



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

MARÍLIA SILVEIRA MAIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS
DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE FORTALEZA,
CEARÁ, BRASIL**

FORTALEZA

2023

MARÍLIA SILVEIRA MAIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS
DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE FORTALEZA,
CEARÁ, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutora em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- M187d Maia, Marília.
Diagnóstico molecular de resistência antimicrobiana em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes em unidade de terapia intensiva de um hospital universitário de Fortaleza, Ceará, Brasil. / Marília Maia. – 2023.
89 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. *P. aeruginosa*. 2. Resistência. 3. Biologia molecular. I. Título.

CDD 616.9

MARÍLIA SILVEIRA MAIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS
DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE FORTALEZA,
CEARÁ, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutora em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marco Antônio de Freitas Clementino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Lauro Vieira Perdigão Neto
Hospital São José de Doenças Infeciosas (HSJ)

Dr. Paulo César Pereira de Sousa
Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC)

Dra. Vânia Marilande Ceccatto
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A DEUS, por me conceder o dom da vida.
Aos meus pais Tadeu e Neuma,
por todo amor e dedicação.
E as minhas filhas Nicolle e Giovanna,
sem elas eu nada seria.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, pelo exemplo de profissionalismo e comprometimento com o conhecimento científico, pelos ensinamentos transmitidos, compreensão e apoio ao longo dessa jornada, e, principalmente pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt, pelos momentos em que se dedicou a esclarecer minhas dúvidas e a me auxiliar durante a execução dessa pesquisa.

Ao Lavouisier e ao Marco Clementino pela enorme ajuda no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado pelas discussões científicas ao longo destes anos de forma a elucidar as minhas dúvidas.

A toda família do Laboratório de Doenças Infecciosas e Laboratório de Toxinologia Molecular Ana Karolina Santos, Herlice Veras, Pedro Henrique, Xhaulla, Samilly Ribeiro, Cléber Ferreira, Thiago Miranda, Dayara, Rafaella Gondim e Lyvia Carneiro por todo apoio, incentivo e auxílio de maneira direta e indireta na realização desse trabalho.

Aos participantes que integraram a banca de qualificação e de defesa, pelas discussões construtivas e sugestões para a melhoria deste trabalho.

Aos professores do programa em Microbiologia Médica pela dedicação, transmissão de todo conhecimento que contribuiu para a minha evolução acadêmica e científica, muito obrigada.

Aos colegas da turma de doutorado em Microbiologia Médica, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Ao funcionário, José Amadeus, pela dedicação ao funcionamento desta unidade e, conseqüentemente, de todos os trabalhos nela desenvolvidos.

Ao Charles Melo e Kátia Lima Nogueira, pelo esforço e paciência na administração deste e de todos os outros estudos em curso na UPC/IBIMED.

Aos funcionários do Sistema de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), da UPC/IBIMED, José Quirino Filho e Francisco de Sousa Júnior, pela digitação, verificação e análise parcial dos dados coletados.

Às técnicas Terezinha de Jesus, Luciana França e Charliene Melo por seu auxílio na preparação de soluções, cuidado e organização do laboratório.

A FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a compreender.”

(Marie Curie)

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista de grande relevância clínica em unidades de terapia intensiva (UTI), principalmente devido a sua alta resistência a diversos antimicrobianos, o que por vezes impossibilita um tratamento eficaz, levando a alta morbidade e mortalidade de pacientes em situações críticas. O objetivo desse estudo foi determinar os principais fenótipos e genótipos relacionados à resistência antimicrobiana em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados em (UTI) de um hospital universitário em Fortaleza, Ceará, Brasil. Este estudo descritivo analisou cepas isoladas destes pacientes, coletadas no período de abril de 2019 a maio de 2021, nas quais foram realizados testes fenotípicos para 15 drogas utilizadas no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) empregado no hospital em questão. Através de qPCR foram avaliados 14 genes que codificam β -lactamases e 13 genes que codificam bombas de efluxo, para identificação do perfil genético de resistência aos antimicrobianos dos isolados. Durante o período deste estudo, foram isoladas 258 cepas de bactérias Gram negativas resistentes a pelo menos um antimicrobiano, dessas 20,9% (54/258) foram identificadas como *P. aeruginosa*, esses isolados mostraram um perfil fenotípico de resistência que variou de 100% a 28,3% dentre as drogas testadas, excetuando a colistina, a ceftazidima/avibactam e ceftolozone/tazobactam para as quais não foi verificada resistência. Os genes relacionados à β -lactamases mais presentes em todos os isolados foram os genes *blaKPC* 81,49% (44/54), *blaCTXM-2* 72,22% (39/54), *blaCTXM-1* 66,66% (36/54), *blaCTXM-5* 59,25% (32/54), *blaSHV* 40,74% (22/54), e por fim, *blaTEM* e *blaOXA-23* 38,89% (21/54). Houve associação entre a presença dos genes: *blaTEM* e resistência a ceftazidima, cefepima, ao imipenem e meropenem (P=0,017; P=0,017; P=0,018 e P=0,034, respectivamente); *blaOXA-23* e resistência a ceftazidima e cefepima (P=0,041) e *blaOXA-51* e resistência ao meropenem (P=0,043). Foi observado 100% de positividade para os genes que codificam as bombas de efluxo *MEX-AB*, *MEX-EF*, *MEX-GH*, *MEX-VW*, *MEX-XY*, seguido por 96,3% de positividade para o gene *MEX-CD*, não houve associação estatística entre o perfil fenotípico e a presença das bombas de efluxo. Conclui-se que as cepas de *P. aeruginosa* isoladas neste estudo possuem um arsenal de genes codificadores de β -lactamases capazes de induzir padrões fenotípicos de resistência a vários antimicrobianos comumente utilizados para essas infecções, dificultando o tratamento para o paciente.

Palavras-chave: *P. aeruginosa*. Resistência. Antimicrobianos

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen of clinical relevance in intensive care units (ICUs), mainly due to its high resistance to several antimicrobials, which sometimes prevents effective treatment, leading to high morbidity and mortality of patients in critical situations. The aim of this study was to determine the main phenotypes and genotypes related to antimicrobial resistance in strains of *P. aeruginosa* isolated from patients admitted to the (ICU) of a teaching hospital in Fortaleza, Ceará, Brazil. This descriptive study analyzed strains isolated from these patients, collected from April 2019 to May 2021, in which phenotypic tests were performed for 15 drugs used in the antimicrobial susceptibility test (AST) used at the hospital in question. Using qPCR, 14 genes encoding β -lactamases and 13 genes encoding efflux pumps were evaluated to identify the genetic profile of resistance to antimicrobials of the isolates. During the period of this study, 258 Gram-negative bacteria resistant to at least one antimicrobial were isolated, of which 20.9% (54/258) were identified as *P. aeruginosa*, these isolates showed a phenotypic profile of resistance that varied from 100% to 28.3% among the drugs tested, except for colistin, ceftazidime/avibactam and ceftolozone/tazobactam, for which resistance was not verified. The genes related to β -lactamases most present in all isolates were the gene *blaKPC* 81.49% (44/54), *blaCTXM-2* 72.22% (39/54), *blaCTXM-1* 66.66% (36/ 54), *blaCTXM-5* 59.25% (32/54), *blaSHV* 40.74% (22/54), and finally, *blaTEM* and *blaOXA-23* 38.89% (21/54). There was an association between the presence of the genes: *blaTEM* and resistance to ceftazidime, cefepime, imipenem and meropenem (P=0.017; P=0.017; P=0.018 and P=0.034, respectively); *blaOXA-23* and ceftazidime and cefepime resistance (P=0.041) and *blaOXA-51* and meropenem resistance (P=0.043). 100% positivity was observed for the genes that encode the *MEX-AB*, *MEX-EF*, *MEX-GH*, *MEX-VW*, *MEX-XY* efflux pumps, followed by 96.3% positivity for the *MEX-CD* gene, there was no statistical association between the phenotypic profile and the presence of efflux pumps. It is concluded that the strains of *P. aeruginosa* isolated in this study have an arsenal of genes encoding β -lactamases capable of inducing phenotypic patterns of resistance to several antimicrobials commonly used for these infections, making treatment difficult for the patient.

Keywords: *P. aeruginosa*. Resistance. Antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Coloração de Gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> envolta por material capsular mucoide isoladas de paciente com fibrose cística.....	18
Figura 2 - Distribuição dos genes produtores de carbapenemases em todo o mundo.....	36
Figura 3 - Localização da bomba de efluxo na membrana bacteriana e suas vias de influxo e efluxo em bactérias Gram-negativas.....	37
Figura 4 - Fluxograma de execução do Estudo.....	41
Figura 5 - Origem das cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas da Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC.....	52
Figura 6 - Percentual dos genes codificadores de β -lactamases de espectro estendido da classe A de Ambler encontrados nos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	54
Figura 7 - Percentual dos genes codificadores de carbapenemases de classe A e B de Ambler encontrados nos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	55
Figura 8 - Percentual dos genes codificadores de β -lactamases da classe D de Ambler encontrados nos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	55
Figura 9 - Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a ceftazidima em cepas de <i>P. aeruginosa</i>	61
Figura 10 - Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a cefepima em cepas de <i>P. aeruginosa</i>	62
Figura 11 - Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a imipenem em cepas de <i>P. aeruginosa</i>	63
Figura 12 - Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a meropenem em cepas de <i>P. aeruginosa</i>	64
Figura 13 - Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a piperacilina/tazobactam em cepas de <i>P. aeruginosa</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros para análise do qPCR para os genes codificadores de bombas de efluxo.....	45
Tabela 2 - Parâmetros para análise do qPCR para os genes codificadores de β -lactamases.....	46
Tabela 3 – Descrição dos genes relacionados à codificação de bombas de efluxo.....	47
Tabela 4 – Descrição dos genes relacionados à codificação de β -lactamases.....	49
Tabela 5 - Descrição dos genes relacionados à codificação de β -lactamases do tipo OXA.....	50
Tabela 6 - Fenótipo de resistência aos β -lactâmicos das cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas dos pacientes na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC....	53
Tabela 7 - Fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e gliciliclinas das cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas dos pacientes na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC.....	53
Tabela 8 - Percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> nos grupos resistente e susceptível ao antimicrobiano cefepima e ceftazidima.....	56
Tabela 9 - Percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> nos grupos resistente e susceptível ao antimicrobiano piperacilina com tazobactam.....	57
Tabela10 - Percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> nos grupos resistente e susceptível ao antimicrobiano imipenem.....	58
Tabela11 - Percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> nos grupos resistente e susceptível ao antimicrobiano meropenem.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGN	Bactérias Gram-negativas
UTI	Unidade de terapia intensiva
MDRO	Microrganismos multirresistentes
AcrAB-TolC	Bombas de efluxo da família Acr
Mex	Bombas de efluxo da família Mex
RND	Divisão de nodulação de resistência
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
FC	Fibrose cística
LPS	Lipopolissacarídeo
OMPs	Proteínas de membrana externa, do inglês, <i>out membrane proteins</i>
T6SS	Sistema de secreção do tipo 6
T4SS	Sistema de secreção do tipo 4
T3SS	Sistema de secreção do tipo 3
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.</i>
IRAs	Infecções relacionadas à assistência à saúde
MDR	Microrganismos multirresistentes, do inglês <i>multidrug-resistant</i>
XDR	Microrganismos extensivamente resistentes, do inglês <i>extensively drug-resistant</i>
PDR	Microrganismos panresistentes, do inglês <i>pandrug-resistant</i>
ECDC	Centro europeu de prevenção e controle de doenças, do inglês <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
FIOCRUZ	Instituto Oswaldo Cruz
TSA	Testes de susceptibilidade antimicrobiana
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Proteína de ligação à penicilina
ESBL	β -lactamases de espectro estendido

AmpC	β -lactamases ampicilina C cromossômica
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucleico
ICE	Elementos integrativos e conjugativos
<i>bla</i>	Gene de β -lactamase
MBLs	Metallo- β -lactamases
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
TEM-1	Temoinera variante 1
TEM	Temoinera
SHV	Sulfidrilas variáveis
TEM-3	Temoinera variante 3
SHV-1	Sulfidrilas variáveis variante 1
CTX-M	Cefotaxima-M
CTXM-15	Cefotaxima-M variante 15
OXA	Oxacilina
OXA-1	Oxacilina variante 1
OXA-10	Oxacilina variante 10
OXA-23	Oxacilina variante 23
OXA-24	Oxacilina variante 24
OXA-58	Oxacilina variante 58
OXA-146	Oxacilina variante 146
GES	Do inglês, <i>Guiana Extended Spectrum β-lactamase</i>
GES-1	Do inglês, <i>Guiana Extended Spectrum β-lactamase</i> variante 1
NDM	Nova deli metalo- β -lactamase
VIM	Integron de Verona
IMP	Imipenemase metalo- β -lactamase
MI	Membrana interna
ME	Membrana externa
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio

UFC	Universidade Federal Ceará
LCR	Líquido cefalorraquidiano
CLSI	Instituto de padronização clínica e laboratorial - do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ATCC	Do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RPM	Rotações por minuto
TE	Tris-EDTA
H ₂ O	Água
T _a	Temperatura de anelamento
T _m	Temperatura de melting

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
β	Beta
%	Porcentagem
μm	Micrômetro
Zn ²⁺	Zinco
ng	Nanograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
<	Maior que
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	18
2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.2.1	<i>Características gerais</i>	19
2.2.2	<i>Patofisiologia das infecções por Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2.2.3	<i>Impacto clínico da P. aeruginosa resistente a antimicrobianos no ambiente hospitalar</i>	21
2.3	Classes de antimicrobianos comumente utilizados	23
2.3.1	<i>Classe dos β-lactâmicos</i>	23
2.3.1.1	<i>Penicilinas</i>	24
2.3.1.2	<i>Cefalosporinas</i>	24
2.3.1.3	<i>Carbapenêmicos</i>	26
2.3.1.4	<i>Monobactâmicos</i>	27
2.3.1.5	<i>B-lactâmicos combinados com inibidores de β-lactamases</i>	27
2.3.2	<i>Classe dos aminoglicosídeos</i>	28
2.3.3	<i>Classe das quinolonas</i>	29
2.3.4	<i>Classe das glicilciclinas</i>	30
2.4	Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	31
2.4.1	<i>Inibição enzimática por β-lactamases</i>	32
2.4.2	<i>Bombas de efluxo bacteriano</i>	36
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Obtenção e identificação dos isolados bacterianos	41
4.2	Seleção das cepas analisadas	42
4.3	Extração do DNA bacteriano	42
4.4	Desenho dos iniciadores utilizados no estudo	43
4.5	Extração de DNA bacteriano em gel de agarose e desenvolvimento de controles positivos para os genes analisados	44
4.6	Avaliação da curva de eficiência e limite de detecção dos iniciadores	45

4.7	Detecção dos genes relacionados à resistência por qPCR.....	46
4.8	Análise dos dados.....	51
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Prevalência de <i>P. aeruginosa</i> no estudo.....	52
5.2	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos testados nos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	53
5.3	Detecção dos genes de resistência nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> por qPCR.	54
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	72
8	REFERÊNCIAS.....	73
9	ANEXO A.....	85

1. INTRODUÇÃO

Bactérias Gram-negativas (BGN) resistentes a antimicrobianos são particularmente uma preocupação a nível mundial devido a sua alta morbidade e mortalidade, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTI) (WHO, 2017). O surgimento e propagação da resistência microbiana é um problema global que possui profundas consequências no âmbito da saúde pública e da economia (FLEECE, 2018).

Por causa da pressão seletiva exercida pelo grande uso de antimicrobianos e a longa permanência de pacientes com sistema imunológico comprometido, infecções relacionadas a microrganismos multirresistentes (MDRO, do inglês, *multidrug-resistant organisms*) são prevalentes nas dependências das UTIs (AMARAL et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; ANVISA, 2007). As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRASs) causada por MDRO são consideradas uma ameaça à saúde pública, pois limitam ou até mesmo inviabilizam as opções terapêuticas disponíveis, o que aumenta a gravidade e, conseqüentemente, os índices de morbidade e mortalidade dos acometidos, elevando o tempo de internação dos pacientes e os custos hospitalares (WHO, 2017).

Devido à constante evolução dos microrganismos, a *Pseudomonas aeruginosa*, um importante patógeno oportunista Gram-negativo que causa uma variedade de doenças infecciosas, tem adquirido resistência a diversos antimicrobianos nos últimos tempos, sendo os mecanismos enzimáticos e de bombas de efluxo os mais predominantes (BOTELHO et al., 2019). Pelo menos oito mecanismos distintos de resistência antimicrobiana têm sido descritos em bactérias, sendo os principais: mecanismo enzimático, ativação das bombas de efluxo, mudança de conformação do receptor alvo e diminuição dos canais de porinas (OPAL; POPVICAS, 2020).

As bombas de efluxo relacionada à resistência a vários antimicrobianos, particularmente aquelas representadas pelas bombas AcrAB-TolC e Mex da superfamília divisão de nodulação de resistência (RND, do inglês, *resistance nodulation division*), não apenas medeiam a resistência microbiana intrínseca e adquirida, mas também estão envolvidas em outras funções, incluindo a resposta bacteriana ao estresse e a patogenicidade (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015; LV et al., 2020; NI et al., 2020).

Portanto, temos como objetivo determinar os principais fenótipos e genótipos relacionados à resistência antimicrobiana em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital universitário de Fortaleza, Ceará, Brasil.

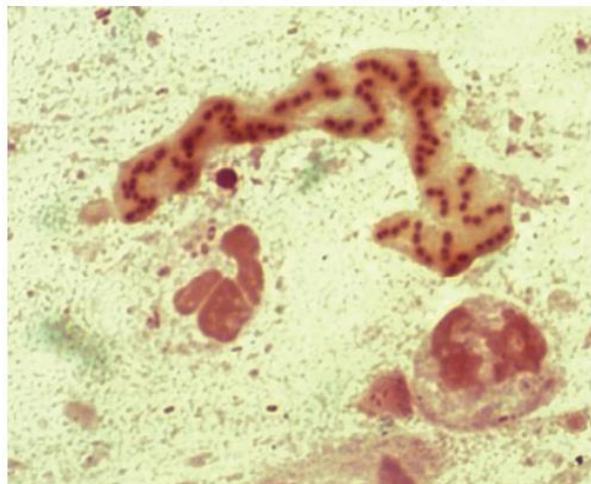
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Pseudomonas* sp.

O gênero *Pseudomonas* faz parte da família *Pseudomonadaceae*, e foi descrito pela primeira vez em 1894 por Walter Emil Friedrich August Migula, ele era um botânico dedicado à taxonomia vegetal, uma ciência que começou mais de um século antes da taxonomia bacteriana quando o microscópio composto atingiu o poder de resolução necessário para a observação desses organismos (PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2009). Migula visualizou células móveis com esporos, como o nanoflagelado *Monas* spp. Assim, o nome *Pseudomonas* foi gerado a partir da identificação dessa falsa ou “pseudo” *Monas* spp. (MIGULA, 1900).

As espécies que compõe o gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos, não fermentadores, geralmente móveis, retos ou ligeiramente curvados (0,5 a 1,0 por 1,5 a 5,0 µm) tipicamente dispostos em pares (**Figura 1**). Esses microrganismos utilizam carboidratos por meio da respiração aeróbia, com o oxigênio como receptor final de elétrons. Embora descrito como aeróbios, eles podem crescer anaerobicamente usando nitrato ou arginina como alternativa de receptor de elétrons. A presença de citocromo-oxidase, em espécies de *Pseudomonas*, é usada para diferenciá-las das *Enterobacteriaceae* e de *Stenotrophomonas*. Algumas espécies são produtoras de pigmentos hidrossolúveis e aproximadamente 200 espécies de *Pseudomonas* já foram caracterizadas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 7ªEd., 2014).

Figura 1. Coloração de Gram de *Pseudomonas aeruginosa* envolta por material capsular mucoide isoladas de paciente com fibrose cística.



Legenda: *P. aeruginosa* disposta aos pares envolta por material capsular mucoide isoladas de paciente com fibrose cística. Fonte: MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 7ªEd., 2014.

Esse gênero bacteriano é o mais diversificado e onipresente cujas espécies foram isoladas por todo o mundo em todos os tipos de ambientes, da Antártica aos trópicos, presentes em sedimentos, amostras clínicas humanas, plantas, amostras de animais doentes, água, solo, rizosfera vegetal, mar, desertos etc. Ao longo dos anos, à medida que as técnicas de caracterização e classificação de microorganismos foram evoluindo, muitos táxons bacterianos incluídos inicialmente no gênero *Pseudomonas* foram reclassificados em outros gêneros ou espécies de uma classe diferente de proteobactérias (JURADO-MARTÍN; SAINZ-MEJÍAS; MCCLEAN, 2021).

Palleroni e colaboradores, em 1973, criaram critérios genótipicos para a classificação do gênero *Pseudomonas*, esse critério consistia em subdividir as *Pseudomonas* em cinco grupos por homologia do ácido ribonucleico ribossômico (RNAr), tendo como base os estudos de homologia do RNAr-DNA. No entanto, essas subdivisões de RNAr eram filogeneticamente muito distantes, e apenas os representantes incluídos no grupo I de RNAr permaneceriam finalmente incluídos no gênero *Pseudomonas*.

As espécies de *Pseudomonas* clinicamente relevantes podem ser divididas em dois grupos distintos com base em sua capacidade de produzir certos pigmentos fluorescentes. O grupo fluorescente de *Pseudomonas* que inclui *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. monteilii*, *P. veronii* e *P. mosselii*. O grupo não fluorescente inclui *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. luteola* e *P. oryzihabitans* (JAWETZ; MELNICK & ADELBERG'S, 28ª Ed., 2020). Destes, a *P. aeruginosa* é considerada o principal patógeno no grupo das *Pseudomonas*, no entanto, outras *Pseudomonas* também podem ser menos frequentemente isoladas em laboratórios clínicos como causadoras de doenças (PALLERONI, 2010).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1. Características gerais

A espécie *P. aeruginosa* foi descrita anteriormente, por Schroeter em 1872, por causa da cor das colônias em certos meios de cultura, lembrando ferrugem de cobre ou verdete, Schroeter anexou o nome ao gênero *Bacterium*, dando o nome à espécie de *Bacterium aeruginosum*, e mais tarde, Migula transferiu a espécie para o recém-descrito gênero *Pseudomonas* (SCHROETER, 1872; MIGULA, 1900).

As características fundamentais para a identificação fenotípica de cepas *P. aeruginosa* consistem no crescimento típico de colônias em temperaturas de 35°C a 42°C, produção de pigmentos (pioverdina e piocianina), odor característico e motilidade positiva.

Em testes bioquímicos, apresentam oxidase positiva, lisina descarboxilase negativo, citrato positivo, indol negativo, consome glicose apenas pela via oxidativa, não podendo fermentar esse açúcar, oxida a maltose e lactose e reduz nitrato a nitrito (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; LUCE, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 7ªEd., 2014). A ampla distribuição ambiental desse patógeno se deve a sua baixa exigência e versatilidade nutricional de crescimento. Elas são capazes de usar muitos compostos orgânicos como fontes de carbono e nitrogênio, e algumas cepas podem até crescer em água destilada usando pequenas quantidades de nutrientes essenciais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 7ªEd., 2014).

P. aeruginosa está comumente presente em ambientes úmidos, em hospitais e até mesmo em desinfetantes. Embora não faça parte da microbiota humana normal, este patógeno é capaz de colonizar vários locais do corpo (por exemplo, membrana mucosa, trato respiratório e trato gastrointestinal). É conhecido por causar doenças em humanos, especialmente em pessoas imunodeficientes ou imunossuprimidas, por se tratar de um patógeno oportunista (SPIERS; BUCKLING; RAINEY, 2000).

A *P. aeruginosa* é uma causa significativa de infecções associadas aos cuidados de saúde, sendo particularmente problemática em UTI. Suas infecções estão associadas à alta morbidade e mortalidade em muitos grupos, incluindo indivíduos com pneumonia associada à assistência à saúde, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou fibrose cística (FC) (WINSTANLEY; O'BRIEN; BROCKHURST, 2016; WUNDERINK; WATERER, 2017).

2.2.2. Patofisiologia das infecções por *Pseudomonas aeruginosa*

Como um patógeno bastante versátil, *P. aeruginosa* é capaz de causar infecções agudas e crônicas. *P. aeruginosa* é uma das principais causas de infecções hospitalares em pacientes, causando pneumonia adquirida no hospital juntamente com pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções gastrointestinais, dermatite, infecção do trato urinário, infecções de pele, tais como foliculite e otite externa, bacteremia, infecções de tecidos moles, infecções do sistema respiratório em pacientes com FC, infecções ósseas e articulares e várias outras infecções, especialmente em pacientes com queimaduras graves e pacientes imunocomprometidos, como aqueles com câncer ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (JURADO-MARTÍN; SAINZ-MEJÍAS; MCCLEAN, 2021; ROSSI et al., 2021).

Esse patógeno apresenta um vasto repertório de fatores de virulência que contribuem para sua patogênese, sendo esses fatores controlados por circuitos reguladores e

sistemas de sinalização complexos e interconectados, que conferem a esse patógeno uma grande plasticidade (JIMENEZ et al., 2012).

Dentre os fatores de virulência relacionados à patogenicidade de *P. aeruginosa* estão, os lipopolissacarídeos (LPS), as lipoproteínas, a exotoxina A, as enzimas proteolíticas, as porinas pertencentes à superfamília OprF, OprH, e OprD e a piocianina que é um metabolito secundário que confere coloração azul-esverdeada as colônias e que está associada à gravidade da doença e ao declínio da função pulmonar devido aos seus efeitos pró-inflamatórios, esses fatores de virulência estão abrigados no genoma da *P. aeruginosa*, que conferem notável flexibilidade metabólica e capacidade de adaptação a múltiplas condições, incluindo a resposta imune do hospedeiro (JURADO-MARTÍN; SAINZ-MEJÍAS; MCCLEAN, 2021; QIN et al., 2022).

O LPS é um importante componente estrutural de superfície e a endotoxicidade do lipídeo A decorre em dano tecidual, fixação e reconhecimento pelos receptores do hospedeiro (PARK et al., 2002). As proteínas de membrana externa (OMPs, do inglês, *out membrane proteins*) contribuem para a troca de nutrientes, adesão e resistência a antimicrobianos. Além disso, a resistência a medicamentos causada pela formação de biofilmes está associada ao flagelo, pili e outras adesinas. Por fim, a *P. aeruginosa* possuem alguns tipos de sistemas de secreção, incluindo flagelos (associados a T6SS), pili (T4SS) e sistema de secreção do tipo 3 (T3SS), que funcionam na colonização, adesão, dispersão e sinalização quimiotática do patógeno no hospedeiro (CHAMBERS et al., 2022; OZER et al., 2021).

2.2.3. Impacto clínico da P. aeruginosa resistente a antimicrobianos no ambiente hospitalar

A resistência antimicrobiana é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, emergindo como uma das principais ameaças do século XXI. Estima-se que somente no ano de 2019, aproximadamente 4,95 milhões de óbitos foram associados a infecções bacterianas, causadas por microrganismos resistentes a antimicrobianos. (ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022). A resistência aos antimicrobianos tem sido particularmente detectada em patógenos bacterianos, denominado ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), não coincidentemente estes patógenos são os principais causadores de infecções nosocomiais (OLIVEIRA et al, 2020; SANTAJIT et al, 2016).

Um dos maiores problemas de saúde pública global na atualidade é a patogênese associada ao surgimento de bactérias infecciosas resistentes a antimicrobianos, sendo a *P.aeruginosa* considerada um patógeno problemático por ser bastante versátil e responsável por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAs) com taxas elevadas de morbidade e mortalidade, isso provavelmente se deve à administração de antibióticos com efeito subótimo ou nenhum efeito contra esses microrganismos (KIM et al., 2018; CHOU et al., 2020; MONTERO et al., 2020; BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

No contexto epidemiológico, a resistência bacteriana aos antimicrobianos têm sido classificada por terminologias padronizadas, como a descrita por Magiorakus et al. (2012), no qual microrganismos multirresistentes (MDR, do inglês *multidrug-resistant*) são aqueles isolados que apresentam resistência a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos. Microrganismos extensivamente resistentes (XDR, do inglês *extensively drug-resistant*) são aqueles que apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano de todas as classes, podendo excluir no máximo duas classes. E, por fim, microrganismos panresistentes (PDR, do inglês *pandrug-resistant*) são aqueles microrganismos que apresentam resistência a todos os antimicrobianos de todas as classes existentes.

De acordo com o mais recente relatório de vigilância de resistência antimicrobiana do centro europeu de prevenção e controle de doenças (ECDC), que avaliaram isolados de *P. aeruginosa* nos anos de 2013 a 2016, a média dos isolados de *P. aeruginosa* com resistência combinada (resistência a três ou mais grupos antibióticos, incluindo carbapenêmicos) foi de 12,9% (ECDC, 2016). Além disso, estudo realizado em Singapura observou um percentual de 11,5% de infecções relacionadas à saúde ocasionadas por *P. aeruginosa*, no qual 23% desses isolados foram resistentes aos carbapenêmicos (CAI et al., 2017).

Nos Estados Unidos, a *P. aeruginosa* é a principal causa de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em hospitais de cuidados intensivos de longo prazo e em enfermarias e a segunda causa mais comum de PAV em unidades de terapia intensiva. Também é a terceira causa mais comum de infecções do trato urinário relacionadas ao cateter, no geral, é reportado um percentual de 10-30% desses isolados resistentes a carbapenêmicos (TENOVER; NICOLAU; GILL, 2022; WEINER-LASTINGER et al., 2020).

No Brasil, diversos surtos ocasionados por esse microrganismo têm sido relatados em várias regiões do país (JARA et al, 2020; RIBEIRO et al, 2020; SANTOS et al., 2019).

Um estudo retrospectivo descritivo realizado em patógenos isolados de pacientes internados na UTI de um hospital de São Paulo, conduzido de janeiro de 2010 a Dezembro de 2013, analisaram 6.473 isolados, destes 14,5% (939 /6.473) foram identificados como sendo *P. aeruginosa*, sendo 48,7% (457/939) destes classificados como MDR, tendo uma alta prevalência nos anos de 2010 (51,2%) e 2013 (52,9%) (RIBEIRO et al, 2020).

Pesquisadores do instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), analisaram 88 cepas não-duplicadas de *P. aeruginosa* que foram randomizadas de um total de 615 cepas isoladas em um período de 21 anos, dividindo-os em quatro períodos: anos de 1995-1999 (1º período), 2000-2005 (2º período), 2006-2010 (3º período) e 2011-2015 (4º período), em 10 hospitais da cidade do Rio de Janeiro, no qual 31,8% foram identificadas como microrganismos MDR e 28,4% como microrganismo XDR, os pesquisadores concluíram que com o passar dos anos as taxas de resistência aos antimicrobianos aumentaram, principalmente para os antimicrobianos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (SANTOS et al., 2019).

Em uma pesquisa realizada em um hospital localizado no Rio Grande do Sul, os pesquisadores analisaram 286 testes de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) de isolados bacterianos e identificaram uma prevalência de 6,99% (20/286) de infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes, no qual 45% desse patógeno foram isolados de infecções pulmonares (JARA et al, 2020).

A *P. aeruginosa* está incluída na categoria “crítica” da lista prioritária de patógenos bacterianos da Organização Mundial da Saúde (OMS), para os quais a pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos são urgentemente necessários (WHO, 2017).

2.3. Classes de antimicrobianos comumente utilizados

2.3.1. Classe dos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos possuem em sua composição química um anel β -lactâmico e tem como mecanismo de ação a inibição do crescimento bacteriano ao interferir na reação de transpeptidação da síntese da parede celular bacteriana, ou seja, a parede celular bacteriana é formada por peptidoglicanos que são compostos por ligações cruzadas de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, no qual, existe um peptídeo de 5 aminoácidos ligado ao açúcar do ácido N-acetilmurâmico, chamado D-alanil-D-alanina. A proteína de ligação à penicilina (PBP), uma enzima, remove a alanina terminal no processo de formação de uma ligação cruzada com o peptídeo adjacente, os β -lactâmicos análogos do substrato D-Ala-D-Ala se ligam de forma covalente ao sítio ativo da PBP inibindo essa reação de

transpeptidação (OPAL; POP-VICAS, 2020). Os β -lactâmicos são divididos em várias subclasses, tais como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, que serão expostos adiante.

2.3.1.1. Penicilinas

As penicilinas foram descobertas por Alexander Fleming de um *Penicillium Notatum*, agora conhecido como *Penicillium chrysogenum*, em 1928. Florey Chain e colaboradores isolaram a penicilina, possibilitando a produção e a comercialização da penicilina G. Em meados da década de 1940, a penicilina G estava disponível para uso geral nos Estados Unidos, iniciando assim a era moderna dos antimicrobianos (CHAIN et al., 1940).

As penicilinas podem ser divididas em cinco classes com base na atividade antimicrobiana com considerável sobreposição entre as classes: (1) penicilinas naturais: penicilina G e penicilina V; (2) penicilinas resistentes à penicilinase: meticilina, nafcilina e isoxazolil; (3) aminopenicilinas: ampicilina e amoxicilina; (4) carboxipenicilinas: carbenicilina e ticarcilina; e (5) acil ureidopenicilinas: azlocilina, mezlocilina e piperacilina. As carboxipenicilinas e ureidopenicilinas também são referidas como penicilinas antipseudomonas. As diferenças dentro de uma classe são principalmente farmacológicas, embora um composto em uma classe possa ser mais ativo do que outro, a depender do microorganismo (DOI, 2020).

2.3.1.2. Cefalosporinas

Embora a descoberta da classe de cefalosporinas tenha sido relatada em 1945, levou quase duas décadas para que essa classe alcançasse utilidade clínica. O pesquisador italiano Giuseppe Brotzu isolou o fungo *Cephalosporin acremonium* (agora *Acremonium chrysogenum*) e demonstrou a atividade antimicrobiana de filtrados de cultura contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, no qual ele também demonstrou a atividade *in vivo* desses filtrados de cultura em modelos de infecção animal e em vários pacientes (BO, 2000).

As cefalosporinas assemelham-se as penicilinas, porém possuem um espectro de ação mais estável a muitas β -lactamases, exibindo uma atividade mais ampla. Entretanto, cepas bacterianas que expressam β -lactamases de espectro estendido conseguem hidrolisar a maioria das cefalosporinas, representando um problema clínico crescente (CASTANHEIRA; SIMNER; BRADFORD, 2021).

As cefalosporinas são classificadas em cinco gerações, dependendo principalmente do espectro de atividade antimicrobiana. As cefalosporinas de primeira

geração consistem na cefazolina, cefadroxila, cefalexina, cefalotina, cefapirina e cefradina. Esses fármacos são muito ativos contra cocos Gram-positivos, como pneumococos, estafilococos (não sendo ativos contra aquelas cepas resistentes a meticilina) e estreptococos. Esse grupo de fármacos possui pouca atividade contra cepas de *P. aeruginosa* (MANDELL; DOUGLAS; BENNETT'S, 9ª ed., 2020).

As cefalosporinas de segunda geração incluem o cefaclor, cefamandol, cefonicida, cefuroxima, cefprozila, loracarbef e ceforanida, bem como aquelas que possuem atividade contra anaeróbios tais como cefoxitina, cefmetazol e cefotetana. Trata-se de um grupo heterogêneo de fármacos com diferenças individuais, na atividade, farmacocinética e toxicidade. Em geral, as cefalosporinas de segunda geração mostram-se ativas contra microrganismos inibidos pelas de primeira geração, além disso, proporcionam uma cobertura ampliada contra microrganismos Gram-negativos. Entretanto esses fármacos não são ativos contra enterococos e *P. aeruginosa* (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 12ªed., 2014).

Os fármacos de terceira geração incluem a cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefixima, cefpodoxima proxetila, cefdinir, cefditoreno pivoxila, ceftibuteno e moxalactam. Esses antimicrobianos proporcionam uma cobertura mais ampliada em comparação com os agentes de segunda geração, contra microrganismos Gram-negativos, e alguns deles possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. A ceftazidima e a cefoperazona são os únicos fármacos de terceira geração com ação em *P. aeruginosa* (MANDELL; DOUGLAS; BENNETT'S, 9ª ed., 2020).

A ceftazidima é a cefalosporina de terceira geração usada para infecções graves nas quais a *P. aeruginosa* é identificada ou altamente provável. É um dos medicamentos recomendados, isoladamente ou em combinação com um aminoglicosídeo, para o manejo empírico inicial da neutropenia febril causada por este patógeno (FREIFELD et al., 2011). No entanto, β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e β -lactamases ampicilina C cromossômica (AmpC) reduziram a utilidade da ceftazidima para monoterapia e, portanto, a cefepima suplantou o seu uso para terapia empírica na febre neutropênica. A ceftazidima tem sido eficaz no tratamento de exacerbações agudas de infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística (BLUMER et al., 1985)

A cefepima e a cefpiroma são as cefalosporinas de quarta geração, sendo mais resistente a hidrólise por β -lactamases cromossômicas, entretanto é semelhante aos fármacos de terceira geração, pois são hidrolisados por β -lactamases de espectro ampliado. Estudo aponta que 75% a 80% de enterobactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração são

susceptíveis a cefepima, sendo o tratamento de escolha para infecções causadas por bactérias que produzem β -lactamases cromossômicas, aquelas AmpC positivas (SANDERS et al., 1996). A cefepima, única cefalosporina de quarta geração utilizada nos Estados Unidos, possui boa atividade contra enterobactérias, cepas de *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, possuindo a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (NEU et al., 1985).

Os fármacos da quinta geração são aqueles ativos contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). As cefalosporinas ativas para MRSA têm atividade única em comparação com outras cefalosporinas. Elas também exibem atividade potente contra pneumococos com múltiplas mutações nos genes que codificam as proteínas de ligação a penicilina: PBP1A, PBP2B e PBP2X. Por outro lado, a atividade dessas drogas contra bacilos Gram-negativos é semelhante à de muitas das cefalosporinas de terceira geração. O primeiro fármaco aprovado neste grupo (em alguns países, mas não nos Estados Unidos) foi o ceftobiprole medocaril, o pró-fármaco do ceftobiprole (MANDELL; DOUGLAS; BENNETT'S, 9ª ed., 2020). A cefalosporina ativa contra MRSA aprovada nos EUA é a ceftarolina fosamil, a pró-droga da ceftarolina. Ceftobiprole é mais resistente que ceftarolina à inativação pela β -lactamase AmpC e tem atividade contra cepas de *P. aeruginosa* semelhante à da ceftazidima (QUENNAN et al., 2007).

2.3.1.3. Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são derivados da tienamicina, um antibiótico produzido pelo microrganismo encontrado no solo *Streptomyces cattleya*. Eles diferem das penicilinas por um átomo de carbono substituindo o enxofre na posição 1 e uma ligação dupla entre C2 e C3 no anel tiazolidínico de cinco membros (NÚÑEZ et al., 2003). Quatro carbapenêmicos, imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem são aprovados para uso clínico nos Estados Unidos. Além disso, o panipenem está disponível no Japão e na China, o tebipenem no Japão e o biapenem no Japão, na China e na Tailândia. Os carbapenêmicos são ativos contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias e anaeróbias devido à sua eficiente penetração através da membrana externa bacteriana, sua alta afinidade por múltiplas PBPs e sua estabilidade contra a maioria das β -lactamases, incluindo β -lactamases ESBLs de classe A e AmpCs (MANDELL; DOUGLAS; BENNETT'S, 9ª ed., 2020).

O imipenem foi o primeiro fármaco desta classe, exibe amplo espectro, com boa atividade contra bacilos Gram-negativos, inclusive *P. aeruginosa*, microrganismos Gram-positivos e anaeróbios. O meropenem e doripenem assemelham-se ao imipenem, porém

exibem uma atividade maior contra aeróbios Gram-negativos e um pouco menor contra microrganismos Gram-positivos. O ertapenem é menos ativo do que os outros carbapenêmicos contra *P. aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter* (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 12^aed., 2014; ZHANEL et al., 2007).

2.3.1.4. Monobactâmicos

O aztreonam é o único monobactâmico disponível e aprovado pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), sendo um fármaco que possui um anel β -lactâmico monocíclico. O seu espectro de atividade limita-se a bacilos Gram-negativos aeróbios, inclusive a *P. aeruginosa*. Diferente de outros β -lactâmicos não apresenta nenhuma atividade contra microrganismos Gram-positivos ou contra anaeróbios. Esse antimicrobiano é susceptível a hidrólise por β -lactamases AmpC e as ESBLs (BUSH; BRADFORD, 2016), possuindo ação contra microrganismos positivos para metalo- β -lactamases (MBLs), no entanto, a maioria das MBLs reside em cassetes de genes móveis inseridos em integrons que abrigam genes adicionais de resistência a antimicrobianos para outras classes, limitando severamente as opções terapêuticas em infecções graves (MANDELL; DOUGLAS; BENNETT'S, 9^a ed., 2020).

2.3.1.5. β -lactâmicos combinados com inibidores de β -lactamases

Os inibidores de β -lactamases são agrupados em compostos β -lactâmicos (tais como, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) e compostos não β -lactâmicos (tais como, avibactam e vaborbactam). Cinco inibidores de β -lactamase estão atualmente em uso clínico: ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam e avibactam e vaborbactam (BUSH; BRADFORD, 2016).

Os inibidores ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam são potentes inibidores de β -lactamases de classe A, com uma notável exceção da KPC. O avibactam e vaborbactam são inibidores de β -lactamases de classe A, incluindo KPC e também inibem AmpC. Quando combinados com antibióticos β -lactâmicos que são substratos para essas β -lactamases e, portanto, inativos contra as bactérias que as produzem, os inibidores impedem a hidrólise do antimicrobiano, restaurando assim sua atividade (MANDELL; DOUGLAS; BENNETT'S, 9^a ed., 2020).

Ceftolozane é uma cefalosporina de terceira geração antipseudomonal com estabilidade melhorada contra AmpC em comparação com a ceftazidima. Ceftolozane em combinação com o inibidor de β -lactamase tazobactam é ativo contra a maioria das cepas de

P. aeruginosa, incluindo as multirresistentes. É ativo contra aproximadamente 60% das cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos quando usado o ponto de corte de suscetibilidade aprovado pelo FDA dos EUA de 4 µg/mL para esta espécie (SADER; FARRELL; CASTANHEIRA, 2014). A experiência clínica pós-comercialização deste antimicrobiano sugere que o ceftolozane associado ao tazobactam pode ser uma opção razoável para infecções graves, como pneumonia, devido a *P. aeruginosa* multirresistente (HAIDAR, et al., 2017; MUNITA, et al., 2017).

Avibactam que é utilizado na clínica em associação com o β-lactâmico ceftazidima, é um inibidor não-β-lactâmico de diazabiciclo[3.2.1]octanona em ponte com uma estrutura distinta dos inibidores convencionais de β-lactamases. Seu espectro de inibição de β-lactamase inclui β-lactamases classe A, incluindo ESBLs e KPCs, β-lactamases classe C e algumas β-lactamases classe D, notadamente a carbapenemase OXA-48, no qual esse inibidor possui a capacidade de inativar as β-lactamases por meio de reação de acilação covalente com o resíduo de serina do sítio dessas enzimas, não possui a capacidade de inibição de MBLs, pois o sítio ativo dessas enzimas é o Zn²⁺ (DRAWZ, et al., 2014).

2.3.2. Classe dos aminoglicosídeos

Os antibióticos aminoglicosídeos são usados desde a década de 1940, quando a triagem sistemática de actinomicetos do solo foi utilizada para a elaboração de substâncias antimicrobianas produziu assim a estreptomicina (WRIGHT et al., 1998). Produzido por uma espécie de *Streptomyces*, a estreptomicina foi o primeiro antibiótico da família dos aminoglicosídeos. Neomicina, canamicina e gentamicina são produtos de fermentação com dois ou três constituintes químicos. Amicacina, netilmicina e outros são derivados semissintéticos do produto natural, no qual todos os aminoglicosídeos compartilham propriedades físicas, químicas e farmacológicas semelhantes (BECKER; COOPER, 2013).

Os aminoglicosídeos são inibidores irreversíveis da síntese protéica, dentro da célula, os aminoglicosídeos se ligam a proteínas ribossomais específicas da subunidade 30S (12S no caso da estreptomicina). A síntese protéica é inibida pelo menos por três maneiras: I- interferência com o complexo de iniciação de formação do peptídeo; II- leitura errônea do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), o que provoca a incorporação de aminoácidos incorretos no peptídeo e resulta em uma proteína afuncional ou tóxica e III- clivagem dos polissomas em monossomas não funcionais (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 12^aed., 2014).

Os aminoglicosídeos são empregados amplamente em combinação com um antimicrobiano β -lactâmico para infecções graves envolvendo bactérias Gram-negativas, em combinação com a vancomicina ou um β -lactâmico para endocardite causada por Gram-positivo e para o tratamento da tuberculose (CRAIG, 2011).

2.3.3. Classe das quinolonas

O primeiro membro da classe das quinolonas foi o ácido nalidíxico, identificada por Leshner e associados em 1962 como um subproduto da síntese da cloroquina (LESHER et al., 1962). O ácido oxolínico e a cinoxacina também foram desenvolvidos na década de 1970, mas foi a identificação na década de 1980 dos derivados substituídos por flúor e piperazinil com maior potência e espectro expandido que permitiu a expansão dessa classe de compostos. Um amplo espectro de atividade, boa absorção oral e geralmente uma boa tolerabilidade resultaram no uso clínico extensivo das fluoroquinolonas mais recentes. Várias quinolonas, no entanto, incluindo temafloxacina, esparfloxacina, grepafloxacina, trovafloxacina e gatifloxacina, foram retiradas do uso clínico após a aprovação devido a sua toxicidade, que eram incomuns, mas graves em alguns casos (HOOPER; STRAHILEVITZ, 2020; MCCHESENEY et al., 1964).

As quinolonas bloqueiam a síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) bacteriano, ao inibir a topoisomerase II (DNA-girase) e a topoisomerase IV bacteriana, interferindo assim na atividade enzimática. A inibição da DNA-girase impede o relaxamento do DNA superespiralado, o que é necessário para a replicação e transcrição do DNA. A topoisomerase IV funciona para resolver (decatenar) moléculas de DNA filhas interligadas (catenadas) que resultam da replicação do DNA circular, sendo assim, a inibição da topoisomerase IV impede a separação do DNA cromossomal replicado, ocasionando assim, o efeito bactericida do antimicrobiano. Assim, a DNA girase e a topoisomerase IV têm papéis essenciais distintos na replicação do DNA bacteriano (DRLICA, ZHAO, 1997; WENTZELL; MAXWELL, 2000).

As quinolonas atuais são mais ativas contra bacilos Gram-negativos aeróbicos, principalmente contra membros da família *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus* spp., e também contra cocos Gram-negativos, como *Neisseria* spp. e *Moraxella catarrhalis* (ELIOPOULOS; ELIOPOULOS, 2003). As fluoroquinolonas também apresentam atividade adicional contra bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *P. aeruginosa* e contra estafilococos. A ciprofloxacina continua sendo a fluoroquinolona comercializada mais potente contra bactérias

Gram-negativas, e ela e a levofloxacina nos Estados Unidos e a sitafloxacina no Japão são as únicas quinolonas disponíveis com potência suficiente para uso contra cepas suscetíveis de *P. aeruginosa* (JONES; FRITSCHER; SADER, 2008).

2.3.4. Classe das glicilciclinas

As glicilciclinas são uma nova classe de drogas antibacterianas que foram desenvolvidas para combater o surgimento de organismos resistentes. A tigeciclina é um derivado semisintético da minociclina sendo o primeiro membro da classe a ser aprovado pelo FDA, em junho de 2005 (ELLIS-GROSSE et al., 2005). Foi originalmente aprovado para o tratamento de infecções complicadas de pele e estruturas cutâneas e infecções intra-abdominais complicadas, no entanto, em março de 2009, a tigeciclina foi aprovada para o tratamento de pneumonia bacteriana adquirida na comunidade com base em taxas de cura comparáveis em pacientes tratados com levofloxacina (BABINCHAK et al., 2005; DARTOIS et al., 2008; TANASEANU et al., 2008).

O mecanismo de ação antibacteriano desse antimicrobiano é semelhante ao das tetraciclinas mais antigas. Ele funciona inibindo a síntese de proteínas bacterianas pela ligação às subunidades ribossômicas bacterianas 30S, bloqueando a entrada de moléculas de ácido ribonucleico (RNA) de transferência no sítio A do ribossomo, evitando que os aminoácidos se incorporem em cadeias peptídicas alongadas, inibindo assim a síntese das proteínas (PANKEY, 2005; BAUER et al., 2004). Como outras tetraciclinas, a tigeciclina é considerada bacteriostática porque sua interação com o ribossomo é reversível (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Como as glicilciclinas se ligam cinco vezes mais fortemente ao ribossomo do que as tetraciclinas, elas são capazes de superar o mecanismo de proteção ribossômica do resistoma da tetraciclina (BAUER et al., 2004).

A tigeciclina tem atividade antibacteriana contra uma ampla variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias, possuindo atividade contra espécies de *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, incluindo microrganismos resistentes a outras classes de antimicrobianos, mostrando atividade contra cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (GALES; SADER; FRITSCHER, 2008).

Esse antimicrobiano possui uma boa atividade contra a maioria das enterobactérias, com exceção da maioria das cepas de *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp. Apesar de possuir uma boa atividade antimicrobiana contra bacilos não

fermentadores, a tigeiclina não possui atividade contra cepas de *P. aeruginosa* (DOWZICKY; PARK, 2008; KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020).

2.4. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Muitos dos genes que conferem resistência aos antimicrobianos já existiam bem antes da introdução destes no tratamento dos processos infecciosos. Alguns desses genes tendo sido encontrados em bactérias conservadas intocadas por mais de 30.000 anos no *permafrost* da região do Ártico (D’COSTA et al., 2011).

Muitos compostos com ação antimicrobiana são frequentemente sintetizados por bactérias quando estão entrando na fase tardia de crescimento estático e estão prestes a tornarem-se dormentes ou esporulares. Portanto, os compostos antibióticos deixados no microambiente por bactérias dormentes são potencialmente tóxicos para os competidores, e também servem como uma fonte de carbono para a próxima geração da cepa bacteriana produtora daquele antibiótico, uma vez que a fase de crescimento recomeça. Desta forma, essas cepas bacterianas ambientais fornecem a potenciais patógenos humanos uma fonte de novos genes de resistência a antimicrobianos (DANTAS et al., 2008).

Apos a introdução dos fármacos antimicrobianos, foi possível verificar que estes exercem uma forte pressão seletiva sobre as populações bacterianas, favorecendo e selecionando organismos capazes de se adaptar a esse estresse ambiental. Este processo, portanto da uma vantagem seletiva aos microrganismos portadores de genes que estão relacionados a mecanismos de escape da ação dessas drogas, e elimina aqueles microrganismos susceptíveis a ação dos antimicrobianos, reduzindo a concorrência por espaço e nutrientes no meio, gerando um ambiente propício para a multiplicação dessas linhagens resistentes (RICE; CHIPPINDALE, 2001).

As bactérias podem adquirir DNA exógeno contendo genes relacionados à resistência de outras bactérias por meio de sequências transportadas através de plasmídeos, bacteriófagos ou elementos genéticos transponíveis especializados conhecidos como elementos integrativos e conjugativos (ICE) (RICE; CHIPPINDALE, 2001; TOLEMAN; WALSH, 2011). Esses eventos são chamados de transferência genética horizontal e são bastante frequentes entre bactérias naturalmente competentes para adsorver DNA exógeno de um ambiente, isso contribui para a sua capacidade de responder às pressões de seleção impostas por agentes antimicrobianos (OPAL; POP-VICAS, 2020).

Pelo menos oito mecanismos de resistência a antimicrobianos distintos foram descritos em bactérias: I- inibição enzimática; II- ativação das bombas de efluxo; III- diminuição da permeabilidade da membrana bacteriana; IV- alteração do receptor alvo; V- alteração de enzimas alvo; VI- proteção do local alvo; VII- superprodução de alvos; VIII- desvio da inibição enzimática (HOEK et al., 2011). Os mecanismos de inibição enzimática e bombas de efluxo que foram estudados neste trabalho serão descritos nos parágrafos seguintes.

2.4.1. Inibição enzimática por β -lactamases

A resistência aos β -lactâmicos ocorre principalmente através da produção de β -lactamases, que são enzimas capazes de inativar esse antimicrobiano através da hidrólise da ligação amida do anel β -lactâmico (AMBLER, 1980). As β -lactamases são codificadas por genes cromossômicos ou por genes transferíveis localizados em plasmídeos e transposons. Além disso, os genes de β -lactamases (*bla*) frequentemente residem em integrons, que muitas vezes carregam múltiplos fatores relacionados à resistência (WELDHAGEN, 2004).

As β -lactamases podem ser classificadas de acordo com sua estrutura de aminoácidos em quatro classes moleculares, classe A a classe D, conforme sugerido pela primeira vez por Ambler, e, de acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, estas classes ainda podem ser classificadas dentro de dois grupos: as serina- β -lactamases (classes A, C e D) que hidrolisam o anel β -lactâmico através de um resíduo de serina em seu sítio ativo, enquanto as enzimas da classe B são as metalo- β -lactamases (MBLs) que usam o zinco (Zn^{2+}) para quebrar a ligação amida (AMBLER, 1980).

Posteriormente, Bush, Jacoby e Medeiros criaram um novo sistema baseado na classificação funcional da enzima β -lactamase, no qual essa classificação incluiu três grupos principais, definidos com base em seus perfis de substrato e inibidor, massa molecular e pontos isoelétricos. Este esquema de classificação foi atualizado em 2010, com a adição de sequências peptídicas que descrevem novas β -lactamases (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH; JACOBY, 2010).

A primeira β -lactamase foi descrita em 1940, por Abraham e Chain, como uma penicilinase capaz de hidrolizar a penicilina em *Escherichia coli*, na mesma época em que o primeiro uso clínico de penicilina foi relatado na literatura (ABRAHAM, CHAIN, 1940). Entre os organismos Gram-negativos, o aumento da resistência à ampicilina na década de 1960 foi atribuído ao surgimento de TEM-1, uma β -lactamase codificada por plasmídeo que

leva o nome de um paciente grego, Temoniera, em quem foi recuperado o primeiro isolado (BRADFORD, 2001). A família das β -lactamases do tipo TEM foi disseminada mundialmente através de várias enterobactérias, além de *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *N. gonorrhoeae* (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006).

Com o passar do tempo e o advento de novos antimicrobianos, houve o surgimento de novas β -lactamases, entre as mais de 890 β -lactamases que foram caracterizadas atualmente (MOSQUITO et al., 2011). Após o desenvolvimento de cefalosporinas de terceira geração, que antes eram estáveis à ação das β -lactamases do tipo TEM e SHV, houve o surgimento e a disseminação global de enzimas ESBLs, capaz de hidrolizar monobactâmicos e cefalosporinas de amplo espectro (BAJAJ, SINGH, VIRDI, 2016).

TEM-1 é a β -lactamase mais comum em bactérias Gram-negativas e pode hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito em enterobactérias, *N. gonorrhoeae* e *H. influenzae* (MEDEIROS, 1997). O espectro estendido de atividade das ESBLs derivadas de TEM ocorre por meio de alterações em um ou poucos aminoácidos que alteram a configuração da enzima em seu sítio ativo, tornando-a mais resistentes a ação das cefalosporinas de terceira geração (GUPTA et al. 2011; KNOTHE, et al., 1983; MEDEIROS, 1997). A primeira ESBL derivada de TEM, a TEM-3, foi relatada em 1988 (SOUGAKOFF; GOUSSARD; COURVALIN 1988). A maioria das ESBLs derivadas de TEM permanece susceptível à inibição pelo ácido clavulânico, embora também tenham sido descritas variantes de TEM resistentes a inibidores (LEFON-GUIBOUT et al., 2000).

A β -lactamase do tipo SHV-1 (sulfidрила variável) tem uma estrutura bioquímica semelhante à do TEM-1 (68% dos aminoácidos são compartilhados), e suas variantes ESBL também são produzidas por mutações pontuais (uma ou mais substituições de aminoácidos) em seu sítio ativo (LEFON-GUIBOUT et al., 2000; JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005). O primeiro gene *blaSHV-1* foi identificado na década de 1970 em *E. coli* (PITTON, 1972), entretanto, as β -lactamases SHV são encontradas em diversas espécies de bactérias Gram-negativas, principalmente em cepas de *K. pneumoniae*. (LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016).

As β -lactamases Cefotaxima-M (CTX-M) não estão evolutivamente relacionadas às famílias TEM e SHV, pois se acredita que tenham sido adquiridas através de plasmídeos das enzimas AmpC cromossômicas de *Kluyvera* spp., bacilos Gram-negativos ambientais de baixo potencial patogênico (HUMENIUK et al., 2002).

Em geral, a família CTX-M hidrolisa melhor a cefotaxima e a ceftriaxona do que a ceftazidima, e são mais inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico, embora possam ocorrer mutações pontuais que levam ao aumento da atividade contra a ceftazidima (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005). As enzimas CTX-M se disseminaram rapidamente e agora estão entre as ESBLs mais prevalentes em todo o mundo. Relatos recentes de infecções da corrente sanguínea adquiridas na comunidade com isolados de *E. coli* multirresistentes contendo CTX-M na Espanha e Israel levantaram preocupações significativas de saúde pública (BEN-AMI et al., 2006; PITOUT; LAUPLAND, 2008). O clone ST131 (O25:H4) associado às enzimas CTX-M-15 surgiu como um importante patógeno multirresistente e pode ter sido responsável pela maioria das infecções por *E. coli* multirresistente na Europa e nos Estados Unidos desde 2007 (JOHNSON, et al., 2010).

Além disso, existem as β -lactamases do tipo OXA que também são derivadas de plasmídeos e são capazes de hidrolisar a oxacilina e seus derivados de forma muito eficaz, esse tipo de enzima são pouco inibidos pelo ácido clavulânico (CASTANHEIRA; SIMNER; BRADFORD, 2021). ESBLs derivadas de OXA, principalmente as do tipo OXA-1 e OXA-10, foram descritas principalmente em *P. aeruginosa*, na qual conferem alto nível de resistência a cefalosporinas de terceira geração (YOON; JEONG, 2020). As carbapenemases de classe D foram descritas entre 12 subfamílias de β -lactamases do tipo OXA, sendo as principais: OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-58 e OXA-146, especialmente em cepas de *A. baumannii* (EVANS; AMYES, 2014).

A família GES (do inglês, *Guiana Extended Spectrum β -lactamase*) é o grupo mais prevalente das ESBLs que são menos comuns. O gene que codifica GES-1 não está relacionado com qualquer outra β -lactamase mediada por plasmídeo, mas apresenta 36% de homologia com uma enzima hidrolisadora de carbenicilina de *Proteus mirabilis* (BRADFORD, 2001). Apesar de ter sido inicialmente relatado entre as espécies de enterobactérias, as enzimas GES são mais comum entre isolados de *P. aeruginosa* e isolados de *A. baumannii* (ZEKA, et al. 2014). As enzimas GES são notáveis por sua capacidade de adquirir substituições de aminoácidos simples ou duplas e expandir seu espectro para carbapenêmicos (CASTANHEIRA, et al., 2014).

Por fim, as carbapenemases conferem o maior espectro de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos, pois podem hidrolisar não apenas carbapenêmicos, mas também penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de terceira geração e cefamicinas (BASSETTI, 2020; BONONO et al., 2018). A enzima KPC é atualmente a serina

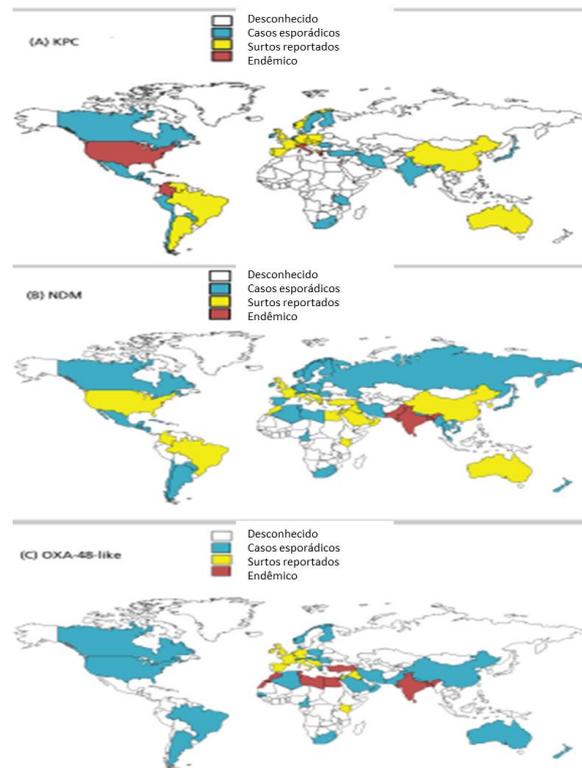
carbapenemase de classe A mais importante, no qual foram inicialmente relatados a partir de isolados de *K. pneumoniae* em vários surtos no nordeste dos EUA (BRATU, et al., 2005).

Desde então, KPCs foram encontradas em todo o mundo, em várias outras espécies Gram-negativas, tais como *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia* e *P. aeruginosa* (HAN et al., 2020; TENOVER; NICOLAU; GILL, 2022). No Brasil, o primeiro caso de um isolado de *P. aeruginosa* KPC positivo foi em fevereiro de 2010, no qual duas cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos foram isoladas em duas semanas consecutivas de secreções traqueais de dois pacientes distintos em uma unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital terciário localizado em Recife, Pernambuco, Brasil (JÁCOME, et al., 2012).

As β -lactamases de classe B ou MBLs são comumente identificadas em enterobactérias e *P. aeruginosa* (EDELSTEIN et al., 2013; TENOVER; NICOLAU; GILL, 2022). As MBLs usam um cátion Zn^{2+} para hidrólise do anel β -lactâmico, entretanto, são susceptíveis a quelantes de íons, como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), mas são resistentes ao ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Conferem resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos (OPAL; POP-VICAS, 2020).

Entre as MBLs, a enzima Nova Delhi metalo- β -lactamase (NDM), Metalo- β -lactamase codificada por integron de Verona (VIM) e imipenemase metalo- β -lactamase (IMP) são as enzimas mais frequentemente identificadas (BONONO et al., 2018). Bactérias Gram-negativas produtoras de IMP são detectadas principalmente na China, Japão e Austrália, principalmente em *A. baumannii*. Os produtores de VIM são encontrados com mais frequência na Itália e na Grécia (*Enterobacteriaceae*) e na Rússia (*P. aeruginosa*) (EDELSTEIN et al., 2013; WALSH; TOLEMAN; POIREL, 2005) (**Figura 2**).

Figura 2. Distribuição dos genes produtores de carbapenemases em todo o mundo.



Legenda: Distribuição de carbapenemases de classe A (KPC), de classe B (NDM) e de classe D (OXA-48-like).

Fonte: Adaptado de BONONO et al., 2018.

2.4.2. Bombas de efluxo bacteriano

Os mecanismos de bomba de efluxo de antimicrobianos que são codificados por cromossomos ou adquiridos por plasmídeos, presentes em bactérias Gram-negativas, contribuem para a resistência a antimicrobianos e apresentam um grande desafio para o desenvolvimento de antimicrobianos (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

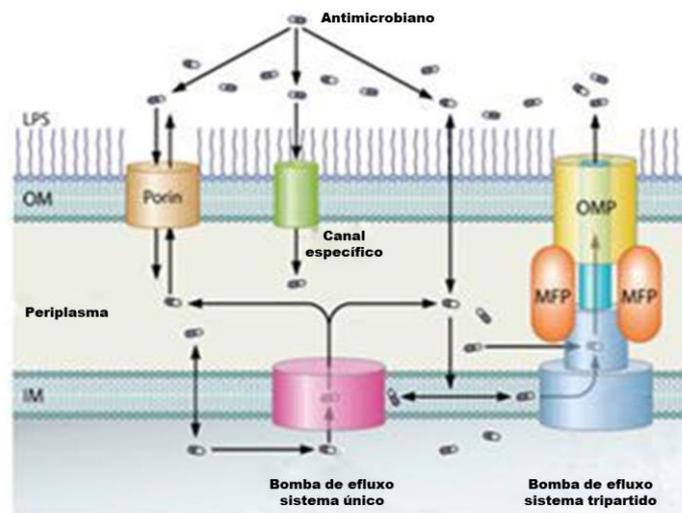
Além disso, as bombas de efluxo interagem sinergicamente com outros mecanismos de resistência (por exemplos, com a barreira de permeabilidade da membrana externa e β -lactamases) para aumentar os níveis de resistência. Desde a descoberta das bombas RND no início da década de 1990, em cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*, notáveis avanços científicos e tecnológicos permitiram uma melhor compreensão da base estrutural e bioquímica, perfis de substrato, regulação molecular e inibição dessas bombas de efluxo (MA et al., 1993; POOLE et al., 1993; LI; LIVERMORE; NIKAIDO, 1994).

Com frequência, um único organismo pode possuir várias bombas de efluxo de sistemas diferentes (por exemplo, os sistemas Mex de *P. aeruginosa* juntamente com os

sistemas Acr de *Enterobacteriaceae*). Até o momento, existem quatro famílias diferentes de proteínas de bomba de efluxo MDR, são elas: a família RND, a superfamília facilitadora principal (MFS, do inglês, *major facilitator superfamily*), a família multirresistência estafilocócica (SMR, do inglês, *staphylococcal multiresistance*) e a família extrusão de compostos tóxicos e multidrogas (MATE, do inglês, *multidrug and toxic compound extrusion*) (PIDDOCK, 2006).

As bombas RND, que são todas exportadoras de antimicrobianos e cátions tóxicos, estão localizadas na membrana interna (MI) (membrana citoplasmática), mas devem interagir com a proteína adaptadora periplasmática (também chamada de proteína de fusão da membrana) e o canal da membrana externa (ME), produzindo assim um complexo tripartido abrangendo o MI, o periplasma e o ME. Os transportadores tripartidos excretam antimicrobianos diretamente no meio de modo que a reentrada destes requer uma travessia lenta na ME, uma barreira de permeabilidade bastante eficaz (NIKAIDO, 1989; 1996) (**Figura 3**). Contudo, a eficácia das bombas RND está intimamente ligada à resistência da barreira da ME, no qual permeabilizando a ME destrói o efeito do efluxo mediado pela bomba RND quase tão efetivo quanto à inativação da própria bomba (NIKAIDO, 2001; NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009).

Figura 3. Localização da bomba de efluxo na membrana bacteriana e suas vias de influxo e efluxo em bactérias Gram-negativas.



Legenda: Localização das bombas de efluxo e vias de influxo e efluxo de antimicrobianos através da ME e MI em bactérias Gram-negativas. O influxo dos antimicrobianos através da ME ocorre em uma ou mais das três vias a seguir: canais de porina, canais de proteínas específicas e pelo LPS contendo região de bicamada lipídica assimétrica. Após sua entrada no espaço periplasmático, as moléculas do fármaco podem penetrar ainda mais na MI por difusão. No entanto, esses antimicrobianos podem ser expelidos para fora da célula por transportadores de efluxo, que existem como bombas de componente único ou bombas com sistemas de efluxo tripartido. Enquanto as bombas de sistema único podem captar o fármaco do citosol e do periplasma e funcionar como porinas ou outros tipos de canais de proteínas para tornar o processo de

efluxo eficaz, as bombas com sistema tripartido capturam os fármacos do periplasma e da MI e os bombeiam diretamente para o meio extracelular (Fonte: Adaptado de LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

O patógeno *P. aeruginosa* desenvolveu uma forte e seletiva barreira de permeabilidade na ME cuja eficácia é reforçada por exportadores de amplo espectro. Nada menos que 12 diferentes sistemas de bombas de efluxo do tipo RND foram reconhecidos e caracterizados na cepa padrão de *P. aeruginosa* PAO1(LI, POOLE, NIKAIDO, 2003; LI; NIKAIDO, 2009). *P. aeruginosa* é caracterizada por sua permeabilidade de ME muito baixa devido à presença da porina lenta OprF em vez das clássicas porinas triméricas OmpF/OmpC (SUGAWARA et al., 2006). Entretanto, esse patógeno possui canais específicos, como OprB, específico para captação de glicose, e OprD, específico para difusão de aminoácidos básicos e peptídeos (NIKAIIDO, 2003). O canal OprD é o canal primário para a entrada de carbapenêmicos através da ME, e a expressão reduzida ou perda de OprD tem sido frequentemente observada em isolados clínicos resistentes a carbapenêmicos (FOURNIER et al., 2013).

Expressa constitutivamente, a bomba MexAB-OprM foi o primeiro sistema RND caracterizado em *P. aeruginosa* (POOLE et al., 1993). A bomba MexAB-OprM exibe uma especificidade de substrato incrivelmente ampla que abrange antimicrobianos estruturalmente muito diferentes, por exemplo, β -lactâmicos (incluindo inibidores de β -lactamase e certos carbapenêmicos, exceto imipenem), aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, tigeciclina, macrólidos, anfenicóis, novobiocina, sulfonamidas, trimetoprim, cerulenina e tiolactomicina (DEAN et al., 2003; DUPONT et al., 2005; MASUDA; OHYA, 1992; NAKAE; SAITO; NAKAJIMA, 2000; ZHANG; LI; POOLE, 2001).

Estudos mostram que a superexpressão da bomba MexAB-OprM pode potencializar outros mecanismos de resistência e, assim, aumentar a dificuldade na busca de um tratamento eficaz contra *P. aeruginosa*. No entanto, interações entre a bomba de efluxo e β -lactamases resultam principalmente em cooperação em vez de efeitos sinérgicos nos níveis de resistência aos antimicrobianos (CAVALLO et al., 2007; MOYA et al., 2012; NAKAE et al., 1999; RIERA et al., 2011; TAFTI et al., 2020).

As proteínas MexXY, codificadas por um locus de dois genes, *mexX* e *mexY*, no qual essas proteínas precisam interagir com um componente de ME para formar uma bomba tripartida funcional (Mine et al., 1999). Apesar do fato de MexXY ter a capacidade de acomodar vários canais na ME (por exemplo, OpmB) para exportar ativamente substratos, estudos mostram que o canal OprM configura ser o principal na maioria das cepas (Mine et al., 1999; MURATA; GOTOH; NISHINO, 2002). Estudos mostram que as proteínas MexXY

cooperam com os canais OprM e OprA, pois cada uma pode compensar a supressão geneticamente modificada da outra. Já o sistema MexXY-OprM/OprA é capaz de transportar aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, tigeciclina e cefalosporinas (cefepima e ceftobiprole) (BAUM et al. 2009; WESTBROCK-WADMAN et al. 1999).

Diante do exposto e considerando a complexidade e a gravidade das infecções de *P. aeruginosa* resistentes a antimicrobianos, torna-se fundamental a importância do estudo de tais quadros infecciosos. Portanto, diagnosticar isolados de *P. aeruginosa* em pacientes internados em leitos de UTI, assim como identificar os fenótipos de resistência, bem como os mecanismos genéticos pelos quais eles se tornam resistentes é uma emergência pública, tendo em vista a dificuldade de tratamento pela ineficácia das opções terapêuticas atuais, o elevado impacto financeiro que eles representam no orçamento dos serviços de saúde e os altos índices de morbidade e mortalidade associados aos mesmos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar os principais fenótipos e genótipos relacionados à resistência antimicrobiana em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital universitário de Fortaleza, Ceará, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência da *P. aeruginosa* dentre os microrganismos Gram negativos isolados na unidade de terapia intensiva (UTI), Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil;
- Avaliar os padrões fenóticos de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, polimixinas e glicilciclinas em cepas de *P. aeruginosa* isoladas na unidade de terapia intensiva (UTI), Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil;
- Identificar as cepas MDR, XDR e resistentes a carbapenêmicos baseando-se nos padrões fenotípicos de resistência aos antimicrobianos avaliados nas cepas de *P. aeruginosa* isoladas na unidade de terapia intensiva (UTI), Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil;
- Desenvolver ensaios de diagnóstico molecular utilizando qPCR, identificando genes que codificam as bombas de efluxo e as β -lactamases em cepas de *P. aeruginosa* isoladas na unidade de terapia intensiva (UTI), Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil;
- Determinar os genes relacionados à resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em cepas de *P. aeruginosa* isoladas na unidade de terapia intensiva (UTI), Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil;
- Associar os padrões fenotípicos de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos aos genes de resistência detectados em cepas de *P. aeruginosa* isoladas na unidade de terapia intensiva (UTI), Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil;

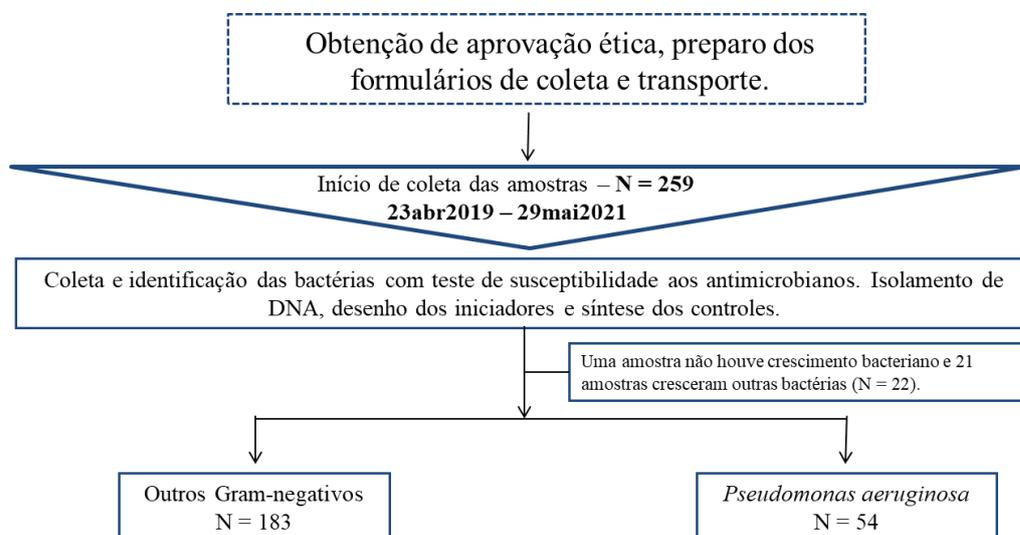
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e identificação dos isolados bacterianos

Para o seguinte estudo foram coletadas 259 cepas de bactérias Gram negativas (BGNs), no qual não houve crescimento de uma cepa, restando à identificação de 258 Gram-negativos resistentes a um ou mais grupos dos antimicrobianos β -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, polimixinas e gliciliclinas de pacientes internados na UTI clínica do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em Fortaleza-CE, no período de 23 de abril de 2019 a 29 de maio de 2021 (**Figura 4**) que apresentaram quadro infeccioso envolvendo diferentes sítios anatômicos e cujo agente etiológico envolvido foi identificado por meio de técnicas de microbiologia clássica. Foram incluídos isolados bacterianos provenientes de:

- 1) infecções de corrente sanguínea e outros sítios de infecção considerados nobres, como líquidos cefalorraquidiano (LCR), pleural, peritoneal, pericárdio, sinovial, entre outros;
- 2) infecções do trato urinário;
- 3) cultura de secreções, como lavado bronco-alveolar, aspirado traqueal, escarro, fragmentos de pele, órgãos e ossos, drenagens e abscessos, ferida cirúrgica e outros sítios anatômicos que apresentaram indícios de infecção quando avaliados pelo clínico;
- 4) culturas de *swab* retal para vigilância, sem infecção aparente.

Figura 4 Fluxograma de execução do Estudo.



As amostras de hemocultura e outros líquidos nobres foram inoculadas em frascos específicos e incubadas no equipamento BacT/Alert® 3D (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), um sistema de detecção microbiana automatizado. Os outros materiais biológicos foram semeados em meios de cultura específicos através de técnica de semeadura qualitativa ou quantitativa, a fim de se obter colônias isoladas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas.

Os isolados bacterianos foram identificados e testados, no laboratório de microbiologia do HUWC quanto à sua susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método automatizado VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações inibitórias mínimas foram interpretadas de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020) e com o comitê brasileiro em testes de susceptibilidade antimicrobiana (BRCAST 2020; 2021). Para o controle de qualidade dos testes de sensibilidade foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC). Estas amostras foram disponibilizadas para o estudo por meio de aprovação do comitê de ética (nº 3.276.113) (**Anexo A**).

4.2. Seleção das cepas analisadas

Um total de 258 isolados foram identificados, dentre os quais foram encontradas 54 cepas de *P. aeruginosa* sobre as demais espécies. Empregaram-se nesse estudo isolados de *P. aeruginosa* resistentes a um ou mais grupos dos antimicrobianos β -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, polimixinas e/ou glicilciclinas para investigação do perfil genético de resistência das mesmas. Foi utilizado a definição de MDR para os isolados que apresentaram resistência a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos e os isolados XDR foram aqueles que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano de todas as classes, podendo excluir no máximo duas classes.

4.3. Extração do DNA bacteriano

Os isolados mantidos em caldo de tripticase de soja foram incubados *overnight* em estufa bacteriológica a 37°C , a 200 rpm, passado o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante despejado, o precipitado foi utilizado para extração do DNA bacteriano. Para a extração do material genético bacteriano,

foi empregado o kit de extração e purificação Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Em capela de fluxo laminar, foi realizada a ressuspensão do isolado com 600µl do tampão de lise nucleica fornecido no kit, logo após, a suspensão foi aquecida a 80°C por 5 minutos em aquecedor automático e programada até diminuir a uma temperatura de 25°C. Chegando a temperatura foi adicionado 3µl de RNase e inverteu-se os tubos de 3 a 5 vezes. Os tubos foram novamente aquecidos a 60°C por 60 minutos em aquecedor automático, passado o tempo foi adicionado 200 µl da solução de precipitação de proteína e agitados por 40 segundos.

Os tubos foram incubados em gelo por 5 minutos e logo após foram centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 5 minutos. Após a centrifugação, foi transferido o sobrenadante para um tubo contendo 600 µl de isopropanol, em seguida os tubos foram invertidos gentilmente até a visualização da névoa de DNA. Essa suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante foi gentilmente despejado. Posteriormente, foram adicionados 600 µl de etanol 70% e o tubo foi invertido algumas vezes para lavar o precipitado. Novamente os tubos contendo o precipitado foram centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 5 minutos, passado o tempo o sobrenadante foi gentilmente despejado e os tubos ficaram abertos por 15 minutos em temperatura ambiente para a completa secagem do mesmo.

Em seguida, foram adicionados 200 µl de solução de reidratação de DNA e os tubos foram aquecidos a 65°C sob agitação de 400 rpm em aquecedor automático por 60 minutos. Após o aquecimento os tubos foram agitados vigorosamente até a completa homogeneização do precipitado.

Após a extração, todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria com a utilização do NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), diluídas a uma concentração de 50 ng/µL em água miliQ e conservadas em freezer - 80°C até sua utilização nos experimentos.

4.4. Desenho dos iniciadores utilizados no estudo

Para uma maior cobertura do perfil genético de resistência aos β-lactâmicos em Gram negativos foram incluídas para o desenho dos iniciadores todas as sequências disponíveis na plataforma *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) para cada um dos genes alvo. Para o desenho dos iniciadores foram reunidas todas as sequências disponíveis das variantes de cada gene de β-lactamases incluído no estudo, o alinhamento das sequências foi realizado com o uso do *software* Clustal Omega, e os alinhamentos analisados

por meio do software SnapGene. Em que, foram selecionadas regiões consenso com homologia $\geq 95\%$ e estas foram utilizadas para o desenho dos iniciadores por meio da plataforma Primer Blast do *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI, USA). Os iniciadores com poucas regiões conservadas, para os quais não foi possível obter sequências consenso com homologia $\geq 95\%$, foram separados em clados, no caso dos genes *blaCTX-M* e do *blaOXA*, e esses foram desenhados para os integrantes de cada clado.

4.5. Extração de DNA bacteriano em gel de agarose e desenvolvimento de controles positivos para os genes analisados

O DNA bacteriano de uma cepa sabidamente positiva para cada gene analisado foi diluído para uma concentração de 50 ng/ μ L e realizou-se um qPCR (Master Mix: 7,5 uL de enzima goTaq Promega, 1,5 uL de cada iniciador senso e anti-senso, 2 uL do DNA bacteriano e 2,5 uL de água, compondo um total de 15 uL de reação) para amplificação dos genes. O fragmento da banda referente ao amplicon esperado de acordo com o desenho dos iniciadores, foi separado por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio para visualização em transiluminador ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

A banda foi cortada do gel de agarose com bisturi e fragmentada em pequenos pedaços para então ser colocada dentro de uma coluna de filtração de 1,5 mL contendo filtro embebido com tampão Tris-EDTA (TE). O tubo contendo o gel foi centrifugado a 4000 rpm por 10 min. Após a centrifugação o filtro foi descartado e a solução filtrada foi transferida para um tubo de 2mL.

Seguiu-se então uma etapa de purificação utilizando o protocolo do kit RibospinTM vDR (GeneAll, Seoul, Coreia do Sul). No qual, 300 μ L da amostra foi transferido para um microtubo de 1,5mL, logo após foi adicionado 500 μ L do tampão VL ao tubo e este foi agitado por vortex. A amostra foi incubada em temperatura ambiente por 10 min e após o tempo de incubação foi adicionado 700 μ L do tampão RBI e o microtubo invertido por algumas vezes até completa homogeneização da solução.

A solução foi transferida para um microtubo de 1,5 mL contendo uma coluna com filtro e centrifugada a 10.000 x g por 30s em temperatura ambiente. Após a centrifugação o precipitado foi descartado e adicionado à coluna com filtro 500 μ L do tampão RBW. O microtubo foi centrifugado a 10.000 x g por 30 s em temperatura ambiente e o precipitado foi descartado. Em seguida, foi adicionado à coluna com filtro 500 μ L do tampão RNW e centrifugado a 10.000 x g por 1 min e 30 s em temperatura ambiente e o precipitado foi

descartado. A coluna contendo o filtro foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 50 µL de água livre de nucleasse a coluna com filtro e este foi centrifugado a 10.000 x g por 2 min. O ácido nucléico purificado foi acondicionado em freezer para posterior utilização.

Uma PCR foi realizada para confirmar a presença do fragmento de DNA desejado, e amplificar a sua concentração, e este produto foi por fim padronizado à uma concentração de 250 ng/uL e conservado em freezer -80°C até sua utilização nos experimentos.

4.6. Avaliação da curva de eficiência e limite de detecção dos iniciadores

Para a análise da curva de eficiência e limite de detecção dos iniciadores, o DNA controle foi diluído para uma concentração de 1ng/uL ($\approx 7.820.000.000$ cópias) e foram analisados nove pontos com fator de diluição 1:8 (2uL DNA + 14 uL H₂O). A qPCR da curva padrão foi realizada a 45 ciclos, após a execução da curva, foi determinado o valor de *Threshold* no qual os iniciadores apresentavam o maior valor percentual de eficiência, sendo considerado como aceitáveis somente os iniciadores que atingissem valores de eficiência > 95% e < que 105%. Foi determinado o valor mínimo de detecção em valores de CT para cada iniciador baseado no ultimo ponto de diluição analisados da curva (**Tabela 1 e 2**). Os iniciadores dos genes *blaVIM*, *blaIMP*, *blaSIM* e *blaVEB* foram retirados do estudo, pois não obteve uma eficiência satisfatória.

Tabela 1 Parâmetros para análise do qPCR para os genes codificadores de bombas de efluxo.

Iniciador	Threshold	Eff%	R²	CT
MexA	0.5	101.1	1	33
MexB	0.5	99.32	0.99	34
MexC	0.45	98.8	1	30
MexD	0.3	96.45	1	29
MexE	0.25	95.4	0.99	27
MexF	0.8	97.0	0.98	34
MexG	0.67	95.99	1	34
MexH	0.44	95.45	1	33
MexV	0.1	98.16	0.99	33
MexW	0.3	95.69	1	22
MexX	0.011	95.32	0.99	30
MexY	0.025	96.15	1	33
AcrAB- tolC	0.3	99.0	0.99	38

Eff%- eficiência; R²-Razão; CT- *Cycle Threshold*

Tabela 2 Parâmetros para análise do qPCR para os genes codificadores de β -lactamases.

Iniciador	Threshold	Eff %	R²	CT
blaSHV	0,6	96,15	0,99	36,57
blaKPC	0,2	100,42	0,99	35,9
blaNDM	0,4	99,90	0,99	34,98
blaTEM	0,7	95,32	1	29,81
blaGES	0,2	100,21	0,99	34,83
blaCTXM-1	0,4	95,75	0,99	35,5
blaCTXM-2	0,3	100,82	0,99	35,33
blaCTXM-3	0,1	97,82	0,99	35,6
blaCTXM-4	0,1	95,32	1,0	25,82
blaCTXM-5	0,3	98,09	0,99	35,9
blaOXA-23-like	0,16	99,51	1	32,7
blaOXA-24/40-like	0,15	102,53	0,98	32,97
blaOXA-51-like	0,55	95,51	0,99	39,01

Eff%- eficiência; R²-Razão; CT- *Cycle Threshold*

4.7. Detecção dos genes relacionados à resistência por qPCR

As cepas selecionadas de *P. aeruginosa* foram analisadas por PCR em tempo real (qPCR) pelo QuantStudio 3® (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) para a detecção de 13 genes codificadores de bombas de efluxo (**Tabela 3**) e 14 genes codificadores de β -

lactamases (**Tabela 4 e Tabela 5**), através de iniciadores específicos conforme as tabelas. As reações foram padronizadas com o uso de controles positivos e controle negativo (água miliQ) para determinar as condições de qPCR mais eficientes, de forma a reduzir a existência de inespecificidade e facilitar a interpretação dos resultados. Tais condições incluíram a determinação da melhor temperatura de anelamento (T_a) dos iniciadores, o número de ciclos e a concentração dos iniciadores. As condições das reações dos qPCR incluíram um passo inicial de 2 min a 95°C; 35 ciclos a 95°C por 15s de desnaturação, temperatura de anelamento a depender do iniciador utilizado por 1 min, após cada reação foi realizada uma curva de melting para determinar a T_m (Temperatura de melting) de cada amplicon.

Tabela 3 Descrição dos genes relacionados à codificação de bombas de efluxo.

Bombas de Efluxo	Acesso ao GenBank	Gene	Função	iniciadores	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Ta (°C)
MexAB-OprM	AE004091.2	mexA	Proteína de fusão da membrana	MexA S	GACAAGTGGCTGGTTACCGA	96	63
				MexA AS	CACGGTCTTCACCTCGACAC		
	L11616.1	mexB	Transportador de membrana interna	MexB S	GTCGATTCCGTTCTCGGTGA	158	65
				MexB AS	ACTCCACGATGAGAATGGCG		
MexCD-OprJ	U57969.1	mexC	Proteína de fusão da membrana	MexC S	CGTGCAATAGGAAGGATCGG	104	60
				MexC AS	TCCACCGGCAACACCATT		
	U57969.1	mexD	Transportador de membrana interna	MexD S	TACACCCTGATCCCGTCCAT	170	64
				MexD AS	ATGATCCGCTCGACGTTCTC		
MexEF-OprN	AE004091.2	mexE	Proteína de fusão da membrana	MexE S	CTGAGCTTACCCGGATCAC	140	64
				MexE AS	GCGTCGAAGTAGGCGTAGAC		
	AE004091.2	mexF	Transportador de membrana interna	MexF S	TCATCAAGGTCAGCGACACC	169	64
				MexF AS	CACTCGTAGGTCATGCCGTT		
MexGHI-OpmD	AE004091.2	mexG	Proteína de membrana	MexG S	TGCAGCGCTTCATCGATAACT	120	64
				MexG AS	GGCTGGCCTGATAGTCGAAC		
	AE004091.2	mexH	Proteína de fusão da membrana	MexH S	TCATCAAGGTCAGCGACACC	124	65
				MexH AS	CACTCGTAGGTCATGCCGTT		
MexVW-OprM	AE004091.2	mexV	Proteína de fusão da membrana	MexV S	TACTGTTCCCTTCCGGCGAC	170	61
				MexV AS	TTCGCTTTTCGAGATGGCCT		
	NC_002516.2	mexW	Proteína de membrana	MexW S	CCTCGGTCTACATCGGCATC	181	65
				MexW AS	CCGAGGGTCTTACCCTTC		
MexXY-OprM	AB015853.1	mexX	Proteína de membrana	MexX S	TGCTGTTCCAGATCGACCCT	127	60
				MexX AS	TCCTTGATCAGGTCGGCGTA		
	AB015853.1	mexY	Proteína de fusão da membrana	MexY S	GTCAACCAAATGACCGCCAC	134	65
				MexY AS	ATGTTGTAGCTACGCCCTC		

AcrAB-toIC	AP018753.1	AcrAB-toIC	Sistema tripartido com membrana celular(AcrB), membrana externa(toIC) ligado pelo periplasma (acrA)	AcrAB-toIC S	GGTAGAGAACGTCGAGCGAG	143	60
				AcrAB-toIC AS	CGAAGAACGCCATCGGGATA		

Ta= Temperatura de anelamento do iniciador

Pb= pares de bases; Iniciador S= Senso; Iniciador AS= Anti-senso

Tabela 4 Descrição dos genes relacionados à codificação de β -lactamases.

β -lactamases	Acesso ao GenBank	Função	Gene	Nº Variações	Iniciadores	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Ta (°C)
SHV	ARO:3000015	β -lactamase sulfidrilá variável	<i>blaSHV</i>	156	SHV - S	ATTATCTCCCTGTTAGCCACCC	70	61
					SHV - AS	GTTTAATTTGCTCAAGCGGCTG		
KPC	ARO:3000059	Serino-Carbapenemase	<i>blaKPC</i>	19	KPC - S	TCGCGGAACCATTCGCTAAA	128	61
					KPC - AS	GAATGAGCTGCACAGTGGGA		
NDM	ARO:3000057	Metallo- β -lactamase	<i>blaNDM</i>	27	NDM - S	GAAGCTGAGCACCGCATTAG	86	64
					NDM - AS	CCATTTGCTGGCCAATCGTC		
GES	ARO:3000066	β -lactamase de espectro estendido da Guiana	<i>blaGES</i>	25	GES - S	GCCCAGGAGAGAGATTACGC	94	61
					GES - AS	CTTGACCGACAGAGGCAACT		
TEM	ARO:3000014	β -lactamase temoneira	<i>blaTEM</i>	167	TEM - S	ACCCAGAAACGCTGGTGAAA	110	61
					TEM - AS	GGGGCGAAAACCTCTCAAGGA		
CTXM-1	ARO:300001	β -lactamases de espectro estendido com ação em cefotaxime	<i>blaCTXM-1</i>	40	CTXM-1 S	GATTGCGGAAAAGCACGTCA	87	61
CTXM-1 AS					TTCATCGCCACGTTATCGCT			
CTXM-2			<i>blaCTXM-2</i>	16	CTXM-2 S	CGCCGCTGATTCTGGTCA	90	61
					CTXM-2 AS	TGACGATTTTAGCCGCGAC		
CTXM-3			<i>blaCTXM-3</i>	49	CTXM-3 S	CGTGGCTCAAAGGCAATACG	180	61
					CTXM-3 AS	TCTGTTGCGGCTGGGTAAAA		
CTXM-4			<i>blaCTXM-4</i>	14	CTXM-4 S	CGCTCAACACCGCGATCC	197	61
					CTXM-4 AS	ATCCCCGACAACCCACGAT		
CTXM-5			<i>blaCTXM-5</i>	23	CTXM-5 S	ATGGCGCAGACCCTGAAAAA	155	61
					CTXM-5 AS	CTGCCGTTTTATCGCCA		

Ta= Temperatura de anelamento do iniciador

Pb= pares de bases; Iniciador S= Senso; Iniciador AS= Anti-senso

Tabela 5 Descrição dos genes relacionados à codificação de β -lactamases do grupo OXA.

β -lactamases	Acesso ao GenBank	Função	Gene	Nº Variações	Iniciador	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Ta (°C)
OXA-23-like	ARO:3000017	Oxacilinase	<i>blaOXA-23-like</i>	25	OXA23L-F	GCTCTAAGCCGCGCAAATAC	129	61
					OXA23L-R	TGACCTTTTCTCGCCCTTCC		
OXA-24/40-like	ARO:3000017	Oxacilinase	<i>blaOXA-24/40-like</i>	8	OXA24/40L-F	TGCCGATGACCTTGCACATA	177	61
					OXA24/40L-R	CCATTAGCTTGCTCCACCCA		
OXA-48-like	ARO:3000017	Oxacilinase	<i>blaOXA-48-like</i>	17	OXA48L-F	CGGTAGCAAAGGAATGGCAAG	183	61
					OXA48L-R	GGGCGATCAAGCTATTGGGA		
OXA-51-like	ARO:3000017	Oxacilinase	<i>blaOXA-51-like</i>	153	OXA51L-F	GATCGGCCTTGAGCACCATA	199	61
					OXA51L-R	GCCATAACCAACACGCTTCA		

Ta= Temperatura de anelamento do iniciador

Pb= pares de bases; Iniciador S= Senso; Iniciador AS= Anti-senso

4.8. Análise dos dados

Todos os dados gerados foram codificados em planilha Excel, MICROSOFT® (Nova York, EUA) e adicionados por dois digitadores independentes. O teste de Fisher foi empregado para comparar a proporção de ocorrência de uma variável entre os grupos. O intervalo de confiança foi de 95% e o teste foi considerado estatisticamente significativo quando $P < 0.05$, utilizando o programa IBM SPSS Statistics Versão 21 (SPSS Statistics Software, Nova York, EUA).

As figuras foram obtidas utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, EUA).

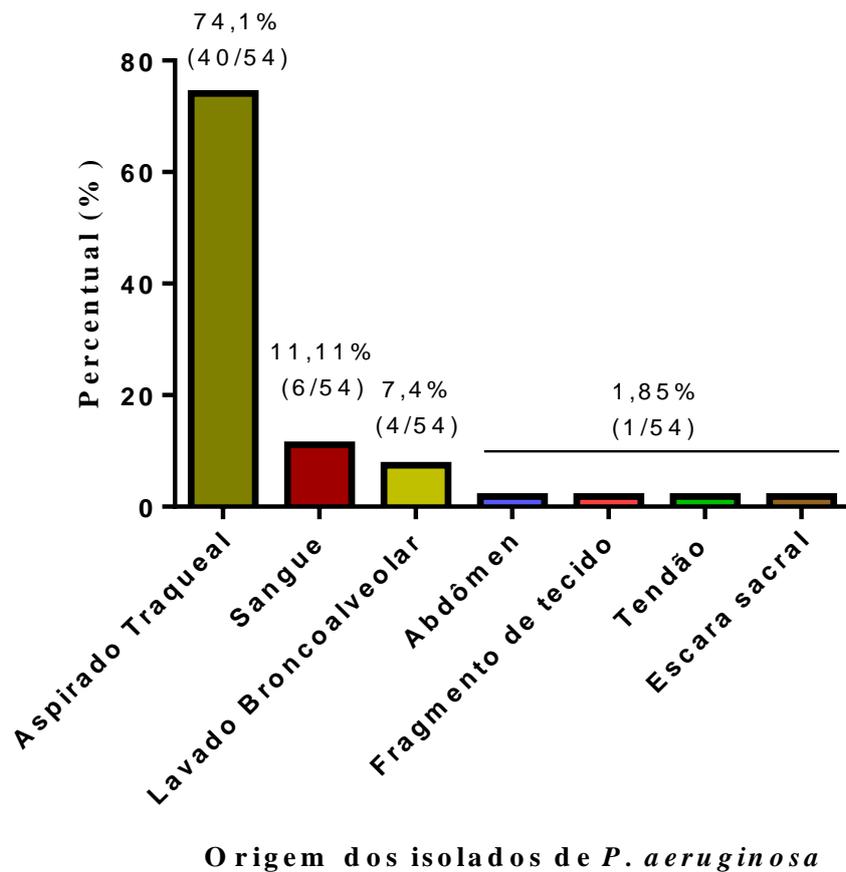
Outra análise empregada neste estudo foi através do CART® (Classification and Regression Trees) pelo programa IBM SPSS Statistics Versão 21, que possibilita uma moderna classificação de dados baseado em árvores de decisão. Neste estudo, o CART pôde indicar associações da presença de genes relacionados à resistência com os fenótipos de resistência ou susceptibilidade aos antimicrobianos testados.

5. RESULTADOS

5.1. Prevalência de *P. aeruginosa* no estudo

Durante o período deste estudo, foram isoladas 258 bactérias Gram negativas resistentes a pelo menos um antimicrobiano, desses 20,9% (54/258) foram identificadas como *P. aeruginosa* que foram isoladas de diferentes sítios anatômicos dos pacientes internados. O aspirado traqueal foi a amostra que obteve um maior número de isolados de *P. aeruginosa* com 74,1% (40/54), seguido de amostras de sangue com 11,11% (6/54), de lavado broncoalveolar 7,40% (4/54), de abdômen 1,85% (1/54), de fragmento de tecido 1,85% (1/54), de escara sacral 1,85% (1/54) e de tendão 1,85% (1/54), conforme **Figura 5**.

Figura 5 Origem das cepas de *P. aeruginosa* isoladas da Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC.



5.2. Fenótipo de resistência aos antimicrobianos testados nos isolados de *P. aeruginosa*

Foram testados 14 antimicrobianos de diferentes classes, no qual, pelo menos um fenótipo de resistência aos antimicrobianos testados foi encontrado em 96,3% (52/54) nos isolados de *P. aeruginosa*. Os isolados de *P. aeruginosa* obteve uma taxa de resistência de 100% para cefoxitina (32/32), ceftriaxona (25/25), cefuroxima axetil (32/32) e tigeciclina (32/32), confirmando assim a resistência intrínseca do patógeno a esses antimicrobianos. A combinação de piperacilina com tazobactam obteve uma taxa de 74,4% (32/43), seguida por ceftazidima e cefepime ambos com o mesmo percentual de 63,4% (33/52), imipenem com 61,2% (30/49), meropenem com 56,2% (27/48), ciprofloxacina 54,9% (28/51), gentamicina 41,5% (22/53) e, por fim, amicacina com 28,3% (15/53), conforme **Tabela 6 e 7**. Todos os isolados testados não demonstraram fenótipo de resistência a colistina, ceftazidima com avibactam e ceftolozone com tazobactam.

Tabela 6 Fenótipo de resistência aos β -lactâmicos das cepas de *P. aeruginosa* isoladas dos pacientes na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC.

Antimicrobianos % - (N/Total)				
β -lactâmicos				
Penicilina/ Inibidor	Cefalosporina 3ª Geração	Cefalosporina 4ª Geração	Carbapenêmicos	
Piperacilina/ Tazobactam	Ceftazidima	Cefepima	Imipenem	Meropenem
74,4 (32/43)	63,4 (33/52)	63,4 (33/52)	61,2 (30/49)	56,2 (27/48)

Tabela 7 Fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas das cepas de *P. aeruginosa* isoladas dos pacientes na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC.

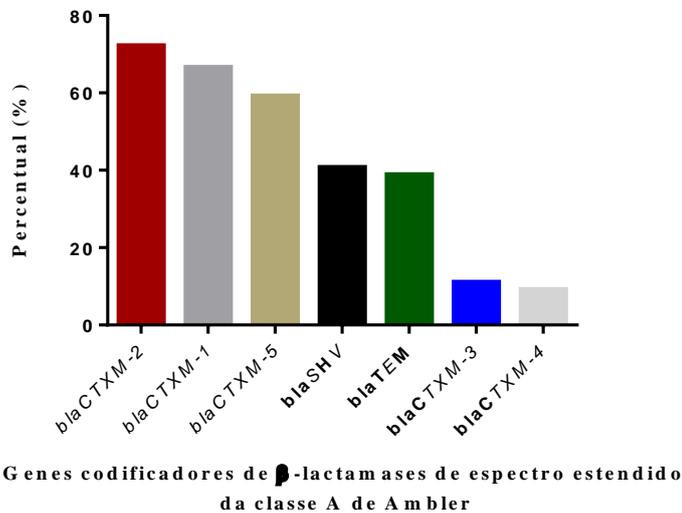
Antimicrobianos % - (N/Total)		
Aminoglicosídeos		Fluoroquinolona
Gentamicina	Amicacina	Ciprofloxacina
41,5 (22/53)	28,3 (15/53)	54,9 (28/51)

Os isolados testados de *P. aeruginosa* obtiveram um percentual de 61,11% (33/54) para microrganismos MDR, seguido de um percentual de 55,5% (30/54) para microrganismos XDR e um percentual de 46,2% (25/54) para microrganismo resistente a carbapenêmicos.

5.3. Detecção dos genes de resistência nos isolados de *P. aeruginosa* por qPCR

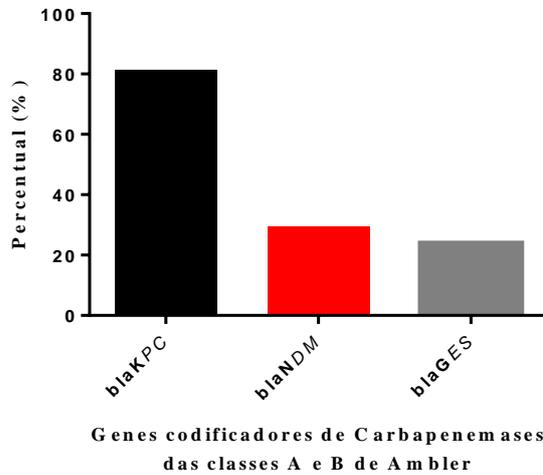
Para a detecção dos genes que codificam as β -lactamases o maior percentual encontrado foi do gene *blaKPC* com 81,49% (44/54), seguido por *blaCTXM-2* com 72,22% (39/54), *blaCTXM-1* com 66,66% (36/54), *blaCTXM-5* com 59,25% (32/54), *blaSHV* com 40,74% (22/54), *blaTEM* e *blaOXA-23-like* com 38,89% (21/54), *blaNDM* com 29,6% (16/54), *blaGES* e *blaOXA-51-like* com 24% (13/54), *blaOXA-24/40-like* com 20,4% (11/54), *blaCTXM-3* com 11,11% (6/54), *blaCTXM-4* com 9,26% (5/54) e não houve detecção do gene *blaOXA-48-like* nos isolados, conforme mostra a **Figura 6-8**.

Figura 6 Percentual dos genes codificadores de β -lactamases de espectro estendido da classe A de Ambler encontrados nos isolados de *P. aeruginosa*.



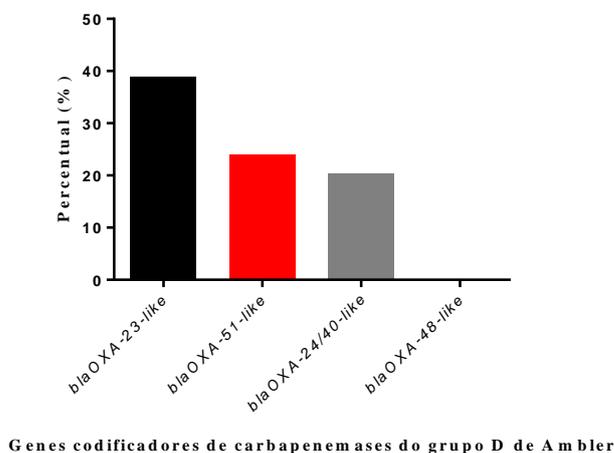
TEM: Temoneira; SHV: variável sulfidril; CTXM: β -lactamases de espectro estendido com ação em cefotaxime.

Figura 7 Percentual dos genes codificadores de carbapenemases de classe A e B de Ambler encontrados nos isolados de *P. aeruginosa*.



KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM: Nova Deli Metallo- β -lactamase; GES: β -lactamases de espectro estendido da Guiana.

Figura 8 Percentual dos genes codificadores de β -lactamases da classe D de Ambler encontrados nos isolados de *P. aeruginosa*.



OXA: gene de resistência a oxacilina.

Foram avaliados 14 genes codificadores de β -lactamases nos isolados de *P. aeruginosa*, no qual estes foram associados com os antimicrobianos testados da classe dos β -lactâmicos. A **Tabela 8** mostra a distribuição do percentual dos genes detectados nos isolados testados para o antimicrobiano cefepima e ceftazidima, no qual esses antimicrobianos foram apresentados em uma mesma tabela pois apresentaram o mesmo percentual de fenótipo de resistência e positividade dos genes codificadores de β -

lactamases, apresentando um maior percentual de positividade para os genes *blaKPC*, *blaCTXM-2*, *blaCTXM-1*, *blaCTXM-5*, *blaSHV* com percentuais de 82,7% (43/52), 75% (39/52), 69,2% (36/52), 61,5% (32/52) e 42,3% (22/52), respectivamente. A presença dos genes *blaTEM* e *blaOXA-23-like* foram associados a resistência fenotípica ao antimicrobiano cefepima e ceftazidima (P= 0,017; OR 5,66; IC 95% 1,38-23,21) e (P=0,041; OR 3,98; IC 95% 1,08 – 14,58), respectivamente.

Tabela 8 Percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de *P. aeruginosa* nos grupos resistente e susceptível ao antimicrobiano cefepima e ceftazidima.

Genes codificadores β -lactamases	Total N=52(%)	Resistente N=33(%)	Susceptível N=19(%)	P valor	OR	95% IC
<i>blaKPC</i>	43 (82,7)	27 (81,8)	16 (84,2)	1,0000	0,84	0,18 – 3,85
<i>blaCTXM-2</i>	39 (75)	25 (75,8)	14 (73,7)	1,0000	1,11	0,30 – 4,07
<i>blaCTXM-1</i>	36 (69,2)	24 (72,7)	12 (63,2)	0,5405	1,55	0,46 – 5,20
<i>blaCTXM-5</i>	32 (61,5)	19 (57,6)	13 (68,4)	0,5579	0,62	0,19 – 2,05
<i>blaSHV</i>	22 (42,3)	13 (39,4)	9 (47,37)	0,3969	0,58	0,18 – 1,82
<i>blaOXA-23-like</i>	21 (40,4)	17 (51,5)	4 (21)	0,041*	3,98	1,08 – 14,58
<i>blaTEM</i>	20 (38,5)	17 (51,5)	3 (15,8)	0,017*	5,66	1,38-23,21
<i>blaNDM</i>	16 (30,7)	10 (30,3)	6 (31,6)	1,0000	0,94	0,27 – 3,19
<i>blaGES</i>	13 (25)	8 (24,2)	5 (26,3)	1,0000	0,89	0,24 – 3,27
<i>blaOXA-51-like</i>	13 (25)	11 (33,3)	2 (10,5)	0,0987	4,25	0,82 – 21,79
<i>blaOXA-24/40-like</i>	10 (19,2)	8 (24,2)	2 (10,5)	0,2925	2,72	0,51 – 14,42
<i>blaCTXM-3</i>	6 (11,5)	3 (9)	3 (15,8)	0,6563	0,53	0,09 – 2,95
<i>blaCTXM-4</i>	5 (9,3)	4 (12,1)	1 (5,3)	0,6410	2,48	0,25 – 24,02
<i>blaOXA-48-like</i>	0	0	0	0	0	0

OR= Odds ratio; IC= Intervalo de confiança.

Os genes detectados nos isolados testados para o antimicrobiano piperacilina em combinação com inibidor de β -lactamase tazobactam apresentaram um maior percentual de positividade para os genes *blaKPC*, *blaCTXM-2*, *blaCTXM-1*, *blaCTXM-5*, *blaSHV* e *blaOXA-23-like* com percentuais de 81,4% (35/43), 74,4% (32/43), 67,4% (29/43), 65,1%

(28/43), 41,8% (18/43) e 41,8% (18/43), respectivamente (**Tabela 9**). Não houve significância estatística entre os genes pesquisados e o fenótipo.

Tabela 9 Percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de *P. aeruginosa* nos grupos resistente e susceptível ao antimicrobiano piperacilina com tazobactam.

Genes codificadores β -lactamases	Total	Resistente	Susceptível	P valor	OR	95% IC
	N=43(%)	N=32(%)	N=11(%)			
<i>blaKPC</i>	35 (81,4)	25 (78,1)	10 (90,9)	0,6563	0,35	0,03 – 3,29
<i>blaCTXM-2</i>	32 (74,4)	24 (75)	8 (72,7)	1,0000	1,12	0,23 – 5,30
<i>blaCTXM-1</i>	29 (67,4)	22 (68,7)	7 (63,6)	0,5405	1,25	0,29 – 5,29
<i>blaCTXM-5</i>	28 (65,1)	21 (65,6)	7 (63,6)	0,5579	1,09	0,26 – 4,55
<i>blaSHV</i>	18 (41,8)	14 (43,7)	4 (36,3)	0,7362	1,36	0,33 – 5,59
<i>blaOXA-23-like</i>	18 (41,8)	16 (50)	2 (18,2)	0,0856	4,50	0,83 – 24,19
<i>blaTEM</i>	17 (39,5)	15 (46,8)	2 (18,2)	0,1539	3,97	0,73-21,36
<i>blaNDM</i>	13 (30,2)	11 (34,3)	2 (18,2)	0,4559	2,35	0,43 – 12,87
<i>blaOXA-51-like</i>	12 (27,9)	11 (34,3)	1 (9,1)	0,1393	5,23	0,59 – 46,42
<i>blaGES</i>	11 (25)	7 (21,8)	4 (36,3)	0,4301	0,49	0,11 – 2,16
<i>blaOXA-24/40-like</i>	6 (19,2)	4 (24,2)	2 (18,2)	0,6367	0,64	0,10 – 4,11
<i>blaCTXM-3</i>	4 (9,3)	3 (9,3)	1 (9,1)	1,0000	1,03	0,09 – 11,12
<i>blaCTXM-4</i>	4 (9,3)	3 (9,3)	1 (9,1)	1,0000	1,03	0,09 – 11,12
<i>blaOXA-48-like</i>	0	0	0	0	0	0

OR= Odds ratio; IC= Intervalo de confiança.

A distribuição do percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases detectados nos isolados testados para o antimicrobiano imipenem apontou uma maior taxa para os genes *blaKPC*, *blaCTXM-2*, *blaCTXM-1*, *blaCTXM-5* e *blaSHV* com percentuais de 79,6% (39/49), 71,4% (35/49), 67,3% (33/49), 57,1% (28/49) e 38,7% (19/49), respectivamente (**Tabela 10**). A presença do gene *blaTEM* obteve significância estatística com a resistência fenotípica ao antimicrobiano imipenem (P=0,018; OR 5,33; IC 95% 1,28-22,20).

Tabela 10 Percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de *P. aeruginosa* nos grupos resistente e susceptível ao antimicrobiano imipenem.

Genes codificadores β -lactamases	Total N=49(%)	Resistente N=30(%)	Susceptível N=19(%)	P valor	OR	95% IC
<i>blaKPC</i>	39 (79,6)	24 (80)	15 (78,9)	1,0000	1,06	0,25 – 4,41
<i>blaCTXM-2</i>	35 (71,4)	20 (66,6)	15 (78,9)	0,5185	0,53	0,13 – 2,03
<i>blaCTXM-1</i>	33 (67,3)	19 (63,3)	14 (73,7)	0,5412	0,61	0,17 – 2,18
<i>blaCTXM-5</i>	28 (57,1)	15 (50)	13 (68,4)	0,2467	0,46	0,13 – 1,53
<i>blaSHV</i>	19 (38,7)	10 (33,3)	9 (47,3)	0,3774	0,55	0,17 – 1,80
<i>blaOXA-23-like</i>	18 (36,7)	13 (43,3)	5 (26,3)	0,3621	2,14	0,61 – 7,48
<i>blaTEM</i>	18 (36,7)	15 (50)	3 (15,7)	0,018*	5,33	1,28 – 22,20
<i>blaNDM</i>	15 (30,6)	7 (23,3)	8 (42,1)	1,0000	0,87	0,27 – 2,81
<i>blaOXA-51-like</i>	12 (24,5)	10 (33,3)	2 (10,5)	0,0948	4,25	0,81 – 22,14
<i>blaGES</i>	12 (24,5)	6 (20)	6 (31,6)	0,4975	0,54	0,14 – 2,02
<i>blaOXA-24/40-like</i>	8 (16,3)	6 (20)	2 (10,5)	0,4583	2,12	0,38 – 11,83
<i>blaCTXM-3</i>	5 (10,2)	3 (10)	2 (10,5)	1,0000	0,94	0,14 – 6,25
<i>blaCTXM-4</i>	3 (6,1)	3 (10)	0	0,2730	4,96	0,24 – 101,7
<i>blaOXA-48-like</i>	0	0	0	0	0	0

OR= Odds ratio; IC= Intervalo de confiança.

A distribuição do percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases detectados nos isolados testados para o antimicrobiano meropenem demonstrou uma maior taxa para os genes *blaKPC*, *blaCTXM-2*, *blaCTXM-1*, *blaCTXM-5* e *blaSHV* com percentuais de 79,6% (39/49), 71,4% (35/49), 67,3% (33/49), 57,1% (28/49) e 38,7% (19/49), respectivamente (**Tabela 11**). A presença dos genes *blaTEM* e *blaOXA-51-like* obteve significância estatística com a resistência fenotípica ao antimicrobiano meropenem (P= 0,034; OR 4,57; IC 95% 1,21-17,23) e (P=0,043; OR 5,58; IC 95% 1,06 – 29,20), respectivamente.

Tabela 11 Percentual de positividade dos genes codificadores de β -lactamases nos isolados de *P. aeruginosa* nos grupos resistente e susceptível ao antimicrobiano meropenem.

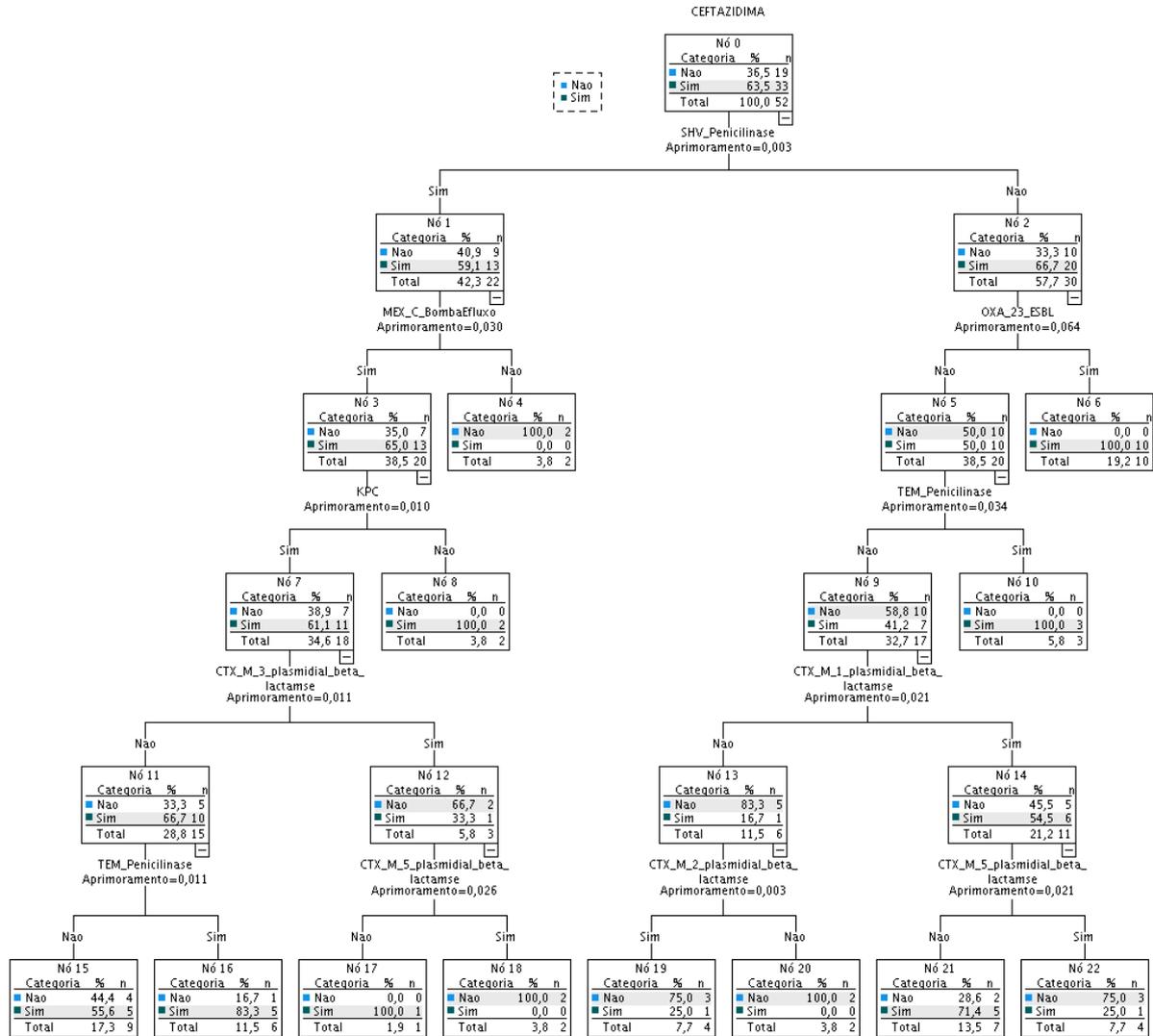
Genes codificadores β-lactamases	Total N=48(%)	Resistente N=27(%)	Susceptível N=21(%)	P valor	OR	95% IC
<i>blaKPC</i>	38 (79,1)	21 (77,7)	17 (80,9)	1,0000	0,82	0,19 – 3,40
<i>blaCTXM-2</i>	35 (72,9)	18 (66,6)	17 (80,9)	0,3377	0,47	0,12 – 1,81
<i>blaCTXM-1</i>	35 (72,9)	19 (70,3)	16 (76,2)	0,7502	0,74	0,20 – 2,72
<i>blaCTXM-5</i>	28 (58,3)	13 (48,1)	15 (71,4)	0,1437	0,37	0,11 – 1,24
<i>blaSHV</i>	21 (43,7)	10 (37)	11 (52,4)	0,3820	0,53	0,16 – 1,70
<i>blaOXA-23-like</i>	19 (39,5)	13 (48,1)	6 (28,6)	0,2369	2,32	0,69 – 7,79
<i>blaTEM</i>	18 (37,5)	14 (51,8)	4 (19)	0,034*	4,57	1,21 – 17,23
<i>blaNDM</i>	16 (33,3)	7 (25,9)	9 (42,8)	0,2373	0,46	0,13 – 1,58
<i>blaOXA-51-like</i>	12 (25)	10 (37)	2 (9,5)	0,043*	5,58	1,06 – 29,20
<i>blaGES</i>	13 (27)	6 (22,2)	7 (33,3)	0,5161	0,57	0,15 – 2,06
<i>blaOXA-24/40-like</i>	8 (16,6)	6 (22,2)	2 (9,5)	0,4371	2,71	0,48 – 15,11
<i>blaCTXM-3</i>	6 (12,5)	3 (11,1)	3 (14,3)	1,0000	0,75	0,13 – 4,16
<i>blaCTXM-4</i>	2 (4,2)	2 (7,4)	0	0,4973	4,21	0,19 – 92,73
<i>blaOXA-48-like</i>	0	0	0	0	0	0

OR= Odds ratio; IC= Intervalo de confiança.

Os genes que codificam as bombas de efluxo da família MEX foram avaliados por operon, no qual a distribuição do percentual de positividade encontrada nos isolados testados foi de 100% para os genes *MEX-AB*, *MEX-EF*, *MEX-GH*, *MEX-VW*, *MEX-XY*, seguido por um percentual de 96,3% para o gene *MEX-CD* e não houve positividade para o gene *acrAB-tolC*. Não foram realizados testes estatísticos em relação às bombas de efluxo devido à alta positividade dos genes.

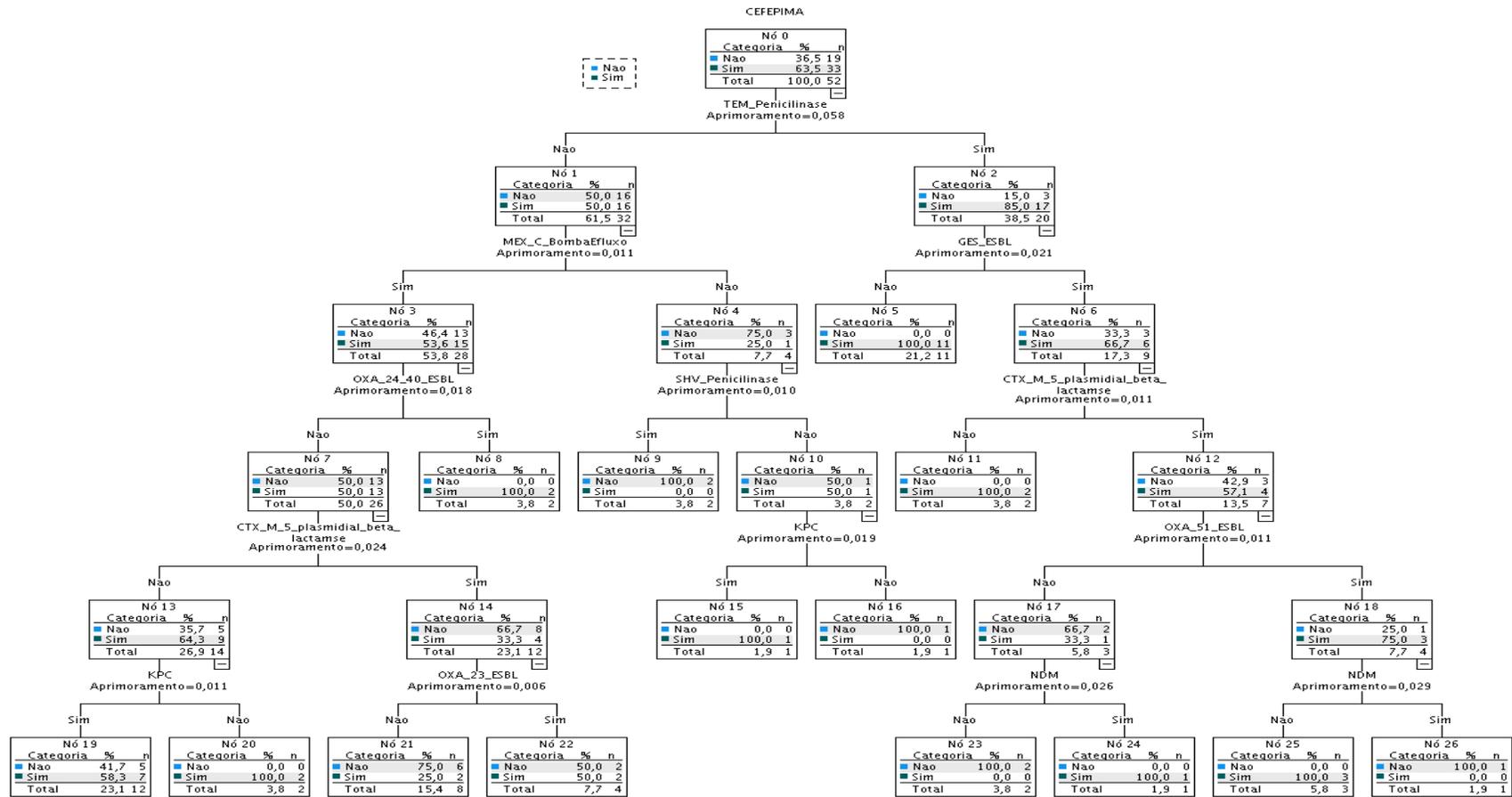
Para investigar se uma combinação específica de genes relacionado à resistência pôde ser correlacionada com o fenótipo de resistência, usamos a análise CART, que constrói um modelo em forma gradual e o resultado é uma combinação de fatores associados com cepas resistentes ou suscetíveis ao antimicrobiano analisado. Foram analisados os antimicrobianos cefepima, ceftazidima, imipenem, meropenem e piperacilina associado ao tazobactam com os genes relacionados as β -lactamases e as bombas de efluxo. Entretanto, não houve associação estatística entre os fenótipos de resistência aos antimicrobianos analisados e a combinação de genes analisados (**Figura 9-13**).

Figura 9 Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a ceftazidima em cepas de *P. aeruginosa*.



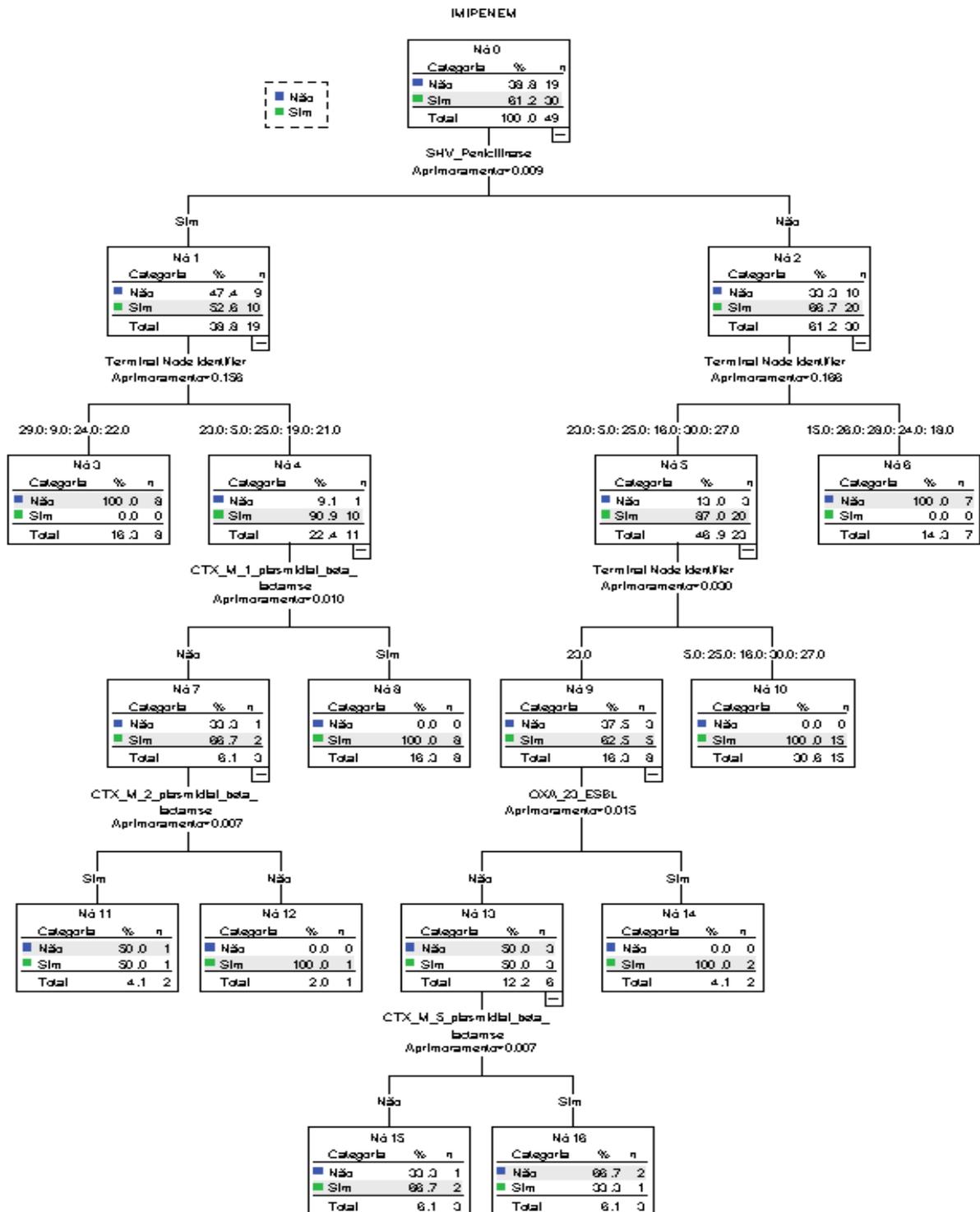
KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; TEM: Temoneira; SHV: variável sulfidrica; CTXM: β -lactamases de espectro estendido com ação em cefotaxime; OXA: gene de resistência a oxacilina.

Figura 10 Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a cefepima em cepas de *P. aeruginosa*.



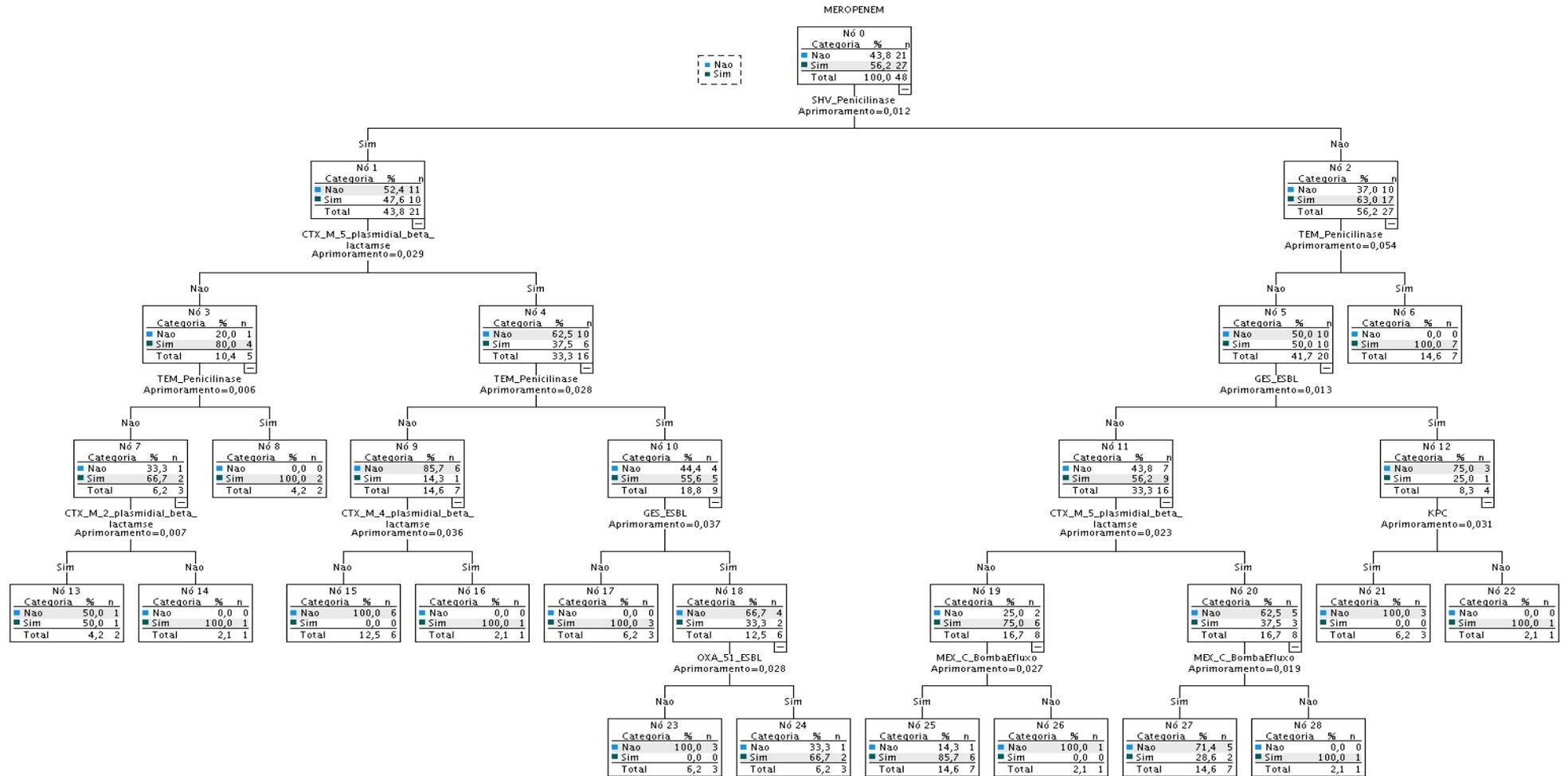
KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemase; NDM: Nova Deli Metallo- β -lactamase; TEM: Temoneira; SHV: variável sulfidril; CTXM: β -lactamases de espectro estendido com ação em cefotaxime; GES: β -lactamases de espectro estendido da Guiana; OXA: gene de resistência a oxacilina; MexC: bomba de efluxo MexCD.

Figura 11 Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a imipenem em cepas de *P. aeruginosa*.



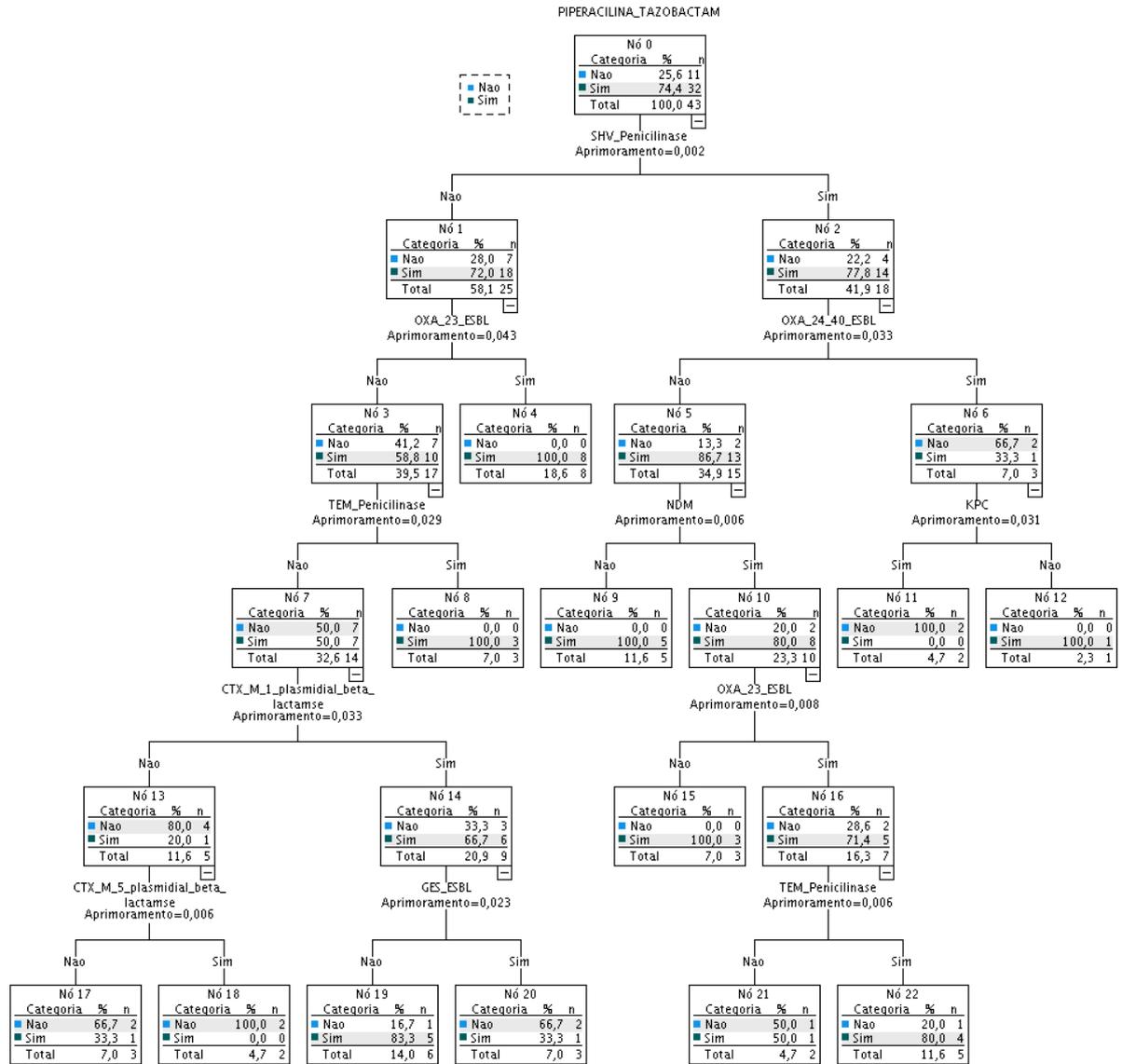
SHV: variável sulfidril; CTXM: β -lactamases de espectro estendido com ação em cefotaxime; GES: β -lactamases de espectro estendido da Guiana; OXA: gene de resistência a oxacilina.

Figura 12 Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a meropenem em cepas de *P. aeruginosa*.



KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; TEM: Temoneira; SHV: variável sulfidril; CTXM: β -lactamases de espectro estendido com ação em cefotaxime; GES: β -lactamases de espectro estendido da Guiana; OXA: gene de resistência a oxacilina; MexC: bomba de efluxo MexCD.

Figura 13 Árvore de decisão mostrando a combinação de fatores genéticos associados ao fenótipo de resistência a piperacilina/tazobactam em cepas de *P. aeruginosa*.



KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM: Nova Deli Metallo- β -lactamase; TEM: Temoneira; SHV: variável sulfidrila; CTXM: β -lactamases de espectro estendido com ação em cefotaxime; GES: β -lactamases de espectro estendido da Guiana; OXA: gene de resistência a oxacilina.

6. DISCUSSÃO

A *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista com bastante importância clínica em unidades de terapia intensiva, principalmente devido a sua alta resistência a diversos antimicrobianos, impossibilitando um tratamento eficaz, levando a alta morbidade e mortalidade desses pacientes em situação crítica (URZEDO et al., 2020).

O presente estudo analisou cepas de *P. aeruginosa* resistentes a antimicrobianos isoladas de diversos sítios anatômicos em pacientes internados na UTI de um hospital universitário, no qual foram detectadas altas taxas de resistência para os β -lactâmicos piperacilina com tazobactam, ceftazidima, cefepime, imipenem e meropenem com taxas de 74,4%, 63,4%, 63,4%, 61,2% e 56,2%, respectivamente, as cepas analisadas não apresentaram resistência para a colistina e para as cefalosporinas combinadas com inibidores de β -lactamases.

A análise do genótipo detectou uma alta presença da carbapenemase KPC (81,49%), em relação à análise dos demais genes correlacionados ao fenótipo de resistência, houve associação entre a presença dos genes: *blaTEM* e resistência a ceftazidima, cefepima, ao imipenem e meropenem ($P=0,017$; $P=0,017$; $P=0,018$ e $P=0,034$, respectivamente); *blaOXA-23* e resistência a ceftazidima e cefepima ($P=0,041$) e *blaOXA-51* e resistência ao meropenem ($P=0,043$).

Nosso estudo encontrou uma prevalência de 20,9% de infecções por esse patógeno, dentre os Gram-negativos isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano, que representa um percentual similar com outros estudos. De acordo com relatório emitido pela ANVISA (2021), a *P. aeruginosa* foi o terceiro microrganismo mais isolado dentre as bactérias Gram-negativas notificadas em infecções de corrente sanguínea, com percentual de 16,2%. Nos Estados Unidos, Sader e colaboradores analisando amostras de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes em UTI e não UTI, coletadas em 70 centros hospitalares, no período de 2018 a 2020, encontrou uma prevalência de 23,5% de *P. aeruginosa* isoladas em pacientes internados em UTI (SADER et al., 2022). Dunphy e colaboradores realizaram um estudo em ambientes ambulatoriais e hospitalares em regiões da Virgínia, Estados Unidos, no período de um ano (2019-2020), coletando diversas amostras, no qual identificaram uma prevalência de 60% de isolados de *P. aeruginosa* de diversos sítios anatômicos, sendo analisados 971 isolados coletados de 590 pacientes (DUNPHY et al., 2021), no qual esses estudos demonstram uma variabilidade na taxa de detecção desse patógeno.

Neste estudo, o maior número de isolados de *P. aeruginosa* foi obtido através de secreções de lavado brônquico com um percentual de 74,1%, resultados semelhantes foram reportados em outros estudos no qual a *P. aeruginosa* foi o patógeno mais isolado em secreções pulmonares (lavado brônquico e aspirado traqueal) (DUNPHY et al., 2021; NUNES et al., 2023). Infecções respiratórias ocasionadas por esse patógeno são bastante frequentes, principalmente em ambientes hospitalares, podendo estar relacionado à manipulação de procedimentos invasivos nos pacientes, tais como intubação traqueal, aspirações e a necessidade de ventilação pulmonar mecânica (TENOVER; NICOLAU; GILL, 2022; URZEDO et al., 2020).

A fim de identificar o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana das cepas de *P. aeruginosa* isoladas no ambiente hospitalar, foram testados 15 antimicrobianos de diferentes classes, no qual, a maior taxa de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* foi de 100% para as cefalosporinas de segunda e terceira geração cefoxitina, ceftriaxona e cefuroxima axetil em que estudos mostram que a única cefalosporina de terceira geração com ação em cepas de *P. aeruginosa* é a ceftazidima (BABICH et al., 2020; FREIFELD et al., 2011). O percentual de resistência para a tigeciclina também foi de 100%, o que corrobora com a literatura, pois apesar da tigeciclina ser utilizada para o tratamento de bactérias Gram-negativas não fermentadoras multiresistentes, esse antimicrobiano não possui ação contra *P. aeruginosa*, confirmando a resistência intrínseca deste patógeno frente às cefalosporinas de segunda geração e tigeciclina (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020; ULUKILIC et al., 2015).

Em relação aos demais β -lactâmicos testados, nosso estudo detectou uma alta taxa de resistência da combinação de piperacilina com tazobactam de 74,4%, ceftazidima e cefepime ambos com o mesmo percentual de 63,4% e em relação aos carbapenêmicos imipenem e meropenem apresentaram uma taxa de 61,2% e 56,2%, respectivamente. Em concordância com esses achados, pesquisa realizada nos Estados Unidos por Sader e colaboradores (2022) em cepas *P. aeruginosa* coletadas no período de dois anos e um estudo realizado no Rio de Janeiro em um período de 20 anos (SANTOS et al., 2019), encontraram resultados semelhantes para os antimicrobianos piperacilina com tazobactam, ceftazidima, cefepime e meropenem em cepas de *P. aeruginosa*, em que essas pesquisas indicaram um crescente aumento da taxa de resistência aos antimicrobianos com o passar dos anos.

Os antimicrobianos ciprofloxacina e gentamicina apresentaram uma taxa relativamente alta de resistência nas cepas isoladas (54,9% e 41,5%, respectivamente). O

perfil de resistência a esses antimicrobianos, no Brasil, de acordo com o relatório emitido pela ANVISA (2009), no período de 2006 a 2008, mostra que a ciprofloxacina e a gentamicina foram os principais antimicrobianos associados aos isolados com fenótipos de resistência, apresentando apenas 47% de susceptibilidade.

Em relação às cefalosporinas de terceira geração em combinação com inibidores de β -lactamases (ceftazidima com avibactam e ceftolozone com tazobactam) no nosso estudo não houve detecção do fenótipo de resistência, no qual o ceftolozone com tazobactam é um antimicrobiano antipseudomonal que possui ação em cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (HAIDAR, et al., 2017; MUNITA, et al., 2017), já o antimicrobiano ceftazidima com avibactam possui ação em cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes que são ESBL, AmpC e KPC positivas, pois esse inibidor remove o resíduo de serina que é a porção ativa da enzima, entretanto, esses antimicrobianos não agem em cepas MBLs positivas (DRAWZ, et al., 2014), indicando a ação dos inibidores de β -lactamases frente à alta positividade da presença dos genes codificadores de KPC em nosso estudo.

As taxas de susceptibilidade obtidas em nosso estudo se mostram em concordância com estudos que têm relatado uma boa atividade da ceftazidima associado ao avibactam e da ceftolozone associado ao tazobactam. López-Calleja e colaboradores (2019) realizaram um estudo em um hospital universitário localizado na Espanha, em que analisaram o perfil de susceptibilidade de 12 cepas MDR de *P. aeruginosa* e 117 cepas XDR de *P. aeruginosa* frente ao ceftolozone associado ao tazobactam, e detectaram uma taxa de susceptibilidade de 92,2% nestes isolados. No mesmo contexto, uma pesquisa efetuada pelo programa de vigilância global de liderança e vigilância em testes antimicrobianos (ATLAS, do inglês, *Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance*) coletou 2.521 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de 41 centros médicos em 10 países da América Latina, no período de 2017 a 2019, no qual encontraram uma taxa de 86,9% dos isolados susceptíveis a ceftazidima associado ao avibactam (KARLOWSKY et al., 2021). Portanto esses estudos corroboram com nossos resultados, mostrando que as cefalosporinas de terceira geração em combinação com inibidores de β -lactamases são uma boa opção terapêutica.

Não houve taxa de resistência, em nosso estudo, para o antimicrobiano colistina foi encontrado, entretanto, relatório emitido pela ANVISA (2021) aponta uma taxa de resistência de 25,2% deste antimicrobiano em cepas de *P. aeruginosa* isoladas da corrente sanguínea de pacientes internados em UTI adulta, indicando um alerta para os profissionais da

saúde. Esta diferença verificada pode, entretanto ser resultado de medidas efetivas na prevenção da disseminação de cepas resistentes no hospital universitário avaliado.

Com a finalidade de identificar a presença e prevalência dos genes que codificam β -lactamases no hospital universitário, analisamos 14 genes, em que o gene mais prevalente foi o *blaKPC* com 81,49% de positividade nos isolados. Estudo realizado por Hu e colaboradores (2021), pesquisando cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos isoladas de intestino, no período de 2014 a 2019, identificou a presença do gene *blaKPC-2* em 21,1% dos isolados. Do mesmo modo, um estudo coorte, prospectivo e observacional, realizado no período de 2018 a 2019, analisou 972 pacientes internados com infecção confirmada por *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos em 44 hospitais, incluindo 16 nos Estados Unidos, 10 na América do Sul e Central (Colômbia n=cinco, Chile n=dois, Argentina n=dois, Nicarágua n=um), nove na China, cinco na Austrália, dois em Cingapura, um no Líbano e um na Arábia Saudita, identificando a presença do gene *blaKPC-2* em 49% nos isolados, evidenciando a circulação desse gene que confere resistência aos carbapenêmicos em varios locais do mundo (REYES et al., 2023). Os carbapenêmicos tem o maior espectro de ação para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, por esse motivo o surgimento e propagação de carbapenemases tornou-se um grande problema de saúde pública. O nosso estudo detectou uma taxa bem acima dos estudos citados, pois utilizamos um iniciador *blaKPC* que detecta 19 variantes, ampliando a detecção dessa β -lactamase, em contraste com apenas uma variante que os estudos acima pesquisaram.

Para compreendermos a associação do fenótipo de resistência dos β -lactâmicos aos genes relacionados às β -lactamases, correlacionamos o fenótipo e o genótipo e encontramos associação estatística entre resistência a ceftazidima e cefepima com a presença dos genes *blaTEM* e *blaOXA-23-like*. Isto pode ser explicado pelo fato do gene *blaTEM* possuir diversas variantes que são ESBLs, capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta geração (CASTANHEIRA; SIMNER; BRADFORD, 2021). No caso, o nosso estudo utilizou iniciadores que possui a capacidade de detectar 167 variantes do gene *blaTEM*, no qual muitas destas variantes são ESBLs. Em relação ao gene *blaOXA-23-like*, que codifica uma enzima capaz de hidrolizar todas as cefalosporinas e carbapenêmicos (EVANS; AMYES, 2014; KAITANY et al., 2013), foi a primeira carbapenemase de classe D a ser descoberta em uma cepa de *Acinetobacter baumannii*, em 1985, coincidentemente no mesmo ano em que o imipenem foi aprovado para o uso clínico (LYON , 1985). Os genes pertencentes ao grupo *blaOXA-23-like* podem ser transmitidos por plasmídeos entre espécies, em que estudos tem

detectado o papel de plasmídeos e transposons na disseminação do gene *blaOXA-23* e este já foi encontrado em muitas espécies de *Acinetobacter*, *P. aeruginosa*, bem como em espécies pertencentes às *Enterobacteriaceae* (DIAS et al., 2016; EVANS; AMYES, 2014; LIU et al., 2015; ZONG et al., 2020).

A presença do gene *blaTEM* também obteve associação a resistência aos carbapenêmicos, imipenem e meropenem, não há na literatura informações prévias que corroborem esse resultado em *P. aeruginosa*. Contudo, um estudo realizado por Han e colaboradores (2017), analisando cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos em um hospital universitário na China, encontraram associação da presença do gene *blaTEM* e *blaOXA-23-like* com o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos. Uma pesquisa realizada em um hospital Iraniano, no período de 2015 a 2017, isolaram cepas de *P.aeruginosa* resistentes de pacientes com infecções nosocomiais e não-nosocomiais e identificou a presença do gene *blaOXA-23* em 11,19% dos isolados (ROUHI; RAMAZANZADEH, 2018), evidenciando a circulação do gene do grupo OXA em outras espécies não *Acinetobacter*, hipotetizamos que em *P. aeruginosa* esse padrão de associação possa existir, pois ambos os patógenos são Gram-negativos não fermentadores, e esses genes podem ser transferidos através de conjugação por plasmídeos entre os Gram-negativos.

Por fim, a presença do gene *blaOXA-51-like* foi associado a resistência ao meropenem. O *blaOXA-51-like* codifica uma carbapenemase pertencente a classe D de Ambler, que são enzimas intrínsecas ao *A. baumannii* e são encontradas naturalmente no cromossomo dessa espécie (EVANS; AMYES, 2014), contudo, em 2009, Lee e colaboradores relataram a presença do gene *blaOXA-51* em uma espécie não *Acinetobacter*, no qual eles identificaram este gene com uma inserção ISAbal, que foi codificado por plasmídeo e as sequências circundantes sugeriram que sua origem era de *A. Baumannii*. Nesse estudo a enzima codificada pelo *blaOXA-51* teve a capacidade de aumentar em até 256 vezes a concentração inibitória mínima (MIC) do meropenem, conferindo assim resistência ao mesmo (LEE, et al., 2009). Contudo, há apenas um estudo na literatura que reporta a presença do gene *blaOXA-51* em cepas de *P. aeruginosa*, no qual foram isoladas de pacientes ambulatoriais no Maranhão, Brasil (NITZ, et al., 2021). Esses estudos demonstram a dispersão do gene *blaOXA-51* para além de cepas de *A. baumannii*, em que esse gene era tido como um marcador para estas espécies.

Com relação à presença das bombas de efluxo da família Mex nos isolados de *P. aeruginosa*, nosso estudo apresentou uma positividade de 96,3% para o gene que codifica a

bomba MexCD e uma positividade de 100% para o restante das bombas Mex testadas. Não houve associação estatística das bombas de efluxo em relação ao fenótipo de resistência devido à alta positividade nos isolados, mas estudos tem evidenciado que as bombas de efluxo em *P. aeruginosa* estão entre um dos principais mecanismos de resistência que levam ao surgimento de cepas MDR e XDR. Este mecanismo primário de resistência é responsável por reduzir a concentração intracelular do fármaco a uma concentração subinibitória na qual outros mecanismos de resistência para classes específicas podem evoluir e ser selecionados, aumentando a resistência antimicrobiana (LORUSSO, et al., 2022; OLIVEIRA, et al., 2020).

O presente estudo apresentou algumas limitações, tais como: não foram incluídas no estudo cepas de *P. aeruginosa* susceptíveis para uma análise epidemiológica mais detalhada, não foi realizada pesquisa para a existência de clones de *P. aeruginosa* circulantes na UTI, não foi realizado sequenciamento dos controles positivos para uma validação mais precisa de todas as variantes que o nosso método se propõe detectar e os isolados não foram testados para todos os antimicrobianos de uma forma homogênea devido a implicações e condutas clínicas adotadas pelo hospital analisado no estudo. Contudo, nosso trabalho inovou na utilização de iniciadores que pudessem detectar uma maior quantidade de genes codificadores de β -lactamases, ampliando assim o diagnóstico dos mesmos.

7. CONCLUSÃO

- Os isolados de *P. aeruginosa* resistentes a pelo menos um antimicrobiano que foram coletados de pacientes internados na UTI do hospital universitário, apresentou uma prevalência de 20,9% em relação as demais bactérias Gram-negativas isoladas.
- A *P. aeruginosa* mostrou uma alta taxa de resistência a cefalosporinas de terceira e quarta geração, bem como aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Contudo, essas cepas apresentaram 100% de susceptibilidade a cefalosporinas de terceira geração combinadas com os inibidores avibactam ou tazobactam, mostrando uma boa opção terapêutica para essas infecções.
- Foram detectadas cepas de *P. aeruginosa* MDR (61,1%) e XDR (46,2%), evidenciando a problemática de disseminação de bactérias resistentes a vários antimicrobianos causadoras de graves infecções hospitalares.
- Foram desenvolvidos iniciadores para qPCR, capazes de identificar várias variantes de cada gene de resistência relacionados a β -lactamases analisados, ampliando a detecção dessas variantes que estão circulantes.
- Detectamos uma alta taxa de positividade de isolados de *P. aeruginosa* para o gene *blaKPC* (81,49%) que codifica enzimas carbapenemases e para os genes dos grupos CTX-M, que codificam β -lactamases de espectro estendido. Foi detectado o gene *blaOXA-51-like* nos isolados de *P. aeruginosa*, no qual até o momento há apenas um relato pela literatura da presença desse gene em *P. aeruginosa*.
- Houve associação entre a presença dos genes *blaTEM* e resistência a ceftazidima, cefepima, ao imipenem e meropenem, do gene *blaOXA-23* e resistência a ceftazidima e cefepima e do gene *blaOXA-51* e resistência ao meropenem. Conclui-se que as cepas de *P. aeruginosa* isoladas neste estudo possuem um arsenal de genes codificadores de β -lactamases capazes de induzir padrões fenotípicos de resistência a vários antimicrobianos comumente utilizados para essas infecções, dificultando o tratamento para o paciente.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, n. 3713, 1940.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Investigação e Controle de Bactérias Multirresistentes. Rede Nacional Para Investigação de Surto e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (RENISS). Brasília: ANVISA, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). REDE NACIONAL DE MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA MICROBIANA EM SERVIÇOS DE SAÚDE - REDE RM. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM. Ano III – Edição nº 1, Brasília: ANVISA, 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). REDE NACIONAL DE MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA MICROBIANA EM SERVIÇOS DE SAÚDE Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 28 - Avaliação Nacional dos indicadores de IRAS e RM, Brasília: ANVISA, 2021.
- AMARAL, MVF et al. Prevalência de microorganismos multirresistentes em um hospital universitário - análise de uma série histórica. In: II Congresso Brasileiro de Medicina Hospitalar - II CBMH. **Blucher Medical Proceedings**, v 1, n 5, p.70, 2014.
- AMBLER, RP. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v.289, p.321–331, 1980.
- ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, **Lancet**, v.399, n.10325, p.629-655, 2022.
- BABIC, M.; HUJER AM.; BONOMO RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. **Drug Resist Update**. v.9, p.142–156, 200.
- BABICH, T. et al., Ceftazidime, Carbapenems, or Piperacillin-tazobactam as Single Definitive Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: A Multisite Retrospective Study. **Clin Infect Dis.**, v.70, n.11, p.2270-2280, 2020.
- BABINCHAK, T. et al. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of complicated intra-abdominal infections: analysis of pooled clinical trial data. **Clin Infect Dis**. v.41, n. 5, p.S354–S367, 2005.
- BAJAJ P, SINGH NS, VIRDI JS. *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. **Front Microbiol**. v. 30, p. 7-417, 2016.
- BASSETTI M.; PEGHIN M. How to manage KPC infections. **Ther Adv Infect Dis**. May v.14, n.7, 2020.

- BAUER, G. et al. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA. **J Antimicrob Chemother**, v.53, p.592–599, 2004.
- BAUM, EZ. et al. Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.393, p.2785–2790, 2009.
- BECKER, B.; COOPER, M.A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Chem Biol**. v.8, n.1, p.105-15, 2013.
- BEN-AMI, R. et al. Influx of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. **Clin Infect Dis**. v.42, p.925–934, 2006.
- BLUMER, J.L. et al. Ceftazidime therapy in patients with cystic fibrosis and multiply-drug resistant *Pseudomonas*. **Am J Med**. v.79, n 2A, p.37–46, 1985.
- BO G. Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins. **Clin Microbiol Infect**. v.6, n. 3, p.6–9, 2000.
- BONOMO, R.A., et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. **Clin Infect Dis**. v.66, n.8, p.1290-1297, 2018.
- BOTELHO, J.; GROSSO, F.; PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution, **Drug Resistance Updates**, v. 44, p.26–47, 2019.
- BRADFORD, P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, 2001.
- BRATU, S. et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. **Arch Intern Med**. v.165, p.1430–1435, 2005.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.969–976, 2010.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**. v.39, p.1211–1233, 1995.
- BUSH, K.; BRADFORD, P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v.6, n.8, p.a025247, 2016.
- CAI, Y. et al. Prevalence of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Among Adult Inpatients in Singapore Acute-Care Hospitals: Results From the First National Point Prevalence Survey. **Clin Infect Dis**. v.64, n. 2, p.S61–S67, 2017.
- CARVALHO, MR. et al. Incidência de bactérias multirresistentes em uma unidade de terapia intensiva. **Revista Interdisciplinar**, v.8, n.2, p. 75-85, 2015.
- CASTANHEIRA, M. et al. Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* *Acinetobacter calcoaceticus* complex and

Enterobacteriaceae isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel β -lactamases, GES-22 and VIM-35. **Antimicrob Agents Chemother** v.58, p.7358–66, 2014.

CASTANHEIRA, M.; SIMNER, P.; BRADFORD, P. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. **JAC Antimicrob Resist**, v. 16, n. 3, p.1-21, 2021.

CAVALLO, JD. et al. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. **J Antimicrob Chemother** v.59, p.1021–1024, 2007.

CHAIN, E. et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. **Lancet**. v.2, p.226–231, 1940.

CHAMBERS, J. R., Cherny, K. E. & Sauer, K. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* dispersed cells to antimicrobial agents is dependent on the dispersion cue and class of the antimicrobial agent used. **Antimicrob. Agents Chemother**. v.61, p. 1–18, 2017.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Ver**, v.65, p.232–260, 2001.

CHOU, C.H. et al. Long-Term Surveillance of Antibiotic Prescriptions and the Prevalence of Antimicrobial Resistance in Non-Fermenting Gram-Negative Bacilli. **Microorganisms**, 2020.

CRAIG, W.A. Optimizing aminoglycoside use. **Crit Care Clin**. v.27, n.1, p.107-21, 2011.

DANTAS, G. et al., Bacteria subsisting on antibiotics. **Science**. v. 320, p. 100-103, 2008.

DARTOIS, N. et al. Tigecycline versus levofloxacin for the treatment of community-acquired pneumonia: European experience. **J Chemother**. v.20, n. 1, p.28–35, 2008.

D’COSTA VM et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**. 477:457-461, 2011.

DE CAMPOS, M.J.C.; ANTUNES, L.C.; FERREIRA, R.B. Global priority pathogens: Virulence, antimicrobial resistance and prospective treatment options. **Future Microbiol**. v.15, p. 649–677, 2020.

DEAN, CR. et al. Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Antimicrob Agents Chemother** v.47, p.972–978, 2003.

DIAS, V.C. et al. Epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility among carbapenem-resistant non-fermenting bacteria in Brazil. **J Infect Dev Ctries**. v.10, n.6, p.544–53, 2016.

DOWZICKY MJ, Park CH. Update on antimicrobial susceptibility rates among gram-negative and gram-positive organisms in the United States: results from the tigecycline evaluation and surveillance trial (TEST) 2005 to 2007. **Clin Ther.**, v.30, p.2040–20500, 2008.

DRAWZ, SM.; PAPP-WALLACE, KM.; BONOMO, RA. New β -lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 58, p.1835–1846, 2014.

DRLICA, K.; Zhao, XL. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiol Rev.** v.61, p.377–392, 1997.

DUNPHY LJ et al. Multidimensional Clinical Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* Reveals Complex Relationships between Isolate Source, Morphology, and Antimicrobial Resistance. **mSphere.** v. 6, n. 4, p. e0039321, 2021.

DUPONT, P. et al. Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother** v.55, p.518–522, 2005.

EDELSTEIN, MV., et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. **Lancet Infect Dis**, v. 13, p. 867–76, 2013.

ELIOPOULOS, C.T.; ELIOPOULOS, G.M. Activity in vitro of the quinolones. In: Hooper DC, Rubinstein E, eds. Quinolone Antimicrobial Agents. Washington, **American Society for Microbiology Press**, p.91–111, 2003.

ELLIS-GROSSE, E.J. et al. The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam. **Clin Infect Dis** v.41, n. 5, p.S34,1–S353, 2005.

EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC), Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2016.

EVANS, BA.; AMYES, SG. OXA β -lactamases. **Clin Microbiol Rev.** v.27, n.2, p.241-63, 2014.

FLEECE, ME. Et al. Molecular diagnosis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Expert Rev Mol Diagn**, v.18, n. 3, p.207-217, 2018.

FOURNIER, D. et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, V.68, p.1772–1780, 2013.

FREIFELD, A.G. et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.52, p.e56–e93, 2011.

GALES, A.C.; SADER, HS.; FRITSCHKE, T.R. Tigecycline activity tested against 11808 bacterial pathogens recently collected from US medical centers. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.60, p.421–427, 2008.

GUPTA N, et al. Carbapenem resistant enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. **Clin Infect Dis.** v.53, p.60–67, 2011.

- Haidar, G. et al. Ceftolozane tazobactam for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: clinical effectiveness and evolution of resistance. **Clin Infect Dis.** v. 65, p. 110–120, 2017.
- HAN, L et al. blaOXA-23-like and blaTEM rather than blaOXA-51-like contributed to a high level of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* strains from a teaching hospital in Xi'an, China. **Medicine (Baltimore)**,v. 96, n. 48, p.e8965, 2017.
- HAN, R. et al. China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) Study Group. Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated From Adult and Children Patients in China. **Front Cell Infect Microbiol.** v.10, p.314, 2020.
- HOEK, AHV. et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Front Microbiol.** v.28, n.2, p.20-3, 2011.
- HU, Y. et al. Prevalence, Risk Factors, and Molecular Epidemiology of Intestinal Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Spectr.** v.9, n.3, p.e0134421, 2021.
- HUMENIUK, C. et al. β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrob Agents Chemother.** v.46, p.3045–3049, 2002.
- JACOBY, G.A.; MUNOZ-PRICE, S.L. The new β -lactamases. **N Engl J Med.** v.352, p.380–39, 2005.
- JÁCOME, P.R. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v.56, n.9, p.4990, 2012.
- JAWETZ; MELNICK & ADELBERG'S, Medical Microbiology, **LANGE**, 28^a Ed., 2020.
- JIMENEZ, P.N. et al. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.76, p.46–65, 2012.
- JOHNSON, J.R. et al. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. **Clin Infect Dis.** 2010;51:286–294.
- JONES, RN.; FRITSCHÉ, TR.; SADER, HS. Antimicrobial activity of DC-159a, a new fluoroquinolone, against 1,149 recently collected clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother.** v.52, p.3763–3775, 2008.
- JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. **Int. J. Mol. Sci.** v.22, p.3128, 2021.
- KAITANY, KC. et al. Structures of the class D carbapenemases OXA-23 and OXA-146: mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins and aztreonam. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.57, p.4848–4855, 2013.
- KARAKONSTANTIS, S.; KRITSOTAKIS, EI.; GIKAS, A. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides,

polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. **Infection**. v.48, n.6, p.835-851, 2020.

KATZUNG; MASTERS; TREVOR, Farmacología básica e clínica, 12ªed., LANGE, Porto alegre: AMGH, 2014.

KARLOWSKY, JA. et al. In vitro activity of ceftazidime-avibactam against Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in Latin America as part of the ATLAS global surveillance program, 2017-2019. **Braz J Infect Dis**. v.25, n.6, p.101647, 2021.

KIM T., et al. Natural prognosis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients who did not receive appropriate antibiotic treatment: A retrospective multicenter study in Korea, **Medicine** v. 97, n.43, p. e12984, 2018.

KNOTHE, H. et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**. v.11, p.315–317, 1983.

LI, X-Z.; LIVERMORE, DM.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrob Agents Chemother** v.38, p.1732–1741, 1994.

LI, X-Z. et al. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to β -lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemother** v.38, p.1742–1752, 1994.

LI, X-Z.; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** v.39, p.1948-1953, 1995.

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

LI, X-Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. **Drugs** v.69, p.1555–1623, 2009.

LI, XZ.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Rev**. v. 28, n. 2, p.337-418, 2015.

LIAKOPOULOS, A.; MEVIUS, D.; CECCARELLI, D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. **Front. Microbiol**. v.7, p.1374, 2016.

LIU, LL. et al. Dissemination of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. in China: main roles of conjugative plasmid pAZJ221 and transposon Tn2009. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 59, n.4, p.1998-2005, 2015.

LEE, YT. et al. First identification of blaOXA-51-like in non-baumannii *Acinetobacter* spp. **J Chemother**. v.21, n.5, p.514-20, 2009.

- LEFON-GUIBOUT, V. et al. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of *bla*TEM genes. **Antimicrob Agents Chemother.** v.44, p.2709–2714, 2000.
- LESHER, GY. et al. 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **J Med Chem.** v.5, n.5, p.1063–1065, 1962.
- LV, L. et al. Emergence of a Plasmid-Encoded Resistance-Nodulation Division Efflux Pump Conferring Resistance to Multiple Drugs, Including Tigecycline, in *Klebsiella pneumoniae*. **mBio**, v.11, p.e02930-19, 2020.
- LYON, J.A. Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic. **Drug Intell. Clin. Pharm.** v. 19, p.895– 899, 1985.
- LÓPEZ-CALLEJA, AI. et al., Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Spanish hospital. **Rev Esp Quimioter.** v.32, n.1, p.68-72, 2019.
- LORUSSO, AB. et al. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Mol Sci.** v.23, n.24, p.15779, 2022.
- MA, D. et al. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. **J Bacteriol** v.175, p.6299 –6313, 1993.
- MAGIORAKOS, AP. 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, n. 3, p.268-81, 2012.
- MANDELL; DOUGLAS; BENNETT'S, Principles and Practice of Infectious Diseases, 9^a ed., **Elsevier**, 2020.
- MASUDA, N.; Ohya, S. Cross-resistance to meropenem, cephems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** v.36, p.1847–1851, 1992.
- MCCHESENEY, EW. et al. Absorption, excretion, and metabolism of a new antibacterial agent, nalidixic acid. **Toxicol Appl Pharmacol.** v.6, p.292-309, 1964.
- MEDEIROS, AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. **Clin Infect Dis.** v.24, p.S19–S45, 1997.
- MIGULA, W. **System der Bakterien:** Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien; Fischer: Jena, Germany, Volume 2, 1900.
- MINE, T. et al. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.43, n.2, p.415-7, 1999.
- MOYA, B. et al. Pan- β -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. **Antimicrob Agents Chemother** v.56, p.4771–4778, 2012.

- MORADALI, MF.; GHODS, S.; REHM, BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Front Cell Infect Microbiol.** v.15, p.7-39, 2017.
- MOSQUITO, S. et al. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. **Rev Peru Med Exp Salud Publica.** v.28, n.4, p. 648-56, 2011.
- MUNITA, JM. Et al. Multicenter evaluation of ceftolozane/tazobactam for serious infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis.** v. 65, p. 158–161, 2017.
- MURATA, T.; GOTOH, N.; NISHINO T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. **FEMS Microbiol Lett** v.217, p.57–63, 2002.
- MURRAY, PR.; ROSENTHAL, KS.; PFALLER, MA. 7ªEd., Microbiología Médica, ELSEVIER HS – EDUCATION, 2014.
- NAKAE, T. et al. Resistance to β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother** v.43, p.1301–1303, 1999.
- NAKAE, T.; SAITO, K.; NAKAJIMA, A. Effect of sulbactam on antipseudomonal activity of β -lactam antibiotics in cells producing various levels of the MexAB-OprM efflux pump and β -lactamase. **Microbiol Immunol** v.44, p.997–1001, 2000.
- NEU, H.C.; Chin, NX.; Labthavikul, P. The in vitro activity and β -lactamase stability of cefpirome (HR 810), a pyridine cephalosporin agent active against *staphylococci*, *Enterobacteriaceae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection.** v.13, p.146–155, 1985.
- NI, R. et al. The role of RND-type efflux pumps in multidrug-resistant mutants of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, v. 10, p.10876, 2020.
- NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrob Agents Chemother** v.33, p.831–1836, 1989.
- NIKAIDO, H. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. **J Bacteriol** 178:5853–5859, 1996.
- NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. **Semin Cell Dev Biol** 12:215–223, 2001.
- NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochim Biophys Acta** v.1794, p.769–78, 2009.
- NITZ, F. et al. Molecular Detection of Drug-Resistance Genes of *bla*_{OXA-23}-*bla*_{OXA-51} and *mcr-1* in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microorganisms.** v. 9, n.4, p. 786, 2021.
- NUNES, L.H.D.S. et al., *Pseudomonas aeruginosa* in tracheal aspirate: Colonization, infection, and recurrence. **Clin Respir J.** v.17, n.5, p.439-446, 2023.

- NÚÑEZ, L.E. et al. The biosynthetic gene cluster for the β -lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. **Chem Biol.** v.10, n.4, 2003.
- OLIVEIRA, W.K. et al. Resistome Analysis of Bloodstream Infection Bacterial Genomes Reveals a Specific Set of Proteins Involved in Antibiotic Resistance and Drug Efflux. **NAR Genom. Bioinforma.** v.2, p. lqaa055, 2020.
- OPAL, SM.; POP-VICAS A. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria, 2020.
- OZER, E. et al. An inside look at a biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* flagella biotracking. **Sci. Adv.** v.7, p.1–15, 2021.
- PALLERONI, N.J. et al. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.23, p.333–339, 1973.
- PALLERONI, N.J. The *Pseudomonas* story. **Environ. Microbiol.** v.12, p.1377–1383, 2010.
- PANKEY, G.A. Tigecycline. **J Antimicrob Chemother.** v.56, n.3, p.470-80, 2005.
- PARK, W.S. et al. Benzyl isothiocyanate attenuates inflammasome activation in *Pseudomonas aeruginosa* LPS-stimulated THP-1 cells and exerts regulation through the MAPKs/NF-kappaB pathway. **Int. J. Mol. Sci.** v.23, p.1–10, 2022.
- PATRO, LPP.; RATHINAVELA, N.T. Targeting the Sugary Armor of *Klebsiella* Species. **Front Cell Infect Microbiol.** v.8, n.9, p.367, 2019.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, MH.; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infect Genet Evol.** v.9, n.6, p.1132-47, 2009.
- PIDDOCK, LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev.** v.19, n.2, p.382-402, 2006.
- PITOUT, J.D.D.; LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum β -lactamase-producing *enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis.** v.8, p.159– 166, 2008.
- POOLE, et al., Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **J Bacteriol** v.175, p.7363–7372, 1993.
- QIN, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduct Target Ther.** v. 7, n.1, p.199, 2022.
- QUENNAN, A.M. et al. Interaction of ceftobiprole with β -lactamases from molecular classes A to D. **Antimicrob Agents Chemother.** v.51, p.3089–3095, 2007.
- REYES, J. et al., Antibacterial Resistance Leadership Group and Multi-Drug Resistant Organism Network Investigators. Global epidemiology and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and associated carbapenemases (POP): a prospective cohort study. **Lancet Microbe.** v.4, n.3, p.e159-e170, 2023.

- RICE, W.; CHIPPINDALE, A. Sexual recombination and the power of natural selection. **Science**. v.294, p.555-559, 2001.
- RIERA, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. **J Antimicrob Chemother** v.66, p.2022–2027, 2011.
- ROSSI, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. **Nat. Rev. Microbiol.** v.19, p.331–342, 2021.
- ROUHI, S.; RAMAZANZADEH, R. Prevalence of *bla*_{Oxacillinase-23} and *bla*_{Oxacillinase-24/40}-type Carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* Species Isolated From Patients With Nosocomial and Non-nosocomial Infections in the West of Iran. **Iran J Pathol.** v. 13, n. 3, p.348-356, 2018.
- SABNIS, A. et al. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. **Elife.** v.10, p.1–26, 2021.
- SADER, HS.; FARRELL, DJ.; CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial activity of ceftolozane/tazobactam tested against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* with various resistance patterns isolated in European hospital (2011-12). **J Antimicrob Chemother.** v. 69, p.2713–2722, 2014.
- SADER HS, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria from intensive care unit and non-intensive care unit patients from United States hospitals (2018-2020). **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.102, n. 1, p.115557, 2022.
- SANDERS, C.C. Cefepime: the next generation? **Clin Infect Dis.** v.17, n. 314, p.369–379, 1993.
- SANDERS, WE. Jr.; TENNEY, JH.; KESSLER, R.E. Efficacy of cefepime in the treatment of infections due to multiply resistant *Enterobacter* species. **Clin Infect Dis.** v.23, p.454–461, 1996.
- SANTOS IC, Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). **Infect Genet Evol.** v. 73, p. 411-415, 2019.
- SOUGAKOFF, W.; GOUSSARD, S.; COURVALIN, P. The TEM-3- lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. **FEMS Microbiol Lett.** v.56, p.343–348, 1988.
- SCHROETER J. Über einige durch Bakterien gebildete Pigmente. In Cohan F (ed), Beiträge zur Biologie der Pflanzen. J. U. Kern's Verlag, Breslau, Berlin, Germany, p 109 –126, 1872.
- SUGAWARA, et al., *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. **J Biol Chem** v.281, p.16220 –16229, 2006.
- SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology** v.146, n.10, p.2345–2350, 2000.

- TAFI FA, E. G.; ZANDI, H.; BARZEGAR, K. Mutations in *nalc* gene of Mex AB-OprM efflux pump in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds in Yazd, Iran. **Iran J Microbiol.** v.12, n.1, p.32-36, 2020.
- TANASEANU C, Bergallo C, Teglia O, et al. Integrated results of 2 phase 3 studies comparing tigecycline and levofloxacin in community-acquired pneumonia. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2008;61:329–338.
- TENOVER, FC.; NICOLAU, DP.; Gill, CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. **Emerg Microbes Infect.** v.11, n.1, p.811-814, 2022.
- ULU-KILIC, A et al. Increasing frequency of *Pseudomonas aeruginosa* infections during tigecycline use. **J Infect Dev Ctries.** v.9, n.3, p.309-12, 2015.
- URZEDO, JE. et al. High mortality by nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a referral hospital in Brazil: facing the perfect storm. **J Med Microbiol.** v.69, n.12, p.1388-1397, 2020.
- WALSH, TR. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev** v.18, p.306–25, 2005.
- WEINER-LASTINGER, LM. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 41, n. 1, p.1-18, 2020.
- WELDHAGEN, GF. Integrons and β -lactamases—a novel perspective on resistance. **Int J Antimicrob Agents.** v.23, p.556–562, 2004.
- WENTZELL, LM.; MAXWELL, A. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs on DNA forms a barrier to the T7 DNA polymerase replication complex. **J Mol Biol.** v.304, p.779–791, 2000.
- WESTBROCK-WADMAN, S. et al. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. **Antimicrob Agents Chemother** v.43, p.2975–2983, 1999.
- WHO. Media Center. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization: 27 Feb., 2017. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (Acesso em 19/07/2023).
- WINSTANLEY C, O'BRIEN S, BROCKHURST MA. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. **Trends Microbiol.** v.24, n.5, p.327-337, 2016.
- WRIGHT, GD.; BERGHUIS, AM.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside antibiotics: structures, functions, and resistance. In: Rosen BP, Mobashery S, eds. Resolving the Antibiotic Paradox: Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics. **New York: Plenum;** p.27–69, 1998.

- WUNDERINK, RG.; WATERER, G. Advances in the causes and management of community acquired pneumonia in adults. **BMJ**. v.358, p.j2471, 2017.
- YOON, EJ.; JEONG, SH. Class D b-lactamases. **J Antimicrob Chemother** v.76, p.836–64, 2020.
- ZEKA, N.A. et al. GES-type and OXA-23 carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. **J Antimicrob Chemother** v.69, p.1145–6, 2014.
- ZHANEL, GG. et al. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**. v.67, p.1027–1052, 2007.
- ZHANG, L.; LI, XZ.; POOLE, K. Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. **J Antimicrob Chemother** v.48, p.549 –552, 2001.
- ZONG, G. et al. The carbapenem resistance gene bla_{OXA-23} is disseminated by a conjugative plasmid containing the novel transposon Tn6681 in *Acinetobacter johnsonii* M19. **Antimicrob Resist Infect Control**. v. 9, n.1, p.182, 2020.

ANEXO A

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Matriz de cartões TaqMan e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas aplicadas ao controle e profilaxia de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil

Pesquisador: Aldo Ângelo Moreira Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03300218.2.3001.5045

Instituição Proponente: Hospital Universitário Walter Cantídio/ Universidade Federal do

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.276.113

Apresentação do Projeto:

Este estudo irá desenvolver e inovar novos métodos moleculares para o controle e combate em isolados amostrais de bactérias Gram-negativas (GNB) adquiridas na unidade de terapia intensiva (UTI) e resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas em uso no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil. Serão analisadas nesse estudo cepas de GNBs resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas, isoladas de pacientes internados na UTI clínica do HUWC, que apresentem quadro infeccioso em diferentes sítios e cujo agente etiológico envolvido seja identificado laboratorialmente. Serão incluídos 350 isolados bacterianos provenientes (Cépas de bactéria de cultura) de: 1) infecções de corrente sanguínea (hemocultura - HCU) e outros sítios de infecção considerados nobres, como líquidos cefalorraquidiano (LCR), pleural, peritoneal, pericárdio, sinovial, entre outros; 2) infecções do trato urinário; 3) cultura de secreções, como lavado bronco-alveolar, aspirado traqueal, escarro, fragmentos de pele, órgãos e ossos, drenagens e abscessos, ferida cirúrgica e outros sítios anatômicos que apresentem indícios de infecção quando avaliados pelo clínico; 4) culturas de swab retal para vigilância, sem infecção aparente.

Hipótese:

Postula-se que o desenvolvimento e inovação de novos métodos moleculares para a identificação,

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1290

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8589

Fax: (85)99267-4630

E-mail: cephuwo@huwc.ufc.br

**UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE**



Continuação do Parecer: 3.276.113

controle e combate de bactérias Gram-negativas (GNBs) adquiridas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) podem contribuir para uma identificação mais rápida e precisa de fenótipos de resistência para beta-lactâmicos e fluoroquinolonas em uso em hospitalar, tendo em vista a dificuldade de tratamento das infecções por isolados de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella* spp. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp.

O cronograma prevê início da análise geral dos dados para 06/01/2020 e término da análise de dados obtidos pelos ensaios LC-MS/MS para 24/12/2021. O orçamento é de R\$ R\$ 999.707,00, sendo de financiamento próprio que o pesquisador declara em carta de outubro de 2018, que é verba do seu próprio laboratório de pesquisa na unidade de pesquisa clínica& instituto de biomedicina da UFC.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Este estudo irá desenvolver e inovar novos métodos moleculares para o controle e combate em isolados amostrais de bactérias Gram-negativas (GNBs) adquiridas na unidade de terapia intensiva (UTI) e resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas em uso no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil.

Objetivos específicos:

- (a) avaliar tendências e padrões em isolados amostrais adquiridas na unidade de terapia intensiva (UTI) resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas causados por bactérias Gram-negativas (GNBs);
- (b) desenvolver plataforma de diagnóstico molecular utilizando a tecnologia TaqMan array card para o controle e combate às infecções por GNBs isoladas de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. identificando, simultaneamente, pelo menos 44 genes de resistências para os beta-lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenemas e fluoroquinolonas e;
- (c) identificar e quantificar as expressões das principais proteínas relacionadas aos mecanismos de resistências antimicrobianas, utilizando o método de cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas (LC-MS/MS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os isolados positivos que forem sendo identificado pelo HUWC serão utilizados para

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1290	
Bairro: Rodolfo Teófilo	CEP: 60.430-370
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8589	Fax: (85)99267-4630
	E-mail: cephuwo@huwc.ufc.br

**UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE**



Continuação do Parecer: 3.276.113

extração e isolamento do DNA genômico das cepas de GNBs. Há um risco que é comum a todas as pesquisas com seres humanos: o risco de quebra de sigilo. Obviamente os pesquisadores sempre garantem o sigilo e fazem tudo ao seu alcance para mantê-lo, mas não existe 100% dessa garantia. Desse modo a quebra de sigilo, ainda que involuntária e não intencional, é um risco que deve sempre ser reconhecido.

Benefícios: Os resultados inovadores deste projeto melhorarão os controles e combates às resistências aos antimicrobianos das infecções intra-hospitalares graves possibilitando atuações preventivas dessas colonizações e infecções em UTIs hospitalares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante pois espera-se para um futuro próximo, ter um produto desenvolvido para o diagnóstico de microrganismos multirresistentes que auxiliará de maneira sensível, acurada e rápida (2,5 horas) e de forma simultânea o diagnóstico de pelo menos 48 genes de resistência mais importantes relacionados às bactérias Gram negativas que causam infecções hospitalares. No qual, esta técnica poderá ser usada na vigilância contínua das cepas de resistência de qualquer outro hospital e indicar aos Comitês de Controle de Infecções Hospitalares quais genes de resistência mais comuns e, com isso, tentar diminuir o impacto negativo da resistência antimicrobiana e do uso errôneo dos antimicrobianos e, obviamente, diminuir custos e direcionar aos médicos locais qual o melhor tratamento para os pacientes. Vale salientar que após o desenvolvimento inicial desta placa TaqMan, se houver a necessidade de incorporar novos genes de resistência teríamos com facilidade a possibilidade de substituir ou incorporar novos genes caso seja necessário, dando a este produto uma característica mutável de acordo com as mudanças clonais das cepas isoladas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo se encontra adequado, do ponto de vista ético.

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1290	
Bairro: Rodolfo Teófilo	CEP: 60.430-370
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8589	Fax: (85)99267-4630 E-mail: cephuwo@huwc.ufc.br

**UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE**



Continuação do Parecer: 3.276.113

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar a este CEP/HUWC, relatórios parciais (ao final do do desenvolvimento de cada ano de pesquisa) e final (após a conclusão do estudo).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1297463.pdf	11/03/2019 15:14:44		Aceito
Outros	Ciencia_Chefe_Responsavel_Pelo_LAB_HUWC.pdf	11/03/2019 15:13:38	Aldo Ângelo Moreira Lima	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_Gerente_Ensino_HUWC.pdf	19/02/2019 17:00:17	Aldo Ângelo Moreira Lima	Aceito
Outros	2019_Carta_Resposta_Parecer_CONEP_3066386.pdf	28/01/2019 15:54:30	Aldo Ângelo Moreira Lima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TAQMan_Projeto_Resistencia_Antimicrobianos_Nov2018_ALTERADO.pdf	21/11/2018 15:58:49	Aldo Ângelo Moreira Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Isencao_TCLE.pdf	18/10/2018 15:23:33	Aldo Ângelo Moreira Lima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TAQManProjetoOct18.pdf	18/10/2018 15:16:41	Aldo Ângelo Moreira Lima	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 22 de Abril de 2019

Assinado por:
Maria de Fatima de Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1290
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8589 **Fax:** (85)99267-4630 **E-mail:** cephuwo@huwc.ufc.br