinante de resistência (TOLEMAN *et al.*, 2002). O gene *bla*-SPM-1, que codifica a enzima SPM-1, parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não foi detectado em outros microrganismos nosocomiais (GALES *et al.*, 2003).

A MBL SPM-1 é composta por 216 aminoácidos e apresenta 35,5% de identidade com IMP-1 (HONG *et al.*, 2015). A produção de SPM-1 em *P. aeruginosa* tem sido observada em isolados clínicos e ambientais e a disseminação desse determinante de resistência é restrita ao território brasileiro, sendo relatada em diversos estados. Está atrelada a um clone endêmico no Brasil, denominado ST277, o qual é considerado um clone de alto risco (KALLUF *et al.*, 2017; ARCA-SUARÉZ *et al.*, 2019).

Diferentemente das demais MBLs adquiridas, que são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1, a SPM-1 é codificada por um gene localizado em plasmídeo.

2.4.3.7 Família NDM

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

Após esse primeiro relato, este determinante de resistência foi rapidamente disseminado em outras espécies bacterianas, inclusive em *P. aeruginosa*, e em diversos países. Esta ampla disseminação se justifica por este gene ser carregado, na maioria dos casos, por plasmídeos conjugativos. Em especial, em *P. aeruginosa* este gene foi

detectado em isolados pertencentes ao clone epidêmico mundial ST235 (KHAN *et al.*, 2017).

A enzima NDM-1 se propaga através de um plasmídeo que transporta o gene *bla*_{NDM-1}, em conjunto com outros genes resistentes ao macrolídeos, aminoglicosídeos, rifampicina, sulfametoxazol e aztreonam. Outra característica importante é que isolados bacterianos que contêm o gene NDM-1 possuem alta CIM para carbapenêmicos. Além disso, têm sido observadas infecções por patógenos resistentes à colistina, tornando-se panresistentes (HONG *et al.*, 2015).

2.4.3.8 Família GES

A betalactamase GES (Guiana Extended-Spectrum β -lactamase) foi detectada pela primeira vez na França, em 1998, em um isolado de *K. pneumoniae* em uma criança transferida de Cayenne, capital da Guiana Francesa. Essa enzima, GES-1, conferia resistência às cefalosporinas de espectro estendido, além de Ácido Clavulânico, Tazobactam e Imipenem (POIREL *et al.*, 2001). Logo depois, o gene *bla*_{GES-1} foi mais uma vez detectado na França, em 1999, em um isolado de *P. aeruginosa* proveniente de uma amostra de secreção de trato respiratório de uma paciente internada na UTI do Hospital Pellegrin, na cidade de Bordeaux (DUBOIS *et al.*, 2002).

O gene *bla*_{GES-1} também foi identificado por Duarte *et al.* (2003) em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, coletadas entre fevereiro de 1999 e fevereiro de 2001, no Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal. Uma nova variante, GES-2, foi descrita na África do Sul em 2000, a partir de um isolado de *P. aeruginosa* com resistência intermediária ao Imipenem (PELLEGRINO *et al.*, 2006; POIREL *et al.*, 2001).

Em relato de 2004, a betalactamase GES-1 também foi detectada pelo SENTRY, em São Paulo, Brasil. O gene *bla*_{GES-1} foi encontrado em um espécime de *P. aeruginosa*, isolado do sangue de uma mulher de 63 anos, que foi submetida a uma histerectomia, e desenvolveu uma infecção da ferida enquanto recebia Ceftriaxona, Amicacina e Metronidazol. Apesar da infecção ter sido erradicada com uso empírico de Polimixina B mais vancomicina, a paciente faleceu depois de ficar internada por três meses na UTI (CASTANHEIRA *et al.*, 2004; PELLEGRINO *et al.*, 2006). Duas outras variantes, GES-3 e GES-4, também codificadas por cassetes de genes inseridos em integrons classe 1,

foram descritos em isolados de *K. pneumoniae* no Japão (VOURLI *et al.*, 2004; WACHINO *et al.*, 2004).

A enzima GES-1 já foi identificada na Argentina, Brasil, Portugal e Holanda em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* (PELLEGRINO *et al.*, 2006). Embora as enzimas da família GES inicialmente não fossem consideradas como carbapenemases, seus espectros hidrolíticos incluem carbapenêmicos e, por isso, são atualmente classificadas como carbapenemases (BEBRONE *et al.*, 2013). Já foram relatadas 31 variantes dessa família (BALEIRO DE PAULA, *et al.* 2017).

2.5 Fatores de virulência

A capacidade de *P. aeruginosa* causar diversos tipos de infecções em diferentes grupos de indivíduos resulta da combinação da sua versatilidade metabólica com a resistência a antimicrobianos, seja ela intrínseca e/ou adquirida, com a capacidade de se adaptar à presença desses antibióticos, aliada ainda à possibilidade de produzir diferentes fatores de virulência, tais como a presença de endotoxinas, motilidade, pili, cápsulas e diversas exotoxinas (proteases, hemolisinas, lecitinases, elastases e DNAses). (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de infecções causadas por *P. aeruginosa* inicia-se com a alteração ou neutralização das defesas naturais do hospedeiro. Este processo é multifatorial e causado por uma variedade desses fatores que se desenvolvem ao longo das três fases da infecção: aderência e colonização, invasão local e disseminação sistêmica (STRATEVA *et al.*, 2009).

Há uma diversidade de fatores de virulência, podendo ser divididos em vários tipos, a depender da sua função no processo de infecção. As exotoxinas causam danos às células do hospedeiro; as modulinas desencadeiam respostas inflamatórias; algumas enzimas destroem os tecidos proporcionando nutrientes à bactéria ou atenuam as respostas imunológicas; as adesinas e estruturas de mobilidade, possuem importância na fixação às células do hospedeiro; as cápsulas, proporcionam proteção contra as defesas do hospedeiro e em alguns casos contribuem na aderência; produção de determinantes de evasão ao sistema do complemento; produção de pigmentos; a capacidade de formar

biofilmes auxilia a bactéria a isolar-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos antibióticos (CASADEVALL e PIROFSKI, 2009).

Caracterizados como adesinas, estão os flagelos, as fímbrias e o alginato. Já os fatores que facilitam o rompimento da integridade epitelial são as elastases, protease alcalina, fosfolipase C, dentre outros. Estes também são responsáveis por degradar ou inativar importantes componentes do sistema imune. Os vários determinantes de virulência extracelular desta bactéria contribuem para a citotoxicidade, necrose, invasão e disseminação (KHALIFA *et al.*, 2015).

Os operonfenazinas (*phzI* e *phzII*) e genes *phzH*, *phzM* e *phzS* codificam proteínas precursoras envolvidas na formação de três compostos fenazínicos secretados passivamente por *P. aeruginosa*: piocianina, 1-hidroxyfenazina, e fenazina-1-carboxamida, responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo intracelular. Outros fatores de virulência são a exotoxina A (*exoA*), protease alcalina (*aprA*), exoenzima S, U e T (*exoS*, *exoU* e *exoT*), elastase e sialidase (FAZELI e MONTAZ, 2014).

Os lipopolissarídeos, por exemplo, são endotoxinas que compõem a membrana externa da parede celular de *P. aeruginosa*, podendo impedir a entrada de vários antibióticos na célula bacteriana. Outro exemplo são as culturas das amostras clínicas de pacientes com fibrose cística. Estas originam colônias mucóides de *P. aeruginosa* em consequência da superprodução de alginato, considerado um exopolissacarídeo (ZHANG *et al.*, 2018).

Uma metaloprotease de zinco chamada *lasB* tem uma atividade elastolítica no tecido humano e especialmente no tecido pulmonar. O gene chamado *nanI* codifica a sialidase, responsável pela adesão celular. Os fosfolipídios tensoativos contidos no pulmão podem ser hidrolisados por duas fosfolipases C, codificados por *plcH* e *plcN*. Acredita-se que uma neuraminidase extracelular desempenhe um papel importante na implantação da bactéria (ZHANG *et al.*, 2018).

A piocianina também é considerada um importante fator de virulência em *P. aeruginosa*. Esse pigmento desempenha efeitos tóxicos nos tecidos do hospedeiro, principalmente no epitélio respiratório. Estudos mostram que a biossíntese de piocianina é necessária para a virulência de *P. aeruginosa* em casos de sepse e pneumonia em modelos murinos. Além disso, foram detectadas elevadas concentrações deste pigmento em escarros de pacientes com fibrose cística (BROOKS *et al.*, 2014).

A expressão de fatores de virulência pode variar de acordo com o sítio anatômico, progressão da doença, perfil de resistência dos isolados e tratamento das infecções. Desta

forma, isolados de *P. aeruginosa* ER são fortemente formadores de biofilme, diferindo significativamente de isolados clínicos não-ER (KAISER *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Detectar a frequência de *P. aeruginosa* multidroga resistentes isoladas de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS), Ceará, Brasil, e identificar os genes responsáveis pela resistência desse patógeno.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a prevalência de infecções hospitalares na SCMS por *P. aeruginosa* de acordo com o gênero do paciente, sítio de coleta e setor de hospitalação;
- Investigar o perfil de sensibilidade antimicrobiana de espécimes de *P. aeruginosa* isolados de infecções nosocomiais pelo sistema automatizado VITEK® 2;
- Pesquisar a ocorrência dos genes *bla*-TEM like, *bla*-SHV like, *bla*-CTX-M 1/2, *bla*-IMP-1, *bla*-KPC like, *bla*-GES like, *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, *bla*-VIM like, associados à resistência bacteriana.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Respeitando os aspectos éticos, conforme resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Interna de Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Sobral e pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Estadual Vale do Acaraú (Parecer número: 3.378.013) (Anexo I). Os sujeitos da pesquisa tiveram suas identidades preservadas e eles ou seus responsáveis assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) sobre sua participação neste trabalho de pesquisa (APÊNDICE I).

4.2 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo primário, observacional e transversal, onde foram coletados dados epidemiológicos em relação à frequência e o perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar internados na SCMS. Além disso, foi realizada pesquisa experimental *in vitro* para investigação da presença dos genes *bla*-TEM like, *bla*-SHV like, *bla*-CTX-M 1/2, *bla*-IMP-1, *bla*-KPC like, *bla*-GES like, *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, *bla*-VIM like nos espécimes de *P. aeruginosa* por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese.

4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios para inclusão na pesquisa foram utilizar culturas positivas para *P. aeruginosa*, de pacientes internados na SCMS, e que estivessem viáveis para os estudos genéticos propostos.

4.4 Coleta de dados

Durante o período de março de 2019 a março de 2020, foram coletados espécimes nosocomiais de *P. aeruginosa* isolados de amostras clínicas de sangue, urina, aspirado traqueal, ponta de cateter percutâneo, secreção de feridas, *swab* anal e outros sítios não identificados de pacientes internados com diagnóstico de infecção hospitalar na SCMS. As amostras foram obtidas de pacientes internados em diversos setores, como Enfermarias, UTI Neonatal, Emergência, Neurologia, UTI Adulta, Hospital do Coração, Oncologia e Hemodiálise.

Vale ressaltar que o isolamento das espécies bacterianas foi realizado a partir de amostras clínicas de pacientes com suspeita de infecção hospitalar, desde que essas

amostras já tivessem sido previamente solicitadas e coletadas pela equipe médica do referido hospital de ensino. Portanto, não foi realizada coleta adicional de sangue e nem de nenhuma outra amostra clínica do paciente. Dessa forma, a quantidade e manipulação das amostras seguiram o protocolo operacional padrão do hospital, assim como o método de descarte das amostras biológicas seguiram o plano de gerenciamento de resíduos de serviço de saúde de acordo com a Resolução RDC N°306 de 07 de dezembro de 2004.

Os espécimes foram considerados oriundos de infecções nosocomiais quando isolados de infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após a alta, podendo ser relacionada com a internação ou a procedimentos hospitalares (OMS, 2008).

4.5 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA)

A identificação bacteriana e os testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) para Amicacina, Cepefima, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefuroxima Axetil, Ciprofloxacina, Colistina, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Tigeciclina, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefuroxima e Piperacilina/Tazobactam foram realizados pelo sistema automatizado *Vitek*®2 AES (AST- N239 cartão) (BioMerieux, Marcy L'Etoile, França), no Laboratório de Microbiologia da SCMS (Biovida), Ceará, Brasil, de acordo com as instruções do fabricante.

Os isolados foram cultivados em Agar MacConKey e incubados a 35°C durante 24 horas. Após crescimento bacteriano, foi realizado o preparo padronizado da suspensão bacteriana e o inóculo foi introduzido no equipamento através de uma microtubulação por aspiração. A suspensão foi automaticamente dirigida para um cartão plástico fechado com 64 poços contendo concentrações específicas de antimicrobianos liofilizados, que disponibilizou o resultado de Concentração Inibitória Mínima (CIM). O *Vitek* ®2 possui *software* específico que emite relatório das análises.

Em seguida, os espécimes foram armazenados em tubos contendo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Himedia ®, Mumbai, Índia) com glicerol a 20% e enviados ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Universidade Federal do Ceará (UFC) em Sobral, onde foram conservados em freezer a - 80°C (Revco, EUA) para posterior análise genômica.

4.6. Reativação dos isolados bacterianos

A reativação dos espécimes armazenados em freezer -80°C foi realizada acrescentando-se uma alíquota 50µL da cultura em glicerol em um tubo de ensaio contendo 5,0ml de caldo BHI (Himedia®, Mumbai, Índia) e mantido em estufa bacteriológica por 18 horas a 37°C, sendo um tubo para cada amostra e mais um tubo para controle negativo.

4.7 Extração de DNA

Após crescimento dos microrganismos em meio líquido, 2mL de cada amostra foram transferidos para tubos de micro centrífuga, devidamente identificados. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados (4.500g/3min) e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado, foi adicionado 200 µL de tampão 1 (APÊNDICE II) e 200 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e foi realizada uma ressuspensão. Em seguida, foram inseridas 3 *beads* (microesferas de sílica) em cada tubo, os quais foram agitados em disruptor gênico por 5 minutos. Ao mesmo tubo, adicionou-se 200 µL de tampão 2 (APÊNDICE II) e agitação por 30 segundos. Realizou-se centrifugação (12.000g/6min) e transferência do sobrenadante para um novo tubo *eppendorf*, acrescentando 1.000 µL de etanol 100% gelado nas amostras e deixando descansar em freezer -20°C por 30 minutos. Após esse intervalo, os tubos foram centrifugados e, novamente, descartou-se o sobrenadante, aguardando-se alguns minutos para o álcool evaporar. Em seguida, realizou-se ressuspensão do *pellet* em 100 µL de tampão 2 e incubação em banho maria por 30 minutos, a 60°C. Após essa etapa, os tubos foram armazenados em -80°C, para realização de PCR, quantificação e eletroforese (BRITO *et al.*, 2009).

4.8 Detecção e identificação dos genes de resistência por PCR

Os espécimes nosocomiais de *P. aeruginosa* multidroga resistentes foram analisados para a detecção dos genes *bla*-TEM like, *bla*-SHV like, *bla*-CTX-M 1/2, *bla*-IMP-1, *bla*-KPC like, *bla*-GES like, *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, *bla*-VIM like, por meio de PCR. Os *primers* e protocolos que foram usados para amplificação desses genes já foram previamente relatados (ELLINGTON *et al.* 2007; MONTEIRO, 2009; CAMPANA, 2013; NICOLETTI *et al.* 2015; MATHLOUTHI *et al.* 2016) e a sequência dos fragmentos a serem amplificados está descrita na Tabela 1. As amplificações foram realizadas no termociclador da marca *Eppendorf* com as seguintes condições de ciclagem: uma desnaturação inicial (95°C por 10 min); seguido por 30 ciclos de três passos: 95°C por 1 minuto; (ii) temperatura de anelamento (tabela 1) por 1 minuto e (iii) 72°C por 1 minuto;

e uma extensão final a 72°C por 10 min. Para todas as PCR's, uma reação sem adição de DNA foi utilizada como controle negativo de contaminação e como controle positivo foram utilizadas amostras pré-caracterizadas.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (1,25 µl/100 ml). A eletroforese foi realizada a 190 volts, 80mAh, por 40 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com 6,5µl da reação, adicionados de 2µl de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Após a corrida eletroforética, o gel de agarose foi analisado através de luz ultravioleta, sendo as imagens obtidas a partir de uma câmera digital (Casio Computer Co. Ltda) com capacidade de 7.0 megapixel's, conectada a um computador via cabo USB.

Tabela 1 - *Primers* usados para amplificação dos genes de resistência

Gene de Resistência	Sequência (5'–3')	T.A.
<i>bla</i> -TEM like	F: CCCTTATTCCTTTYTTGCGG R: AACCAGCCAGCCWGAAGG	56°C
<i>bla</i> -SHV like	F: ATGCGTTATTAGTTTCGCCTGTGTATTATC R: TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC	56°C
<i>bla</i> -CTX-M ½	F: ATGTGCAGYACCAGTAA R: CGCTGCCGGTTTTATCSCCC	56°C
<i>bla</i> -IMP-1	F: CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC R: GAACAACCAGTTTTTGCCTTACC	50,6°C
<i>bla</i> -NDM-1	F: GCGCAACACAGCCTGACTTT R: CAGCCACCAAAGCGATGTC	55,3°C
<i>bla</i> -SPM-1	F: AAAATCTGGGTACGCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	63°C
<i>bla</i> -KPC like	F: TCGCTAAACTCGAACAGG R: TTA CTGCCCGTTGACGCCCAATCC	50°C
<i>bla</i> -GES like	F: AGCAGCTCAGATCGGTGTTG R: CCGTGCTCAGGATGAGTTG	53°C
<i>bla</i> -VIM like	F: GATGGTGTGGTTCGCATA	52°C

G: CGAATGCGCAGCACCAG

T.A= Temperatura de anelamento (°C)

4.9 Análise Estatística

Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e cruzados com os genes por meio dos testes exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. O somatório de antibióticos com resistência foi expresso em forma de média e erro padrão, submetido ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparado com os genes por meio do teste t de Student. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20,0 para Windows.

5. RESULTADOS

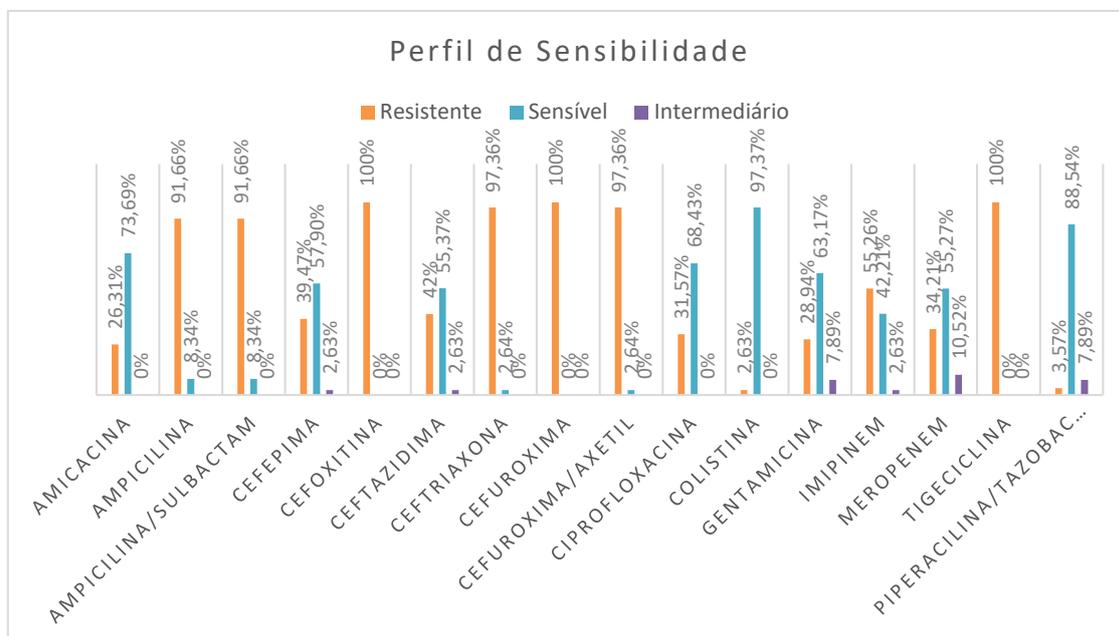
Um total de 38 amostras clínicas obtidas de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar foram identificadas como *P. aeruginosa* pelo sistema *Vitek 2*, sendo que não foi possível o crescimento bacteriano de 7 amostras durante a reativação dos isolados. Dessa forma, foi realizado o TSA de 38 espécimes e a análise molecular de apenas 31 (81,6%).

Dos 38 isolados de *P. aeruginosa*, 11 (28,9%) são oriundos da enfermaria de clínica médica e traumatologia ortopédica São Joaquim e a maioria foi isolada de pacientes do gênero masculino (57,8%). De todos os isolados analisados, 11 (28,9%) não havia identificação de sítio de origem, porém, nos espécimes coletados que continham essa informação, a circulação sanguínea foi o sítio de isolamento mais frequente (26,3%), seguida da urina e aspirado traqueal, ambos com taxa de isolamento de 13,2%. A distribuição dos isolados por setor de hospitalização, sítio de isolamento e gênero estão descritos na Tabela 2.

Todos os isolados foram resistentes à Cefoxitina e à Tigeciclina, e apresentaram altas taxas de resistência para Ceftriaxona (97,3%) e Cefuroxima Axetil (97,3%), tendo sido observadas taxas menores de resistência para carbapenêmicos, como Imipenem (55,2%) e Meropenem (34,2%), assim como para Ceftazidima (42%), Cefepima (39,4%), Ciprofloxacina (31,5%), Gentamicina (28,9%) e Amicacina (26,31%). Apenas 1 isolado mostrou-se resistente à Colistina (2,63%). Dos 38 espécimes, apenas 12 (31,5%) foram testados para Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam e Cefuroxima, sendo que todos foram resistentes à Cefuroxima e 11 (91,6%) foram resistentes aos outros dois antibióticos testados. E por fim, 28 (73,6%) isolados foram testados para Piperacilina/Tazobactam, sendo um (3,5%) resistente a esse antimicrobiano (Gráfico 1).

No Gráfico 1, observa-se ainda que 2,63% dos isolados apresentaram sensibilidade intermediária à Cefepima, à Ceftazidima e ao Imipenem. Adicionalmente, foi verificada uma sensibilidade intermediária em 7,89% e 10,52% das cepas para Gentamicina e Meropenem, respectivamente.

Gráfico 1: Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *P. aeruginosa* isoladas entre março de 2019 e março de 2020 na SCMS.



Dos 31 isolados que foram submetidos à análise molecular, entre os genes que codificam ESBL, o gene *bla*-CTX-M 1/2 foi o prevalente, sendo detectado em 13 (41,9%) espécimes. Por outro lado, em relação aos genes que codificam carbapenemases, o *bla*-GES like foi o mais encontrado, tendo sido detectado em 4 (12,9%) isolados (Tabela 2). Além disso, ao se comparar a presença dos genes analisados e a média do número de antibióticos que o microrganismo apresentava resistência, pode-se observar que as cepas que possuíam o gene *bla*-TEM like, apresentaram resistência a um número maior de antimicrobianos e esse dado foi estatisticamente significativo ($p = 0,035$) (Tabela 3).

Tabela 2: Distribuição dos isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* por setor de hospitalização, sítio de origem, gênero e prevalência dos genes de resistência.

	N*	%
Setor hospitalar		
Dom Walfrido	1	2,6
Emergência Adulta	4	10,5
Hemodiálise	1	2,6
Hospital do Coração	2	5,3
Não Informado	1	2,6
Neurologia	4	10,5
Oncologia	1	2,6
São Joaquim	11	28,9
São José	3	7,9
UTI Adulta	3	7,9
UTI Neonatal	7	18,4
Sítios		
Aspirado traqueal	5	13,2
Outros	11	28,9
Ponta de cateter	3	7,9
Sangue	10	26,3
Secreção	2	5,3
Swab anal	2	5,3
Urina	5	13,2
Gênero		
Feminino	16	42,1
Masculino	22	57,9
Genes		
SHV	4	12,9
TEM	6	19,4
CTXM 1 2	13	41,9
IMP 1	1	3,2
KPC	1	3,2
GES	4	10,5
SPM 1	0	0,0
NDM 1	0	0,0
VIM	0	0,0

*Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Tabela 3: Influência da expressão gênica na resistência antimicrobiana apresentada por isolados nosocomiais de *P. aeruginosa*.

	Gene		p-Valor
	Ausente	Presente	
SHV	7.11±3.00	6.75±3.20	0,825
TEM	6.52±2.87	9.33±2.42	*0,035
CTXM ½	6.89±3.29	7.31±2.59	0,706
IMP 1	6.90±2.88	12	0,092
KPC	7.00±3.01	9	0,518
GES	7.19±3.13	6.25±1.71	0,567

*p<0,05, teste t de Student (media ± EPM)

Vale ressaltar que seis amostras apresentaram, de forma simultânea, mais de um gene analisado, sendo que todas elas continham o gene *bla*-CTX-M ½ e eram oriundas de pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) ou na enfermaria de pacientes com problemas neurológicos. Dentre esses espécimes, 4 (66,6%) apresentaram resistência ao Imipenem e 3 (50%) ao Meropenem (Tabela 4).

Tabela 4: Relação dos isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* com coexistência de genes de resistência, antimicrobianos e setor hospitalar.

Amostra	Genes <i>bla</i> detectados	IMP	MER	AMI	Setor
PA 2	CTX-M1/2, SHV, KPC	R	R	S	Neurologia
PA 5	CTX-M1/2, SHV, TEM	R	R	S	UTI Adulta
PA 8	CTX-M1/2, TEM, GES	R	S	S	UTI Neonatal
PA 9	CTX-M1/2, TEM, IMP	R	R	R	UTI Neonatal
PA 12	CTX-M1/2, GES	I	I	R	UTI Neonatal
PA 13	CTX-M1/2, GES	S	S	S	Neurologia

*IMP: Imipenem; MER: Meropenem; AMI: Amicacina

Na cepa em que o *bla*-IMP-1 foi detectado, observou-se resistência à Amicacina, bem como num dos espécimes em que foi detectado o gene *bla*-GES like. Além disso, é importante considerar que o único isolado que continha o *bla*-IMP-1 apresentava resistência

a 12 dos antibióticos testados, e a presença desse gene estava significativamente associado à resistência à Amicacina ($p = 0,038$).

Não houve relação estatisticamente significativa entre a detecção dos genes analisados e o gênero do paciente, assim como o sítio da coleta, mas a detecção do gene *bla*-SHV like esteve significativamente associada a microrganismos isolados da Neurologia, da enfermaria São José e da UTI adulta ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Influência do setor de hospitalização, sítio de origem e gênero na detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M 1/2}.

Setor	SHV			TEM			CTXM 1/2		
	Ausente	Presente	p- Valor	Ausente	Presente	p- Valor	Ausente	Presente	p- Valor
hospitalar									
DW	1 (3.7%)	0 (0.0%)	0,024	1 (4.0%)	0 (0.0%)	0,284	1 (5.6%)	0 (0.0%)	0,627
EA	4 (14.8%)	0 (0.0%)		3 (12.0%)	1 (16.7%)		2 (11.1%)	2 (15.4%)	
HEM	1 (3.7%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	0 (0.0%)	
HC	2 (7.4%)	0 (0.0%)		2 (8.0%)	0 (0.0%)		2 (11.1%)	0 (0.0%)	
NI	1 (3.7%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	0 (0.0%)	
NEU	2 (7.4%)	1 (25.0%)		3 (12.0%)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	2 (15.4%)	
ONC	1 (3.7%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	0 (0.0%)	
SJQ	7 (25.9%)	0 (0.0%)		7 (28.0%)	0 (0.0%)		3 (16.7%)	4 (30.8%)	
SJ	0 (0.0%)	2 (50.0%)		2 (8.0%)	0 (0.0%)		2 (11.1%)	0 (0.0%)	
UTI A	1 (3.7%)	1 (25.0%)		1 (4.0%)	1 (16.7%)		1 (5.6%)	1 (7.7%)	
UTI N	7 (25.9%)	0 (0.0%)		3 (12.0%)	4 (66.7%)		3 (16.7%)	4 (30.8%)	

Sítios

Aspirado traqueal	3 (11.1%)	1 (25.0%)	0,902	4 (16.0%)	0 (0.0%)	0,227	3 (16.7%)	1 (7.7%)	0,349
Outros	8 (29.6%)	2 (50.0%)		9 (36.0%)	1 (16.7%)		5 (27.8%)	5 (38.5%)	
Ponta de cateter	3 (11.1%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	2 (33.3%)		2 (11.1%)	1 (7.7%)	
Sangue	8 (29.6%)	1 (25.0%)		6 (24.0%)	3 (50.0%)		6 (33.3%)	3 (23.1%)	
Secreção	2 (7.4%)	0 (0.0%)		2 (8.0%)	0 (0.0%)		2 (11.1%)	0 (0.0%)	
Swab anal	2 (7.4%)	0 (0.0%)		2 (8.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	2 (15.4%)	
Urina	1 (3.7%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	1 (7.7%)	

Gênero

Feminino	15 (55.6%)	0 (0.0%)	0,101	12 (48.0%)	3 (50.0%)	0,930	11 (61.1%)	4 (30.8%)	0,095
Masculino	12 (44.4%)	4 (100%)		13 (52.0%)	3 (50.0%)		7 (38.9%)	9 (69.2%)	

*DW: Dom Walfrido; HEM: Hemodiálise; HC: Hospital do Coração; NI: Não Informado; NEU: Neurologia; ONC: Oncologia; SJQ: São Joaquim; SJ: São José; UTI A: UTI Adulta; UTI N: UTI Neonatal.

6. DISCUSSÃO

As infecções por *P. aeruginosa* e o desenvolvimento de resistência são problemas que estão se tornando cada vez mais frequentes e que devem ser adequadamente abordados em todo o mundo. Os resultados desta pesquisa mostraram que a maioria dos pacientes diagnosticados com infecção hospitalar causada por *P. aeruginosa* eram do gênero masculino (57,89%), diferentemente de um outro estudo realizado em Belém, Pará, Brasil, que apontou uma maioria de pacientes do gênero feminino (51,9%) (MATOS *et al.*, 2016).

Dentre os isolados de *P. aeruginosa* do presente estudo que haviam identificação de sítio de origem, os mais frequentes foram isolados da corrente sanguínea, seguido de urina e aspirado traqueal, corroborando aos achados de Amirkamali *et al.* (2017), em que as amostras eram advindas principalmente do sangue, urina e traqueia, respectivamente.

Quanto ao perfil de sensibilidade, Amirkamali *et al.* (2017) também teve resultados semelhantes aos nossos, pois os antimicrobianos mais eficazes em seu estudo foram a Colistina, Amicacina e Piperacilina/Tazobactam. Além disso, a maioria dos isolados demonstraram resistência completa ou sensibilidade intermediária ao Imipenem, assim como nos dados obtidos no presente estudo.

Nesta pesquisa, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos revelou que o fármaco mais ativo contra *P. aeruginosa* foi a colistina, uma vez que a maioria dos isolados era suscetível a esse antimicrobiano, ratificando dados de outros estudos brasileiros (JACOME, *et al.* 2012; BALEIRO DE PAULA, *et al.* 2017).

Estudos (MOOLENAR *et al.*, 2000; MATOS *et al.*, 2016) em todo o mundo revelam que infecções por *P. aeruginosa* acontecem principalmente em pacientes internados em UTI, diferentemente dos nossos dados que demonstraram que a maioria das infecções por esse microrganismo aconteceram em pacientes internados em enfermarias de clínica médica e traumatologia ortopedia, esse fato provavelmente pode ser explicado por ser a SCMS um hospital de ensino, e nesses estabelecimentos há grande circulação de pacientes, profissionais de saúde e alunos, podendo haver uma maior disseminação de microrganismos multidroga resistentes nos diversos setores hospitalares, o que leva também frequentemente a se observar maiores taxas de infecção hospitalar em hospitais de ensino.

Até bem pouco tempo, os carbapenêmicos tinham excelente utilidade clínica para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* MDR devido à sua potente atividade contra esse microrganismo. No entanto, esse patógeno desenvolveu mecanismos de resistência após exposição implacável a carbapenêmicos e outras classes de agentes antimicrobianos (LABARCA *et al.*, 2016; YANG *et al.* 2020).

Em uma pesquisa mundial envolvendo isolados de *P. aeruginosa* de diferentes hospitais da Ásia, Europa, Oriente Médio, África, América Latina, e América do Norte, foi observada uma taxa de resistência ao Meropenem de 26,7% (KAZMIERZCAK *et al.*, 2016), um pouco abaixo da demonstrada no presente estudo. Em outro estudo de vigilância antimicrobiana, Rosenthal *et al.* (2016) relataram taxas de resistência aos carbapenêmicos que variava de 26,1% a 44,4% em *P. aeruginosa* isoladas de IRAS na América Latina, Europa, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Ásia e Pacífico Ocidental, semelhante aos dados de resistência revelados nesse estudo para o Meropenem (34,2%) e para o Imipenem (55,2%).

Dados de sensibilidade antimicrobiana de *P. aeruginosa* apresentados pelo *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), relacionados a diferentes países no período de 1997 a 2000, apontavam uma resistência de apenas 5,4% ao Meropenem, demonstrando um fato preocupante, de que os dados de resistência aos carbapenêmicos cresceram substancialmente nas últimas duas décadas.

Segundo Labarca *et al.* (2016), os dados da América Latina chamam a atenção, pois a resistência aos carbapenêmicos é superior em relação aos Estados Unidos e Europa, com o Brasil apresentando as maiores taxas de resistência entre os países da América Latina.

No estudo de Shacheraghi *et al.* (2010), realizado no Irã, os pesquisadores relataram a ocorrência do gene *bla*-TEM em todas as amostras analisadas, distinguindo-se dos nossos achados, em que esse gene foi detectado em menos de um quinto dos isolados. Por outro lado, o gene *bla*-CTX-M foi detectado em quase metade dos espécimes dessa pesquisa, esse achado corrobora aos dados de um outro estudo do nosso grupo de pesquisa, onde o gene *bla*-CTX-M foi detectado em todas as cepas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes com infecção nosocomial no mesmo hospital de ensino analisado (ROCHA *et al.*, 2019). Portanto, esses resultados suportam o reconhecimento de CTX-M como o tipo mais prevalente de ESBL no Brasil. Esses resultados provavelmente são devido aos diferentes protocolos terapêuticos usados nos diferentes hospitais e em diferentes regiões que ocasionariam diferentes pressões seletivas pelo uso de

antimicrobianos. Por outro lado, nossos resultados suportam o reconhecimento de CTX-M como o tipo mais prevalente de ESBL no Brasil (Rocha *et al.*, 2016).

Nesta pesquisa não foi detectado em nenhum isolado o gene *bla*-SPM-1, diferentemente de outros estudos brasileiros que observaram um predomínio desse gene entre os produtores de carbapenemases (POLOTTO *et al.*, 2012; BALEIRO DE PAULA *et al.*, 2017), assim como também nenhum isolado albergava o gene *bla*-VIM-1, enquanto outros estudos também realizados no Brasil relataram predomínio de isolados produtores de SPM-1 e detecção de amostras contendo *bla*-VIM-1 (SADER *et al.*, 2004; POLOTTO *et al.*, 2012). Matos *et al.* (2016), detectaram pela primeira vez o gene *bla*-SPM-1 no Estado do Pará.

Em relação à detecção dos genes *bla*-IMP-1 e *bla*-KPC, nossos dados reforçam os achados de Polotto *et al.* (2012). Além disso, Amirkamalli *et al.* (2017), realizaram um estudo no Irã e observaram uma prevalência do gene *bla*-GES, semelhante a observada nesse estudo.

Esse estudo tem limitações uma vez que não foi possível determinar o grupo CTX-M que cada cepa carregava, assim como as variantes de TEM, SHV e GES. Entretanto, os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser úteis como dados epidemiológicos, e destacam a necessidade de estudos futuros com a realização de métodos que possam melhorar esses resultados e prevenir a disseminação de clones resistentes.

Esses resultados alertam para um problema de resistência endêmica causada por cepas multiclonais de *P. aeruginosa* MDR, que pode ser atribuído à pressão exercida pelo uso desses antibióticos nessa população, e cujo controle passa essencialmente pelo aprimoramento das políticas de prescrição de antimicrobianos.

7. CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo chamam a atenção para as altas taxas de resistência aos betalactâmicos e à Tigeciclina, e no surgimento de resistência à Colistina, fármaco de escolha no tratamento de infecções nosocomiais por *P. aeruginosa* MDR. Além disso, os resultados obtidos com a análise molecular sugerem que a enzima CTX-M seja a principal ESBL responsável pelo fenótipo de resistência aos betalactâmicos nos isolados estudados.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, S. E. *et al.* Epidemiology of healthcare-associated infections among patients from a hemodialysis unit in southeastern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 18, p. 327-30, 2014.
- AMIRKAMALI, S. *et al.* Distribution of the bla OXA, bla VEB-1, and bla GES-1 genes and resistance patterns of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 315-320, 2017.
- ARCA-SUÁREZ, J. *et al.* Challenging antimicrobial susceptibility and evolution of resistance (OXA-681) during treatment of a long-term nosocomial infection caused by a *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 10, p. e01110-19, 2019.
- BĂLĂȘOIU, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods. **Curr Health Sci J**, v. 40, p. 85-92, 2014.
- BALASUBRAMANIAN, *et al.* A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Res**, v. 41, p. 1-20, 2013.
- BALERO DE PAULA, S. *et al.* Detection of blaVIM-7 in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 89, p. 80-82, 2017.
- BAUERNFEIND, A. *et al.* Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 509-513, 1996.
- BEBRONE, C. *et al.* GES-18, a new carbapenemhydrolyzing GES-type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.1, p.396-401, 2013.
- BIALVAEI, A. *et al.* Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. **Irã J Microbiol**, v. 7, n. 5, p. 226-246, 2015.
- BOKAEIAN, M. *et al.* Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-M genes in resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended spectrum β -lactamases. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 8, n. 1, 2015.
- BONNET R. *et al.* A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. v.44, n.7, p.1936-1942.2000.
- BONNET R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTXM enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**. v.48, n.1, p.1-14. 2004.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* v.14, n.4, p.933-951. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2616, Diário Oficial da União, Brasília, 12 de maio de 1998.

BRITO, E. H. S. *et al.* PCR-AGE, automated and manual methods to identify *Candida* strains from veterinary sources: a comparative approach. **Veterinary microbiology**, v. 139, n. 3-4, p. 318-322, 2009.

BROOKS, G. F. *et al.* *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 26 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2014, 872p.

BUSH K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis.**v.32, n.7, p.1085-1089, 2001.

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

CAMPANA, E. H. *et al.* Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 2016

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. **Journal of water and health**, v. 7, n. S1, p. S2-S18, 2009.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Characterisation of mobile elements carrying metallo- β -lactamase genes, blaIMP-1, blaIMP-16, blaSPM-1, blaVIM-2 from Latin American Medical Centres: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, n. C2-2023, p. 153, 2003.

CASTANHEIRA, M.; MENDES, R. E.; RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Rapid emergence of blaCTX-M among Enterobacteriaceae in U.S. Medical Centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). **Microb Drug Resist.** v. 14, n. 3, p. 211-6. 2008.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, p.1804-14, 2014.

CHEN, C.Y. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections among patients with haematological malignancies with and 85 without neutropenia at a medical centre in northern Taiwan, 2008-2013. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 49, p. 272-281, 2017.

CHEVALIER, S. *et al.* Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 41, p. 698-722, 2017.

CHROMA, M.; KOLAR, M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: Focus on extended spectrum β -lactamases. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky.** v. 154, n. 4, p.289–296, 2010.

CHUANG, Y. C. *et al.* Epidemiologia molecular, susceptibilidade antimicrobiana e determinantes da resistência à carbapenemase entre isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* em Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 47, n. 4, p. 324- 332, 2014.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* v. 20;13, n.47, p.19044. 2008 Corkill J.E., Cuevas L.E., Gurgel R.Q., Greensill J., Hart C.A. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing beta-lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **J Antimicrob Chemother.** v. 47, n. 4, p. 463-465. 2001.

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

DE ALMEIDA SILVA, K. C. F. *et al.* Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. **Burns.**v. 43, p. 137-43, 2017.

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

DOI, Y.; PATERSON, D. L. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. **Int J Infect Dis.** v. 11, n. 3, p. 191-7. 2007.

DOI, Y.; GARCIA, D. O.; ADAMS, J.; PATERSON, D. L. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 3, p. 852-856, 2007.

DUARTE, A.; BOAVIDA, F.; GROSSO, M.; Outbreak of GES-1 β -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1481-1482, 2003.

DUBOIS, V. *et al.* Molecular characterization of a novel class 1 integron containing blaGES1 and a fused product of aac (3)-Ib/aac (6'')-Ib" gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 638-645, 2002.

ELLINGTON, M. J.; JAMES, K.; DAVID, M. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. **J. Antimicrob. Chemoth**, v. 59, n. 2, p. 321-322, 2007.

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

ENSOR V. M. *et al.* Predominance of CTX-M-15 extended spectrum β -lactamases in diverse *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from hospital and community patients in Kuwait. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 5, p. 487-489, 2009.

EVANS, H. L. *et al.* Cost of Gram-negative resistance. **Crit Care Med**, v.35, n.1, p.89-95, 2007.

FAZELI, N; MONTAZ, R. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iranian Hospital Infections. **Iran Red Crescent Med J.** v.16, n.10, p. 1-10, 2014.

FENG, W. *et al.* Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 8, p. 142-7, 2017.

FERRAREZE, M. V. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 1, p. 7-11, 2007.

FUENTEFRIA, D. B. Detecção de metalo β -lactamases e similaridade genética em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar e água superficial. Porto Alegre. Tese [Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente] - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

GALES, A. C. *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother.**, v. 52; p. 699- 702, 2003.

GALES, A. C. *et al.* Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 73, p. 354-60, 2012.

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

GOLI, H. R. *et al.* Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Infect Public Health.** 2017. pii: S1876-0341(17)30250-2.

GUPTA, R. *et al.* Epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative pathogens isolated from ventilator-associated pneumonia in ICU patients. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 9, p. 47-50, 2017.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.** v.10, n.4, p 441-515, 2010.

HOCQUET, D. *et al.* Pseudomonas aeruginosa may accumulate drug resistant mechanism without losing its ability to cause infections. **Antimicrob Agents Chemoth**, v.51, p. 3531-3536, 2009.

HONG, D.J. *et al.* Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa. **Infect Chemother.**, v. 47, p. 81-97, 2015.

HUMENIUK, C. *et al.* β -Lactamases of Kluyvera ascorbata, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 3045-3049, 2002.

JACOBY G. A., BUSH K. -Lactamase Nomenclature. **J Clin Microbiol.** v.43, n.12, p.6220.2005.

JACOBY G. A., MUNOZ-PRICE L. S. The new β -lactamases. **N Engl J Med.** v. 352, p. 380–91. 2005.

JÁCOME, P.R. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 45, p. 707-12, 2012.

KAISER, S. J. *et al.*, F. Determinants for persistence of Pseudomonas aeruginosa in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 36, p. 243-35, 2017.

KHALIFA, B. H. *et al.* Virulence factors in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and modes of regulation. **Ann Biol Clin**, v. 69, n.4, p 393-403, 2015.

KALLUF, K. O. *et al.* Molecular epidemiology of SPM-1-producing Pseudomonas aeruginosa by rep-PCR in hospitals in Parana, Brazil. **Infect Genet Evol.**, v. 49, p. 130-3, 2017.

KARLOWSKY, J.A. *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013-2015. **J Med Microbiol.**, v. 66, p. 61-9, 2017.

KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 1067-1078, 2016.

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

KIM, J. H.; HYUNG, S. K.; JAE, M. L.. Rapid Detection of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii Harboring bla VIM-2, bla IMP-1 and bla OXA-23 Genes by

Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Methods. **Ann Lab Med**, v.36, p.15-22, 2016.

KNOTHE, H. *et al.* Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Clin Infect Dis**. v.11, n.6, p. 315-317.1983.

LABARCA, J.A. *et al.* M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Crit Rev Microbiol**. 2016;42(2):276-92.

LIU, Y.Y. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis**, 2015.

LIVERMORE, D.M. *et al.* N. AmpC β -lactamase induction by avibactam and relebactam. **J Antimicrob Chemother.**, v. 72, p. 3342-8, 2017.

LORENZINI, E.; COSTA, T.C.; SILVA, E. F. Prevenção e controle de infecção em unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v.34, n.3, p.107-113, 2013.

LUCENA, A. *et al.* Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. **J Hosp Infect.**, v. 87, p. 234-40, 2014.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.**, v. 18, p. 268-81, 2012.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The role epidemic plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug resistant Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565-591, 2015.

MATHLOUTHI, N. *et al.* Carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from Tunisian and Libyan hospitals. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 07, p. 718-727, 2016.

MATOS, E. C. O. *et al.* Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 305-311, 2016.

MENDES, R.E., *et al.* Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **J Clin Microbiol** 2007;45:544-547.

MENDES, C. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **Braz J Infect Dis**. v. 8, n. 1, p. 109-111. 2004.

MONTEIRO, J. *et al.* First Report of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**; v.53, n.1, p.333-334, 2009.

MOOLENAR, R. L. *et al.* A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 21, p. 80-85, 2000.

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

MOREIRA, M. A. S; SOUZA, E. C., MORAES, C. A. Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. **Braz J Microbiol.** 2004 May;35(1- 2):19-28.

MORITA, Y. *et al.* nalD encodes a second repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol** 2006; 188: 8649-54.

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

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E., LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab.** 2011 ago;47(4):409-20.

NICOLETTI, A. G. *et al.* Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **AntimicrobialAgentsChemoth**, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, 2015.

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

OLIVEIRA, C. F. *et al.* Prevalência das famílias TEM, SHV, CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. no Hospital Universitário de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 5, p. 556-60, 2009.

OLIVEIRA, D.V. ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DA FAMÍLIA Enterobacteriaceae QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A β - LACTÂMICOS. Dissertação de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019. Relatório para o secretário geral das nações unidas abril de 2019 Disponível em: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_summary_PT.pdf?ua=1 (Acesso: 10 de agosto de 2020).

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; OHTA, M. 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.

PAPP-WALLACE, K. M. *et al.* BETHEL, C.R.; DISTLER, A.M.; KASUBOSKI, C.; TARACILA, M.; BONOMO, R.A. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.54, n.2, p.890–897, 2010.

PATERSON, D.L.; BONOMO R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* v.18, n.4, p. 657-86. 2005.

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

PELLEGRINO, F. L.; CASALI, N.; DOS SANTOS, K. R.; NOUÉR, S. A.; SCHEIDEGGER, E. M.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B. M. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying blaSPM metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. **J Chemother.**, v. 18, p. 151-6, 2006.

PEÑA, C. *et al.* SPANISH NETWORK FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASES (REIPI). Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: a post hoc analysis of a prospective cohort. **Clin Infect Dis.**, v. 57; p. 208-216, 2013.

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

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

PITOUT J. D. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 6, n. 5, p. 657-69. 2008.

POIREL, L. *et al.* Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extendedspectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.44, n.3, p.622–632, 2000.

POLOTTO, M. *et al.* Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 and blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infect Dis.**, v. 12, p. 176, 2012.

RIQUENA, B. *et al.* Efetividade de um protocolo de tratamento de erradicação em fases de *Pseudomonas aeruginosa* em crianças com fibrose cística no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, n. 4, p. e20180294-e20180294, 2020.

ROCHA, F. R; PINTO, V. P. T; BARBOSA, F. C. B. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Brazil: a systematic review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301-311, 2016.

ROCHA, F. R. *et al.* High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 6, p. 909-914, 2019.

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

ROPY, A. *et al.* Role of *Pseudomonas aeruginosa* low-molecular-mass penicillin-binding proteins in AmpC expression, β -lactam resistance, and peptidoglycan structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3925-3934, 2015.

ROSENTHAL, V. D. *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. **Am J Infect Control**, v. 44, p.1495-1504, 2016.

SADER, H. S. *et al.* IMPs, VIMs e SPMs: a diversidade de metalo - β - lactamases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenem em um hospital brasileiro. **Clinical Microbiology and Infection** , v. 11, n. 1, pág. 73-76, 2005.

SADER, H. S. *et al.* Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 1, p. 57-61, 2005.

SADER, H. S. *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 78, p. 443-8, 2014.

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

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N.. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

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

SHACHERAGHI, F; SHAKIBAIE, M. R.; NOVEIRI, H. Molecular identification of ESBL Genes blaGES-blaVEB-blaCTX-M blaOXA-blaOXA-4, blaOXA-10 and blaPER- in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by PCR, RFLP and sequencing techniques. **Int J Biol life Sci**, v. 3, n. 6, p. 138-42, 2010.

SHORTTRIDGE, D. *et al.* Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–2016. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2019. p. S63-S68.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SIROT, D. *et al.* Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother**. v.20, n.3, p.323-334.1987.

SLEKOVEC, C. *et al.* Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. **PLoS One**, v. 12, 2012.

SOARES, M. C. S. T. Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ. Niterói. Dissertação [Mestrado em Patologia Experimental] - Universidade Federal Fluminense; 2005.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. **J Med Microbiol**, v. 58, p.1133- 1148, 2009.

SUBEDI, D.; VIJAY, A.K.; WILLCOX, M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. **Clin Exp Optom**. 2017. doi: 10.1111/cxo.12621.

TOGNIM, M. C. Dissemination of IMP-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 2006. In press.

TOLEMAN, M.A. *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother.**, v. 50, p. 673-9, 2002.

TOLLENTINO, F.M. *et al.* High prevalence of blaCTX-M extended spectrum β -lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of blaSHV-12, blaSHV-31, blaSHV-38, and blaCTX-M-15 in Brazil. **Microb. Drug Resist**, v.17, n.1, p.7–16, 2011.

VANEGAS, J. M.; PARRA, O. L; JIMENEZ, N. Molecular epidemiology of carbapenem resistant gram-negative bacilli from infected pediatric population in tertiary care hospitals in Medellín, Colombia: an increasing problem. **BMC Infect. Dis**, v.16, 2016.

VEGA, S.; DOWZICKY, M. J. Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative organisms collected from the Latin American region between 2004 and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 50, 2017.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; COOREA, A. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, 2007.

VOURLI, S.; PANAGIOTA, G.; ALKIVIADIS, C. Novel GES/IBC extended-spectrum β -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 234, n. 2, p. 209-213, 2004.

WACHINO, J. *et al.* Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A β -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the Ω -loop. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2905-2910, 2004.

WATANABE, M. *et al.* Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 35, p. 147-51, 1991.

YAN, J. J. *et al.* Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of VIM-2 enzyme. **Antimicrobio Agents Chemother**, v. 45, p. 2224-2228, 2001.

YANG, X. *et al.* Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lower respiratory tract of ICU patients. **Brazilian Journal of Biology**, n. AHEAD, 2020.

YONG, D. *et al.* Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, 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.

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

ZHANG, A.; VEENSEMEYER, J. L.; HAUSER, A.R. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-Dependent Oligomerization of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU. **Infect Immun**, v.86, n.1,p.1-19, 2018.

APÊNDICE I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Campus Sobral

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Caro participante:

Sou cirurgiã-dentista, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral* e estou desenvolvendo uma pesquisa científica sobre a ocorrência de bactérias que causam infecções hospitalares e que são resistentes a muitos antibióticos. Neste sentido, solicito sua colaboração na participação da pesquisa, aceitando participar da coleta.

Os dados serão apresentados na Universidade Federal do Ceará - Sobral e divulgados junto à comunidade acadêmica, respeitando o caráter confidencial das identidades. Garanto-lhe que sua participação ficará no anonimato, não será divulgado seu nome. Pretendemos com esta pesquisa verificar a virulência e sensibilidade a antibióticos de bactérias que causam infecções em pessoas hospitalizadas.

Você tem o direito de não participar dessa pesquisa se assim o desejar, mas seria importante sua participação. Aceitando participar, se por qualquer motivo, durante o andamento da pesquisa, resolver desistir, tem toda liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento. Reforço que sua colaboração e participação poderão trazer benefícios para o desenvolvimento científico. Participar da coleta não lhe trará riscos para sua saúde, nem mesmo risco de receber advertência por ter participado ou não. Será assegurada a confidencialidade e a privacidade, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, e o material biológico e os dados obtidos nesta pesquisa serão utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo.

Ressalto que não será realizada coleta adicional de sangue ou qualquer outra amostra biológica, ou seja, o isolamento bacteriano será realizado a partir da amostra solicitada e já coletada pela equipe médica do hospital de ensino. Tudo ocorrerá em sigilo. Além disto, será verificada a resistência dessas bactérias a antibióticos, esses dados serão comunicados à equipe médica e poderão auxiliar no seu tratamento.

Para possíveis esclarecimentos entrar em contato comigo no endereço: Avenida Comandante Maurocélvio Rocha Pontes, 100 - Derby - 62042-280 – Sobral – CE, telefone (88) 3695.4722 ou com o Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, Rua Antônio Crisóstomo de Melo, 919 - Centro, Sobral - CE, 62010-550, telefone (88) 3112-0464.

Atenciosamente,

Stephanie de Almeida

Cirurgiã-Dentista – UFC/Sobral

Consentimento Pós-Informado

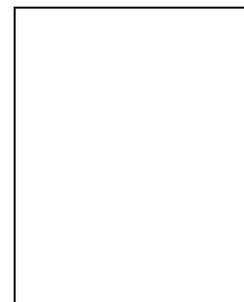
Declaro que tomei conhecimento do estudo que pretende avaliar a ocorrência de bactérias que causam infecções hospitalares e a sensibilidade dessas bactérias a diferentes antibióticos cujo título é “DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGA RESISTENTES”, realizado pela pesquisadora Stephanie de Almeida, compreendi seus propósitos e, concordo em participar da pesquisa, não me oponho à coleta da amostra biológica, e também sei que em qualquer momento posso retirar meu consentimento em participar da mesma.

Sobral, ____ de _____ de 2019.

Ciente:

Assinatura do Sujeito, responsável ou testemunha

Assinatura do Pesquisador



Polegar direito

APÊNDICE II

Tampão 1:

- ✓ 2% triton 100
- ✓ 1% de SDS
- ✓ 10mM Tris/HCl (pH 8)
- ✓ 100mM NaCl
- ✓ 500 mL de água destilada q.s.p.

Tampão 2:

- ✓ 10mM Tris/HCl (pH 8), 1mM EDTA
- ✓ 0,6 de Tris
- ✓ 0,146g EDTA
- ✓ 500 mL de água destilada q.s.p.

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA/CE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Pesquisador: STEPHANIE DE ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13422519.4.0000.5053

Instituição Proponente: Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.378.013

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa está vinculado ao Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará/Campus Sobral. Trata-se de um estudo clínico-experimental em que serão coletados espécimes nosocomiais de *P. aeruginosa* isolados de amostras clínicas de sangue, de infecções do trato respiratório, ponta de cateter percutâneo, secreção de abscesso e de ferida cirúrgica de pacientes internados de 50 pacientes internados em enfermarias e Unidades de Terapia Intensiva com suspeita de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Sobral – CE. Serão utilizadas amostras que já tenham sido previamente solicitadas e coletadas pela equipe médica do referido hospital de ensino, portanto, não será feita coleta adicional de sangue e nem de nenhuma outra amostra clínica do paciente. A identificação dos microrganismos e o Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) serão realizados no laboratório de microbiologia do referido hospital pelo sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Após, os espécimes serão armazenados e enviados em tubos contendo BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia®, Mumbai, Índia) com glicerol a 20% ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Universidade Federal do Ceará (UFC)/Campus Sobral, onde será feita a confirmação da identidade dos isolados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do gene *nan1*, intrínseco à espécie. Além disso, será investigada a presença dos genes de virulência *exoT*, *exoY*, *exoS*, *exoU*, *phzM*, *pilA* e *picH*, e dos genes *bla-TEM*, *bla-SHV*, *bla-OXA*, *bla CTX-M*, *bla-GES*, *bla-VIM*, *MCR1* e *MCR2* associados à resistência bacteriana.

Endereço: Av Comandante Maurocílio Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby **CEP:** 62.041-040
UF: CE **Município:** SOBRAL
Telefone: (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva_comitedeetica@hotmail.com



Continuação do Parecer: 3.378.013

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Detectar a frequência de *P. aeruginosa* multidroga resistentes isoladas de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Sobral e identificar os genes responsáveis pela resistência e virulência desse patógeno, no intuito de se estabelecer uma terapêutica adequada, assim como para a implementação de medidas necessárias para se evitar a disseminação destes patógenos no ambiente hospitalar.

Objetivo Secundário:

- Verificar a frequência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) na Santa Casa de Misericórdia de Sobral por *P. aeruginosa*;
- Investigar o perfil de sensibilidade antimicrobiana de espécimes de *P. aeruginosa* isolados de infecções nosocomiais pelo sistema automatizado VITEK® 2;
- Confirmar a identidade dos isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* por Reação em Cadeia da Polimerase pela presença do gene *nan1*;
- Investigar a presença de genes de virulência: *exoT*, *exoY*, *exoS*, *exoU*, *phzM*, *pilA* e *pilH*;
- Pesquisar a ocorrência dos genes *bla-TEM*, *bla-SHV*, *bla-OXA*, *bla-CTX-M*, *bla-GES*, *bla-VIM*, *MCR1* e *MCR2*, associados à resistência bacteriana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos informados:

procedimento incorrerá em riscos mínimos para os pacientes, uma vez que será assegurada a confidencialidade e a privacidade, e a não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, e que o material biológico e os dados obtidos na pesquisa serão utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo e conforme acordado no TCLE.

Benefícios informados:

Os pacientes serão beneficiados, na medida em que forem identificados microrganismos multirresistentes a partir das amostras coletadas, a equipe médica tomará conhecimento do patógeno, dos seus genes de virulência e do seu perfil de resistência a antibióticos, facilitando o tratamento desses indivíduos.

Endereço: Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby CEP: 62.041-040
UF: CE Município: SOBRAL
Telefone: (88)3677-4255 Fax: (88)3677-4242 E-mail: uva_comitedeetica@hotmail.com



Continuação do Parecer: 3.378.013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante para as áreas das Ciências da Saúde, Saúde Pública e Microbiologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos se encontram apropriados.

Recomendações:

O projeto pode ser aprovado pelo CEP. Encaminhar relatório final da pesquisa a este CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP/UVA, após apresentação e discussão do parecer pelo relator, acatou a relatoria que classifica como aprovado o protocolo de pesquisa. O(a) pesquisador(a) deverá atentar para as recomendações listadas neste parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1346314.pdf	08/05/2019 12:33:33		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	08/05/2019 12:33:10	FRANCISCO CESAR BARROSO BARBOSA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	08/05/2019 12:30:43	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.pdf	08/05/2019 12:27:56	FRANCISCO CESAR BARROSO BARBOSA	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	08/05/2019 12:26:46	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	08/05/2019 12:23:21	FRANCISCO CESAR BARROSO BARBOSA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_UVA.pdf	08/05/2019 12:05:21	FRANCISCO CESAR BARROSO	Aceito

Endereço: Av Comandante Maurocílio Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby **CEP:** 62.041-040
UF: CE **Município:** SOBRAL
Telefone: (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva_comitedeetica@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA/CE



Continuação do Parecer: 3.378.013

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SOBRAL, 07 de Junho de 2019

Assinado por:

**Maria do Socorro Melo Carneiro
(Coordenador(a))**

Endereço: Av Comandante Maurocécio Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby **CEP:** 62.041-040
UF: CE **Município:** SOBRAL
Telefone: (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva_comitedeetica@hotmail.com

Página 04 de 04

Genomic diversity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Brazilian teaching hospital

Stephanie de Almeida-Alves^{1,2}, Ludimila Gomes Pinheiro², Izabelly Linhares Ponte-Brito³, Paulo de Tarso Teles Dourado de Aragão⁴, Ana Jessyca Alves Morais², Guilherme Mendes Prado^{1,2}, Maria Rosineida Paiva Rodrigues², José Edson Rocha Junior², Vicente de Paulo Teixeira Pinto¹, Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle¹, Francisco Cesar Barroso Barbosa^{1,2}.

¹ Graduate Program in Health Sciences - Federal University of Ceara, Sobral, Brazil.

² Laboratory of Microbiology and Parasitology, Federal University of Ceara, Sobral, Brazil.

³ Laboratory of Microbiology of Santa Casa de Misericórdia, Sobral, Ceara, Brazil.

⁴ Laboratory of the Biotechnology Center, Sobral, Ceara, Brazil.

***Corresponding author**

Francisco Cesar Barroso Barbosa, PhD

Laboratory of Microbiology and Parasitology, Federal University of Ceara, Sobral, Brazil

Avenida Comandante Maurocélvio Rocha Pontes, 100, Derby - ZipCode: 62.042-280

Phone: +55 88 3695.4722

Fax number: +55 88 3695.5703

E-mail: fcbbarbosa@yahoo.com.br

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic and multi-drug resistant bacillus commonly involved in infections related to healthcare assistance. This study aimed to investigate the antimicrobial susceptibility profile of nosocomial strains of *P. aeruginosa* isolated from inpatients of a teaching hospital in the City of Sobral, Ceará, Brazil (Santa Casa de Misericórdia de Sobral) from March/2019 to March/2020, as well as to assess the occurrence of resistance genes *bla*-TEM like, *bla*-SHV like, *bla*-CTX-M_{1/2}, *bla*-IMP-1, *bla*-KPC like, *bla*-GES like, *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, *bla*-VIM like. Methodology: Bacterial identification and antimicrobial susceptibility tests (AST) were performed using the automated system Vitek®2. Conventional polymerase chain reaction (PCR) assays were used to amplify genes of interest. Results: Thirty-eight specimens of *P. aeruginosa* were collected and subjected to AST, and thirty-one isolates were subjected to molecular biology analysis. High resistance rates to cephalosporin and tigecycline and low resistance rates to imipenem and meropenem were observed, whereas mostly isolates were sensible to colistin. Among the ESBL-coding genes, *bla*-CTX-M_{1/2} prevailed the most (41.9%), while *bla*-GES like was highly identified among the carbapenemase-producing strains (12.9%). The genes *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, and *bla*-VIM were not detected. Conclusion: the results demonstrated considerable resistance rates to beta-lactam antibiotics, which could be attributable to the indiscriminate use of antibiotics in the analyzed hospital, whose control essentially relies on the improvement of antimicrobial prescription policies. Furthermore, the prevalence of *bla*-CTX-M_{1/2} genes suggests that these enzymes are the major ESBL responsible for the beta-lactam resistance phenotypes among the analyzed strains.

Keywords: beta-lactamases; carbapenemases; *bla* genes; nosocomial infection; antimicrobial resistance.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacillus commonly involved in healthcare-associated infections (HAIs) and can be considered an opportunistic pathogen as it affects immunocompromised patients [1].

This microorganism has been associated with a wide variety of infections such as pneumonia, urinary tract infection, burns, surgical wound infection, cystic fibrosis, bone, and joint infections, as well as systemic infections in immunocompromised individuals, for instance, HIV-positive patients, cancer and pressure ulcer affected ones. Infections of the urinary tract are related to the use of catheters contaminated with the patient microbiota, as well as with microorganisms from healthcare professionals [2,3].

A noticeable ability to acquire mechanisms of resistance to several antimicrobial drugs is an important characteristic of this bacterial species [4,5], being the infections caused by multidrug resistant species (MDR) a therapeutic challenge and represent a rise in mortality/morbidity rates and hospitalization costs [6].

The carbapenems are potent beta-lactams used to treat infections caused by MDR *P. aeruginosa* strains. However, the production of carbapenemases caused an increase in the resistance rates to these antimicrobial drugs, limiting their use, and reducing the therapeutic choices for their associated illnesses [7].

Carbapenemases are beta-lactamases with versatile hydrolytic capacities. They can hydrolyze penicillin, cephalosporin, monobactams, and carbapenems. These enzymes are codified by horizontally-transferable genes which are also associated with resistance determinants to other classes of antimicrobial drugs. Currently, the propagation of carbapenemase-producing organisms, especially gram-negative bacteria, is a public health issue that must be investigated to control its dissemination [8].

Beyond all the identified mechanisms of resistance detected in the *P. aeruginosa* isolates, this specie can produce virulence factors that increase tissue damage, causing cell death and necrosis, as well as enable them to evade the host immune system, which further contributes to the establishment and maintenance of infectious process [9].

Thus, assessing the antimicrobial susceptibility profile and identifying genetic factors involved in the antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* isolates are useful tools to generate epidemiological data. This information can aid health professionals in preventing the dissemination of these pathogens and choosing a suitable therapeutic approach.

This study aimed to analyze the antimicrobial susceptibility profile of nosocomial isolates of *P. aeruginosa* from inpatients of a teaching hospital (Santa Casa de Misericórdia of Sobral) located in the city of Sobral, Ceará, Brazil. Additionally, the occurrence of antimicrobial drug resistance-associated genes *bla*-TEM like, *bla*-SHV like, *bla*-CTX-M 1/2, *bla*-IMP-1, *bla*-KPC like, *bla*-GES like, *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1, *bla*-VIM like in these isolates was assessed.

2. Methodology

2.1 Ethics approval and consent to participate

Ethics approval was issued by the Department of Teaching, Research, and Extension/Continuing Education of the teaching hospital Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS) and Ethics Committee in Research of the State University Vale do Acaraú under the registration number 3.378.013. Participants gave written consent to take part in this study and their anonymity was guaranteed by using a codification system to identify the volunteers without using their respective names.

2.2 Bacterial strains

Thirty-eight nosocomial specimens of *P. aeruginosa* were isolated from March/2019 to March/2020 from clinical samples (blood, urine, tracheal aspirate, cutaneous catheters, wounds, anal swabs, and other non-identified sites of hospitalized patients with the diagnosis of nosocomial infection in this teaching hospital (SCMS), Ceará, Brazil. The samples were obtained from patients admitted to different hospital divisions, such as wards, neonatal intensive care unit, emergency, neurology, intensive care unit for adults, cardiology, oncology, and hemodialysis.

2.3 Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing

Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing (AST) for amikacin, cefepime, ceftazidime, ceftazidime/avibactam, ceftriaxone, cefuroxime axetil, ciprofloxacin, colistin, gentamicin, imipenem, meropenem, tigecycline, ampicillin, ampicillin/sulbactam, ceftazidime, and piperacillin/tazobactam were assessed by the automated system Vitek®2 (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France) in the Laboratory of Microbiology of SCMS (Biovida), Ceará, Brazil. Next, the strains were stored in tubes containing brain and heart infusion (BHI) (Himedia®, Mumbai, India) with 20% glycerol and sent to the Laboratory of Microbiology and Parasitology of the Federal University of Ceará in the city of Sobral, where they were maintained at -80°C (Revco, USA) until genomic analyses were performed.

2.4 DNA extraction and detection of bla genes

Seven out of thirty-eight isolates were not viable to be genetically studied because no bacterial growth occurred upon the reactivation of the isolates. Thus, only thirty-seven isolates of *P. aeruginosa* were subjected to DNA extraction and gene expression identification. The genomic DNA extraction was performed by using the silica microspheres technique [11] and the molecular analysis was carried out by conventional

polymerase chain reaction (PCR) to detect the genes *bla*-TEM like, *bla*-SHV like, *bla*-CTX-M 1/2, *bla*-IMP-1, *bla*-KPC like, *bla*-GES like, *bla*-SPM-1, *bla*-NDM-1 and *bla*-VIM like. All the primers and protocols used for amplification of these genes are described elsewhere [12,13,14,15,16,17]. The sequence of DNA fragments to be amplified and detected are described in Table 1. For all the PCR assays, one reaction without the addition of DNA was used as a negative control for contamination and DNA samples from pre-characterized strains were included added as the positive control. The products of amplification were analyzed in 1% agarose gels to which ethidium bromide was previously added (1.25 µl/100 ml).

2.5 Data analysis

Categorical data were expressed as absolute and relative (%) frequencies and crossed with the genes detected by using Fisher's exact test or Pearson's chi-square test. The sum of antimicrobial drugs to which microorganisms were resistant was expressed as mean and standard deviation, subjected to Kolmogorov-Smirnov normality test for normality assessment, and compared to the genes by Student's t-test. All the analyses were performed using a confidence level of 95% in the software "Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0 for Windows.

3. Results

Eleven out of the 38 *P. aeruginosa* isolates were found in samples from the São Joaquin ward (medical clinics and traumatology and orthopedics division). The majority of such isolates were found in male patients (57.8%). Bloodstream was the most common origin of such isolates (26.3%), followed by urine (13.2%) and tracheal aspirate (13.2%). The distribution of the isolates by hospital division, body origin, and patient gender are presented in table 2.

All isolates were resistant to cefotaxime and tigecycline and presented high resistance to ceftriaxone (97.3%), cefuroxime acetyl (97.3%). Low resistance profile was observed to imipenem (55.2%), meropenem (34.2%), ceftazidime (42%), cefepime (39.4%), ciprofloxacin (31.5%), gentamicin (28.9%), and amikacin (26.31%). Only one isolate was resistant to colistin (2.63%). Twelve out of the 38 isolates were tested against ampicillin, ampicillin/sulbactam, and cefuroxime. All of them were resistant to cefuroxime, and 11 (91.6%) were resistant to the other two antibiotics tested. Finally, 28 (73.6%) of the isolates were tested against piperacillin/tazobactam, but only one was resistant to such antibiotics. Moreover, 2.63% of the isolates presented an intermediate susceptibility to cefepime, ceftazidime, and imipenem. Intermediate susceptibility was also observed to gentamicin (7.8% of the isolates) and meropenem (10.52% of the isolates).

The gene *bla*-*CTX-M*_{1/2} that codifies broad spectrum β -lactamases was the most prevalent one found in 13 (41.9%) of the 31 isolates submitted to the molecular analysis. Moreover, *bla*-*GES* was the most common among the genes that codify carbapenemases. It was identified in 4 (12.9%) of the isolates (Table 2). Comparing the presence of the genes and the number of antibiotics to which the microorganism was resistant, it was observed that the isolates that presented *bla*-*TEM* like genes were statistically resistant to a higher number of antibiotics ($p=0.035$) (Table 3).

Furthermore, six samples simultaneously presented more than one of the analyzed genes, and the gene *bla*-*CTX-M*_{1/2} was present in all of them. Such samples were isolated from inpatients admitted to the ICU and ward for patients with neurological disorders. Amongst these samples, 4 (66.6%) were resistant to imipenem and 3 (50%) were resistant to meropenem (Table 4).

The strains in which the genes *bla-IMP-1* and *bla-GES like* were identified were resistant to amikacin. The only isolate in which the gene *bla-IMP-1* was found presented resistance to 12 antibiotics. Moreover, the presence of this gene was significantly associated with resistance to amikacin ($p=0.038$).

No association was found between the patient's gender or body origin of the isolates with the presence of the resistance genes. However, the presence of the gene *bla-SHV like* was associated with isolates from patients admitted in the neurology division, in the Sao Jose ward, and in the ICU ($p<0,05$) (Table 5).

4. Discussion

The infections caused by *P. aeruginosa* and the development of resistance are becoming a worldwide worrisome problem. The results of our investigation show that most of the patients diagnosed with a nosocomial infection caused by *P. aeruginosa* were male (57.89%). This finding differed from another study performed in the state of Pará, Brazil [21], whose data showed a higher prevalence in female patients (51.9%). The difference in prevalence might be due to the number of samples collected.

As described in our results, the bloodstream was the most common origin of such isolates followed by urine and tracheal aspirate, which corroborate with the findings of a recent Spanish study [6]. The results of the Spanish study also corroborate with our findings regarding the susceptibility profile once the most effective antibiotics against the isolates were colistin, amikacin, and piperacillin/tazobactam. Moreover, most of the isolates presented complete resistance or intermediate susceptibility to imipenem. Our study also showed that colistin was the most effective antimicrobial agent against *P. aeruginosa*, which has also been shown in other Brazilian studies [7,18,19].

Studies in all around the world have shown an association between *P. aeruginosa* infection and patients admitted in the ICU [20,21], differing from our data, which showed such infections in patients admitted in other unities of the hospital. This difference might have occurred because we investigated a university hospital, where there is a high flow of patients, healthcare professionals, students, and professors. The high number of people in and out of the hospital might lead to the dissemination of multi-resistant microorganisms.

Not a long time ago, the carbapenems had an excellent clinical performance in the treatment of *P. aeruginosa* MDR infections. However, such bacteria developed resistance mechanisms to carbapenems after being massively exposed to this and other antimicrobials [22,23]. A study of antimicrobial surveillance [24] reported a resistance rate to carbapenems that varied from 26.1 to 44.4% in *P. aeruginosa* isolated from HAIs of patients from Latin America, Europe, Oriental Mediterranean, Southeast of Asia, and Occidental Pacific. The data regarding antimicrobial resistance of this surveillance study are comparable to our results since half of the isolates were resistant to imipenem and more than a third was resistant to meropenem.

Data of antimicrobial susceptibility to *P. aeruginosa* presented by the Antimicrobial Surveillance Program regarding the period from 1997 to 2000 suggested resistance to Meropenem of only 5.4%. Comparing such rates with it is been currently presented, it is possible to observe that the *P. aeruginosa* resistance to carbapenems increased significantly in the last decades [22]. Resistance rates found in Latin America are worrisome once it is higher than the one found in North America and Europe. In Brazil, the resistance rates are even higher than the one observed in Latin America [22].

A study performed in Iran in 2010 [25] reported the occurrence of the gene *bla*-*TEM* in all samples analyzed, which differed from our results that showed that this gene was found only in one-fifth of the isolates. The gene *bla*-*CTX-M* was found in half of the isolates of our study. We have already found such genes in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with nosocomial infection who were being treated at the same hospital where we performed the work presented in this manuscript [26]. The resistance profile we have been finding in the isolates of the same hospital might be due to the use of different therapeutic protocols adopted by different professionals and regions. Our results also support that CTX-M as the most prevalent ESBL in Brazil [21].

Regarding the detection of the genes *bla*-*IMP-1* e *bla*-*KPC*, our data corroborate with findings of an investigation performed in São Paulo, Brazil [28]. For the detection of gene *bla*-*GES*, our data corroborate with has been found in Iran [16].

Our investigation presents limitations once it was not possible to identify the CTX-M group and the variants TEM, SHV, and GES carried by each stain. However, the results obtained with our work might be useful as epidemiological data that stress the need for future investigations focused on strategies to prevent the dissemination of resistant microorganisms.

5. Conclusion

The data presented in this manuscript stress the high resistance rate to antimicrobials such as tigecycline, as well as describes the isolation of strains resistant to colistin, the drug of choice to treat nosocomial infection caused by *P. aeruginosa* MDR. Moreover, our results of the molecular analyses suggest that the CTX-M enzyme is the main ESBL responsible by the resistance phenotype in the isolates studied. Thus, our data are an alert to the occurrence of an endemic resistance caused by *P. aeruginosa* strains.

Such a resistance profile might be due to the indiscriminate use of antimicrobial drugs, a problem that only can be controlled with the enhancement of prescription policies.

6. Acknowledgements

We would like to acknowledge the hospital Santa Casa de Misericórdia de Sobral for the partial financial support. We also thank professors Florister Elaine Carrara and Suelen Balero de Paula Petroli, who work at the Laboratory of Special Molecular Microbiology and Antimicrobial Resistance at the State University of Londrina, for providing technical support and the pre-characterized bacterial strains.

References

1. Kim, H. J., Kim, H. S., Lee, J. M., Yoon, S. S., & Yong, D. (2016). Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* harboring blaVIM-2, blaIMP-1 and blaOXA-23 genes by using loop-mediated isothermal amplification methods. *Annals of laboratory medicine*, 36(1), 15-22.
2. Sader, H. S., Huband, M. D., Castanheira, M., & Flamm, R. K. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility results from four years (2012 to 2015) of the international network for optimal resistance monitoring program in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(3).
3. Riquena, B., & da Silva, L. V. R. F. (2020). Efetividade de um protocolo de tratamento de erradicação em fases de *Pseudomonas aeruginosa* em crianças com fibrose cística no Brasil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 46(4), e20180294-e20180294.
4. Subedi, D., Vijay, A. K., & Willcox, M. (2018). Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clinical and Experimental Optometry*, 101(2), 162-171

5. Goli, H. R., Nahaei, M. R., Rezaee, M. A., Hasani, A., Kafil, H. S., Aghazadeh, M., ... & Khalili, Y. (2018). Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of infection and public health*, *11*(3), 364-372.
6. Arca-Suárez, J., Fraile-Ribot, P., Vázquez-Ucha, J. C., Cabot, G., Martínez-Guitián, M., Lence, E., ... & Bou, G. (2019). Challenging antimicrobial susceptibility and evolution of resistance (OXA-681) during treatment of a long-term nosocomial infection caused by a *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*(10), e01110-19.
7. De Paula, S. B., Cayô, R., Streling, A. P., Nodari, C. S., Matos, A. P., Perugini, M. R. E., ... & Yamada-Ogatta, S. F. (2017). Detection of blaVIM-7 in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *89*(1), 80-82.
8. Leylabadlo, H. E., Asgharzadeh, M., & Aghazadeh, M. (2015). Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. *Iranian journal of microbiology*, *7*(5), 226.
9. Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *7*, 39.
10. Ellington, M. J., Kistler, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59*(2), 321-322.
11. Brito, E. H., Brilhante, R. S., Cordeiro, R. A., Sidrim, J. J., Fontenelle, R. O., Melo, L. M., ... & Rocha, M. F. (2009). PCR-AGE, automated and manual methods to

- identify *Candida* strains from veterinary sources: a comparative approach. *Veterinary microbiology*, 139(3-4), 318-322.
12. Monteiro, J., Santos, A. F., Asensi, M. D., Peirano, G., & Gales, A. C. (2009). First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(1), 333-334.
 13. Campana, E. H., Xavier, D. E., Petrolini, F. V. B., Cordeiro-Moura, J. R., de Araujo, M. R. E., & Gales, A. C. (2017). Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(1), 57-62.
 14. Nicoletti, A. G., Marcondes, M. F., Martins, W. M., Almeida, L. G., Nicolás, M. F., Vasconcelos, A. T., & Gales, A. C. (2015). Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(9), 5159-5164.
 15. Mathlouthi, N., Al-Bayssari, C., El Salabi, A., Bakour, S., Gwierif, S. B., Zorgani, A. A., ... & Chouchani, C. (2016). Carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from Tunisian and Libyan hospitals. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(07), 718-727.
 16. Amirkamali, S., Naserpour-Farivar, T., Azarhoosh, K., & Peymani, A. (2017). Distribution of the bla OXA, bla VEB-1, and bla GES-1 genes and resistance patterns of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(3), 315-320.
 17. Sader, HS, Reis, AO, Silbert, S., & Gales, AC (2005). IMPs, VIMs e SPMs: a diversidade de metalo - β - lactamases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenem em um hospital brasileiro. *Clinical Microbiology and Infection*, 11 (1), 73-76.

18. Jácome, P. R. L. D. A., Alves, L. R., Cabral, A. B., Lopes, A. C. S., & Maciel, M. A. V. (2012). Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(6), 707-712.
19. Dantas, R. C. C., Silva, R. T. E., Ferreira, M. L., Goncalves, I. R., Araujo, B. F., Campos, P. A. D., & Ribas, R. M. (2017). Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. *PloS one*, 12(5), e0176774.
20. Fernández-Barat, L., Ferrer, M., De Rosa, F., Gabarrús, A., Esperatti, M., Terraneo, S., ... & Torres, A. (2017). Intensive care unit-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance. *Journal of Infection*, 74(2), 142-152.
21. Matos, E. C. O. D., Matos, H. J. D., Conceição, M. L., Rodrigues, Y. C., Carneiro, I. C. D. R. S., & Lima, K. V. B. (2016). Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(3), 305-311.
22. Labarca, J. A., Salles, M. J. C., Seas, C., & Guzmán-Blanco, M. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Critical reviews in microbiology*, 42(2), 276-292.
23. Yang, X., Lai, Y., Li, C., Yang, J., Jia, M., & Sheng, J. (2020). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lower respiratory tract of ICU patients. *Brazilian Journal of Biology*, (AHEAD).

24. Rosenthal, V. D., Al-Abdely, H. M., El-Kholy, A. A., AlKhawaja, S. A. A., Lelebicioglu, H., Mehta, Y., ... & Salgado-Yopez, E. (2016). International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. *American journal of infection control*, *44*(12), 1495-1504.
25. Bokaeian, M., Zahedani, S. S., Bajgiran, M. S., & Moghaddam, A. A. (2015). Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-M genes in resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended spectrum β -lactamases. *Jundishapur journal of microbiology*, *8*(1).
26. Rocha, F. R., Fehlberg, L. C. C., Cordeiro-Moura, J. R., Ramos, A. C., Pinto, V. D. P. T., & Barbosa, F. C. B. (2019). High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. *Microbial Drug Resistance*, *25*(6), 909-914.
27. Rocha, F. R., Pinto, V. P. T., & Barbosa, F. C. B. (2016). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Brazil: a systematic review. *Microbial Drug Resistance*, *22*(4), 301-311.
28. Polotto, M., Casella, T., de Lucca Oliveira, M. G., Rúbio, F. G., Nogueira, M. L., de Almeida, M. T., & Nogueira, M. C. (2012). Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC infectious diseases*, *12*(1), 176.
29. Sader, H. S., Castanheira, M., Mendes, R. E., Toleman, M., Walsh, T. R., & Jones, R. N. (2005). Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *International journal of antimicrobial agents*, *25*(1), 57-61.

Table 1. Primers used for amplification of antimicrobial resistance genes.

Gene	Sequence (5'–3')
<i>bla</i> -TEM like	F: CCCTTATTCCCTTTYTTGCGG R: AACCAGCCAGCCWGAAGG
<i>bla</i> -SHV like	F: ATGCGTTATTAGTTTCGCCTGTGTATTATC R: TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC
<i>bla</i> -CTX-M ½	F: ATGTGCAGYACCAGTAA R: CGCTGCCGGTTTTATCSCCC
<i>bla</i> -IMP-1	F: CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC R: GAACAACCAGTTTTTGCCTTACC
<i>bla</i> -NDM-1	F: GCGCAACACAGCCTGACTTT R: CAGCCACCAAAGCGATGTC
<i>bla</i> -SPM-1	F: AAAATCTGGGTACGCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG
<i>bla</i> -KPC like	F: TCGCTAAACTCGAACAGG R: TTAGTCCCCGTTGACGCCCAATCC
<i>bla</i> -GES like	F: AGCAGCTCAGATCGGTGTTG R: CCGTGCTCAGGATGAGTTG
<i>bla</i> -VIM like	F: GATGGTGTTTGGTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG

Table 2. Distribution of nosocomial isolates of *P. aeruginosa* by hospital division, body origin, gender, and prevalence of the resistance genes.

	n	%
Hospital Division		
Dom Walfrido	1	2.6
Emergency for adults	4	10.5
Hemodialysis	1	2.6
Hospital do Coração	2	5.3
Non-Informed	1	2.6
Neurology	4	10.5
Oncology	1	2.6
São Joaquim	11	28.9
São José	3	7.9
ICU for adults	3	7.9
Neonatal ICU	7	18.4
Body sites		
Tracheal aspirate	5	13.2
Others	11	28.9

Catheter tips	3	7.9
Bloodstream	10	26.3
Wounds	2	5.3
Anal swabs	2	5.3
Urine	5	13.2
Gender		
Female	16	42.1
Male	22	57.9
Genes		
SHV	4	12.9
TEM	6	19.4
CTXM ½	13	41.9
IMP 1	1	3.2
KPC	1	3.2
GES	4	12.9
SPM 1	0	0.0
NDM 1	0	0.0
VIM	0	0.0

Data expressed as absolute and relative (%) frequencies.

Table 3. Influence of gene expression in the antimicrobial resistance profile of nosocomial isolates of *P. aeruginosa*.

	Gene		p-Value
	Absent	Present	
SHV	7.11±3.00	6.75±3.20	0.825
TEM	6.52±2.87	9.33±2.42	*0.035
CTXM 1/2	6.89±3.29	7.31±2.59	0.706
IMP 1	6.90±2.88	12	0.092
KPC	7.00±3.01	9	0.518
GES	7.19±3.13	6.25±1.71	0.567

*p < 0.05, Student's t-test (mean ± SD).

Table 4. Relationship of nosocomial isolates of *P. aeruginosa* with the coexistence of antimicrobial resistance genes and hospital division.

Sample	<i>bla</i> genes detected	IMP	MER	AMI	Division
PA 2	CTX-M1/2. SHV. KPC	R	R	S	Neurology
PA 5	CTX-M1/2. SHV. TEM	R	R	S	ICU for Adults
PA 8	CTX-M1/2. TEM. GES	R	S	S	Neonatal ICU
PA 9	CTX-M1/2. TEM. IMP	R	R	R	Neonatal ICU
PA 12	CTX-M1/2. GES	I	I	R	Neonatal ICU
PA 13	CTX-M1/2. GES	S	S	S	Neurology

*IMP: Imipenem; MER: Meropenem; AMI: Amikacin.

Table 5. Influence of hospital division, body sites, and gender in the detection of the antimicrobial resistance genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M 1/2}.

	SHV		p- Value	TEM		p- Value	CTXM 1/2		p- Value
	Absent	Present		Absent	Present		Absent	Present	
HD									
DW	1 (3.7%)	0 (0.0%)	0.024	1 (4.0%)	0 (0.0%)	0.284	1 (5.6%)	0 (0.0%)	0.627
EA	4 (14.8%)	0 (0.0%)		3 (12.0%)	1 (16.7%)		2 (11.1%)	2 (15.4%)	
HEM	1 (3.7%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	0 (0.0%)	

HC	2 (7.4%)	0 (0.0%)		2 (8.0%)	0 (0.0%)		2 (11.1%)	0 (0.0%)	
NI	1 (3.7%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	0 (0.0%)	
NEU	2 (7.4%)	1 (25.0%)*		3 (12.0%)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	2 (15.4%)	
ONC	1 (3.7%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	0 (0.0%)	
SJQ	7 (25.9%)*	0 (0.0%)		7 (28.0%)	0 (0.0%)		3 (16.7%)	4 (30.8%)	
SJ	0 (0.0%)	2 (50.0%)*		2 (8.0%)	0 (0.0%)		2 (11.1%)	0 (0.0%)	
ICU	1 (3.7%)	1 (25.0%)*		1 (4.0%)	1 (16.7%)		1 (5.6%)	1 (7.7%)	
N ICU	7 (25.9%)*	0 (0.0%)		3 (12.0%)	4 (66.7%)		3 (16.7%)	4 (30.8%)	
Body sites									
T. aspirate	3 (11.1%)	1 (25.0%)	0.902	4 (16.0%)	0 (0.0%)	0.227	3 (16.7%)	1 (7.7%)	0.349
Others	8 (29.6%)	2 (50.0%)		9 (36.0%)	1 (16.7%)		5 (27.8%)	5 (38.5%)	
Catheter tips	3 (11.1%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	2 (33.3%)		2 (11.1%)	1 (7.7%)	
Bloodstream	8 (29.6%)	1 (25.0%)		6 (24.0%)	3 (50.0%)		6 (33.3%)	3 (23.1%)	
Wounds	2 (7.4%)	0 (0.0%)		2 (8.0%)	0 (0.0%)		2 (11.1%)	0 (0.0%)	
Anal swab	2 (7.4%)	0 (0.0%)		2 (8.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	2 (15.4%)	
Urine	1 (3.7%)	0 (0.0%)		1 (4.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	1 (7.7%)	
Gender									
Female	15 (55.6%)	0 (0.0%)	0.101	12 (48.0%)	3 (50.0%)	0.930	11 (61.1%)	4 (30.8%)	0.095
Male	12 (44.4%)	4 (100.0%)		13 (52.0%)	3 (50.0%)		7 (38.9%)	9 (69.2%)	

*p<0.05, Fisher's exact test and Pearson's chi-square test (n, %).