

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp. e
Pseudomonas aeruginosa produtores de carbapenemases.**

Mayne de Oliveira Pereira

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp. e
Pseudomonas aeruginosa produtores de carbapenemases.**

Mayne de Oliveira Pereira

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P436c Pereira, Mayne de Oliveira
Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp.
e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de carbapenemases /
Mayne de Oliveira Pereira. -- São Paulo, 2017.
77p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Microbiologia clínica I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello,
orientador.

616.0756 CDD

Mayne de Oliveira Pereira

Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de carbapenemases.

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do título de DOUTOR.

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017.

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela FAPESP, Instituto Fleury e CAPES.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus pela força e inspiração.

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. **Jorge Luiz Mello Sampaio** pela oportunidade e também pela confiança depositada em mim. O senhor é uma grande inspiração, para mim, na área da docência.

Às queridas **Dona Márcia, Rose e Cláudia** por manter sempre o laboratório limpo e bem arrumado e também pela amizade.

À técnica, **Fabiana Teixeira**, pelo auxílio no projeto e pela amizade.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos amigos do laboratório de Microbiologia Clínica: **Bruna, Darlan, Elaine, Flávia, Juliana e Letícia**, pela sincera amizade, compreensão e ensinamentos fornecidos.

Ao **Instituto Fleury** por disponibilizar os isolados e pelo financiamento do projeto de pesquisa, sem os quais este estudo não seria possível. E as queridas **Fernanda, Juliana e Tatiane** pela amizade, compreensão e ajuda técnica.

Gostaria de agradecer à minha querida família.

Gostaria de registrar a minha imensa gratidão e amor aos meus pais **João Luiz Pereira** e **Roseli de Oliveira Pereira**. Se não fossem vocês nada disso seria possível, muito obrigada por apostarem sempre em mim, sempre me colocando em ótimos colégios, cursos e faculdade. Obrigada por me apoiarem em todas as minhas decisões, por me ajudarem sempre não só com conselhos, mas principalmente com exemplos. Um dia espero conseguir retribuir tudo isso. Gostaria de agradecer à minha irmã **Larissa** e minha doce e querida sobrinha **Lara Beatriz** pelo carinho. Amo vocês família.

Agradeço muito por ter tido a oportunidade de conviver e fazer parte da vida da minha querida madrinha **Sueli Person**. Não tenho palavras para descrever o que você é na minha vida e com certeza na vida de muitas pessoas e crianças.

Gostaria de agradecer ao meu noivo **Alexandre** pelo carinho, amor, compreensão e dedicação. Agradeço muito por você fazer parte da minha vida, Te Amo.

Gostaria de agradecer ao carinho que eu sempre recebi dos meus sogros **Ilza** e **Bartolomeu**, das minhas cunhadas **Jaqueline** e **Elizabete**, dos meus cunhados **Silvio** e **Fábio**, e dos meus queridos **Vitor** e **Mariana**.

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”
Charles Chaplin*

RESUMO

PEREIRA, M.O, **Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de carbapenemases.** Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A resistência bacteriana a antibióticos é um grave e crescente problema de saúde pública de âmbito mundial. O principal, e mais eficiente, mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos é a produção de β -lactamases, que possuem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico e conseqüentemente inativar essa classe de antibióticos. Vale ressaltar, que atualmente os antibióticos β -lactâmicos são os mais utilizados clinicamente, particularmente em infecções graves. Dentre as β -lactamases existentes destacam-se as carbapenemases, enzimas capazes de inativar a maioria dos antibióticos β -lactâmicos. Uma grande preocupação é o fato dessas enzimas, em sua maioria, serem codificadas por plasmídeos, o que propicia a disseminação desses genes de resistência; portanto, é de extrema importância a realização de um rápido e efetivo monitoramento da presença de patógenos portadores desses genes de resistência, para que assim se possa prevenir a disseminação desses determinantes. Foram incluídos neste estudo 230 amostras únicas de *Acinetobacter* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a imipenem detectados em pacientes internados em hospitais privados da cidade de São Paulo durante o período de fevereiro a outubro de 2013. As amostras foram avaliadas quanto à hidrólise de imipenem por espectrofotometria, quanto à presença de genes de carbapenemases por PCR e sequenciamento, e quanto à clonalidade por eletroforese em campos pulsados (PFGE) ou ERIC-PCR. Foram realizados ensaios de conjugação, transformação e sequenciamento completo de plasmídeos. Dentre as amostras de *Acinetobacter* spp. 80% (88) foram capazes de hidrolisar o imipenem. Dentre esses 76,1% (67) foram positivos para *bla*_{OXA-51-like}, 19,3% (17) foram positivos para *bla*_{OXA-72}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-482} e *bla*_{IMP-1} foram detectados isoladamente em isolados distintos. O gene *bla*_{IMP-1} foi detectado em *A. ursingii* inserido em integron de classe 1 e representa a primeira descrição no Brasil. Uma nova carbapenemase OXA-482-like foi detectada em *A. baumannii*. Utilizando-se ERIC-PCR, observou-se uma grande diversidade de grupos clonais, com o máximo de quatro isolados por grupo. Dentre as amostras de *P. aeruginosa*, apenas 35,3% foram capazes de hidrolisar o imipenem. Dessas amostras, 14 possuíam o gene *bla*_{SPM-1}, e isolados únicos possuíam, individualmente, os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC-2} ou *bla*_{GES-23}. O gene *bla*_{KPC-2} foi detectado inserido em contexto genético diferente dos descritos anteriormente, em plasmídeo IncU de 32 Kb, mobilizável, mas não conjugativo. Esta é a primeira descrição da sequência completa de plasmídeo albergando o gene *bla*_{KPC-2} em *P. aeruginosa* no Brasil. Nas demais amostras (20) com atividade hidrolítica, não foram detectados genes de carbapenemase conhecidos, o que sugere a presença de genes de carbapenemase ainda não descritos. Em três amostras foi possível obter transformantes com plasmídeos, resistentes a carbapenêmicos. As amostras com *bla*_{SPM-1} apresentaram perfis de PFGE estreitamente relacionados. Em contraste, os perfis de PFGE das amostras com potenciais novas carbapenemases apresentaram índice de similaridade de Dice inferior

a 80%, evidenciando grande diversidade clonal. Nossos achados evidenciam que a carbapenemase não intrínseca predominante em *Acinetobacter* em hospitais privados da cidade de São Paulo é OXA-72, e em hospitais privados há uma grande diversidade clonal. Em *P. aeruginosa*, a carbapenemase predominante é SPM-1, cuja disseminação é mediada por um único clone. Há potencialmente um número significativo de novas carbapenemases em *Acinetobacter* e *P. aeruginosa*, algumas delas mediadas por plasmídeos.

Palavras-chaves: Resistência antimicrobiana, carbapenemases, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., KPC-2, SPM-1, plasmídeos

ABSTRACT

PEREIRA, M.O. **Phenotypic and genotypic characterization of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.** Thesis (Doctoral) – School of Pharmacy, São Paulo University, São Paulo, 2017.

Bacterial resistance to antibiotics is a serious and growing public health problem worldwide. The main and most efficient mechanism of resistance to β -lactams in Gram-negative bacilli is the production of β -lactamases, which have the ability to hydrolyze the β -lactam ring and consequently inactivate this class of antibiotics. It is worth mentioning that currently β -lactam antibiotics are the most used clinically, particularly in severe infections. Among the existing β -lactamases, carbapenemases are capable of inactivating most β -lactam antibiotics. A major concern is that these enzymes are mostly encoded by plasmids, which facilitates the spread of these resistance genes; therefore, it is of extreme importance to carry out a rapid and effective monitoring of the presence of pathogens bearing these resistance genes, in order to prevent the dissemination of these determinants. This study included 230 unique samples of imipenem-resistant *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* detected in patients hospitalized in private hospitals in the city of São Paulo during the period from February to October 2013. The samples were evaluated for the imipenem hydrolysis by spectrophotometry, the presence of carbapenemase genes by PCR and sequencing, and concerning clonality by pulsed field electrophoresis (PFGE) or ERIC-PCR. Conjugation, transformation and complete sequencing of plasmids were performed. Among *Acinetobacter* spp. samples, 80% (88) were able to hydrolyze imipenem. Among these, 76.1% (67) were positive for *bla*_{OXA-51-like} genes and 19.3% (17) were positive for *bla*_{OXA-72}. The *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-482} and *bla*_{IMP-1} genes were detected alone in distinct isolates. The *bla*_{IMP-1} gene was detected in *A. ursingii* inserted in class 1 integron and represents the first description in Brazil. A novel OXA-482-like carbapenemase was detected in *A. baumannii*. Using ERIC-PCR, a great diversity of clonal groups was observed, with a maximum of four isolates per group. Among *P. aeruginosa* samples, only 35.3% were able to hydrolyze imipenem. Of these samples, 14 had the *bla*_{SPM-1} gene, and single isolates individually possessed the *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC-2} or *bla*_{GES-23} genes. The *bla*_{KPC-2} gene was found inserted in a genetic context different from those described previously, in a mobilizable, but not conjugative, 32 Kb IncU plasmid. This is the first description of the complete nucleotide sequence of a plasmid harboring the *bla*_{KPC-2} gene in *P. aeruginosa* in Brazil. In the remaining samples (20) with hydrolytic activity, no known carbapenemase genes were detected, suggesting the presence of carbapenemase genes not yet described. In three samples it was possible to obtain transformants with plasmids, resistant to carbapenems. Samples with *bla*_{SPM-1} showed closely related PFGE profiles. In contrast, the PFGE profiles of the samples with potential new carbapenemases showed Dice similarity index lower than 80%, evidencing a great clonal diversity. Our findings show that the predominant non-intrinsic carbapenemase in *Acinetobacter* in the city of São Paulo is OXA-72, and in private hospitals there is great clonal diversity. In *P. aeruginosa*, the predominant carbapenemase is SPM-1, the spread of this enzyme is mediated by a single clone.

There are potentially a significant number of new carbapenemases in *Acinetobacter* and *P. aeruginosa*, some of them plasmid mediated.

Keywords: Antimicrobial resistance, carbapenemases, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., KPC-2, SPM-1, plasmids.

Sumário

Resumo.....	viii
Abstract	x
I. Introdução.....	1
1. Antibióticos Carbapenêmicos.....	2
2. Resistência bacteriana.....	7
2.1 Mecanismos Enzimáticos: β -lactamases.....	7
3. Resistência antimicrobiana em bacilos Gram-negativos.....	15
3.1 Resistência antimicrobiana em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.2 Resistência antimicrobiana em <i>Acinetobacter</i> spp.....	23
II. Objetivos.....	27
1. Objetivo Geral.....	28
2. Objetivos Específicos.....	28
III. Material e Métodos.....	29
1. Isolados e Cepas de Referência.....	30
2. Padronização dos ensaios fenotípicos para detecção de carbapenemases - detecção da hidrólise enzimática por espectrofotômetro.....	30
3. Extração de DNA genômico pelo método de lise térmica.....	31
4. Detecção genotípica da produção de carbapenemases.....	31
5. Extração de DNA plasmidial.....	36
6. Preparação de bactérias competentes.....	37
7. Transformação por Eletroporação	37
8. Ensaio de Conjugação.....	38
9. Determinação do perfil de sensibilidade bacteriano.....	38
10. Determinação da clonalidade bacteriana por ERIC-PCR.....	39
11. Determinação da clonalidade bacteriana por Pulsed-Field (PFGE).....	40
12. Sequenciamento de plasmídeo – Illumina.....	41

IV. Resultados.....	43
1. Isolados clínicos.....	44
2. Detecção da Hidrólise Enzimática por Espectrofotômetro.....	46
3. Detecção genotípica da produção de carbapenemases.....	48
4. Avaliação da relação clonal.....	50
4.1 ERIC-PCR amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> com hidrólise positiva....	50
4.2 PFGE das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com hidrólise positiva e gene desconhecido.....	52
4.3 PFGE das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com o gene SPM-1....	53
5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com hidrólise positiva e PCR negativa.....	53
6. <i>Acinetobacter ursingii</i> (D8143399).....	55
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (D5170990).....	57
8. <i>Acinetobacter</i> complexo <i>baumannii</i> (D7292589) – OXA nova.....	60
V. Discussão.....	61
VI. Conclusões.....	69
VII. Referências Bibliográficas.....	71
VIII. Anexo.....	82

I. Introdução

1. Antibióticos Carbapenêmicos

O uso de agentes antimicrobianos na medicina, mais sistematizado a partir da segunda metade do século XX, reduziu significativamente complicações e mortes causadas por doenças infecciosas (KATTAN et al., 2008).

Mais da metade do arsenal de antibióticos disponíveis pertencem à classe dos β -lactâmicos (KATTAN et al., 2008), que são utilizados na prática clínica desde 1920. Esses fármacos normalmente são bem tolerados, e consistem na classe de antimicrobianos mais prescrita atualmente. São representantes dessa família as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos (BUSH, BRADFORD, 2016).

O anel β -lactâmico é a estrutura básica que caracteriza os antibióticos dessa classe, sendo composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio (PAPP-WALLACE et al., 2011). As penicilinas possuem um duplo anel no núcleo de sua estrutura que inclui o anel β -lactâmico e o anel tiazolidínico, o qual contém um átomo de enxofre (JAMES; GURK-TURNER, 2001), nos antibióticos carbapenêmicos esse átomo de enxofre foi substituído por um átomo de carbono, constituindo assim o anel carbapenêmico; na cadeia lateral (R_2) encontramos o grupo hidroxietil. Graças a essa estrutura os carbapenêmicos apresentam grande estabilidade frente às β -lactamases e também possuem um amplo espectro de ação (PAPP-WALLACE et al., 2011). A estrutura geral desses fármacos é mostrada na figura 1.

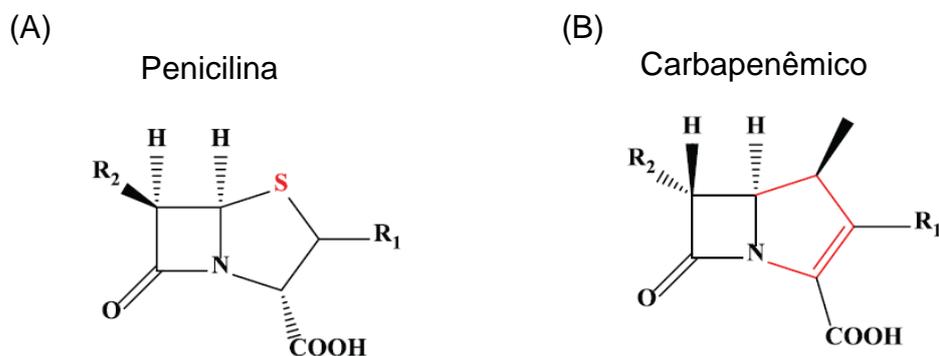


Figura 1 – Estrutura geral dos antibióticos da classe das penicilinas (A) e dos antibióticos carbapenêmicos (B). Figura adaptada da revisão PAPP-WALLACE et al., 2011.

Os antibióticos carbapenêmicos possuem o maior espectro de ação dentre os membros da família dos β -lactâmicos sendo, portanto considerados antibióticos de escolha para tratamento de quadros infecciosos graves e para o tratamento de patógenos que apresentam múltiplos mecanismos de resistência (PAPP-WALLACE et al., 2011).

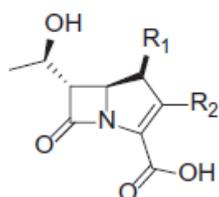
Os carbapenêmicos possuem o mesmo mecanismo de ação que os outros fármacos da classe dos β -lactâmicos, ou seja, são bactericidas, inibem a síntese da parede celular bacteriana. Resumidamente, esses compostos ligam-se às proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), que são enzimas que catalisam a formação do peptidoglicano da parede celular da bactéria, inativando-as. Sendo o processo de formação da parede celular bacteriana dinâmico, ou seja, ao mesmo tempo ocorre a formação e a autólise da parede, com a inibição das PBPs somente o processo de autólise permanece, ocasionando um enfraquecimento do peptidoglicano e a consequente morte bacteriana por lise osmótica (BUSH, BRADFORD, 2016; PAPP-WALLACE et al., 2011).

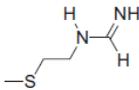
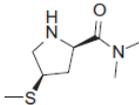
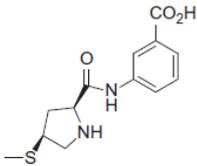
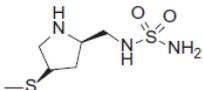
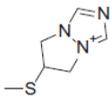
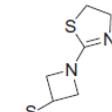
As PBPs são divididas em classes, de acordo com o seu peso molecular, em bactérias Gram-negativas são consideradas essenciais as PBPs 1a e 1b, PBP2 e PBP3, sendo que a morte bacteriana ocorre pela inibição de uma ou mais dessas proteínas (BUSH, BRADFORD, 2016). Um fator determinante para a elevada eficácia dos carbapenêmicos é a sua capacidade de se ligar em diferentes tipos de proteínas ligadoras de penicilinas, incluindo as consideradas essenciais (PAPP-WALLACE et al., 2011).

De modo geral, os carbapenêmicos ligam-se fortemente à PBP2 de Gram-negativos, podendo também se ligar à PBP1a, 1b e a PBP3, sendo que esse mecanismo adicional ajuda a diminuir a resistência associada a essa classe (BUSH, BRADFORD, 2016).

Os antibióticos carbapenêmicos que estão atualmente disponíveis na prática clínica são o imipenem combinado com a cilastatina, meropenem, ertapenem, doripenem, biapenem e tebipenem (BUSH, BRADFORD, 2016). A tabela 1 mostra a estrutura geral desses fármacos, sua data de aprovação e os locais onde são comercializados.

Tabela 1 – Carbapenêmicos atualmente utilizados na prática clínica (BUSH, BRADFORD, 2016).



Nome	R1	R2	Data de aprovação	Local
Imipenem	H		1985	Amplamente disponível
Meropenem	CH ₃		1996	Amplamente disponível
Ertapenem	CH ₃		2001	Amplamente disponível
Doripenem	CH ₃		2007	Amplamente disponível
Biapenem	CH ₃		2001	Apenas no Japão
Tebipenem	CH ₃		2009	Apenas no Japão

Os antibióticos carbapenêmicos são classificados em três grupos. O grupo 1 inclui os carbapenêmicos que possuem amplo espectro de ação, porém limitada atividade contra bacilos Gram-negativos não fermentadores, sendo mais apropriados para utilização em infecções simples. O ertapenem é o representante deste grupo. Vale ressaltar que este fármaco não tem atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* ou contra *Acinetobacter baumannii* (BRINK et al., 2004; KATTAN et al., 2008). Como vantagem, o ertapenem possui um tempo de meia-vida longo, podendo ser administrado apenas uma vez ao dia (BUSH, BRADFORD, 2016).

O grupo 2 é composto pelos fármacos que possuem amplo espectro de ação, com atividade contra os bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose, sendo adequados para utilização em infecções nosocomiais. Os representantes desse grupo são o imipenem, meropenem e doripenem (BRINK et al., 2004; KATTAN et al., 2008).

O imipenem foi o primeiro carbapenêmico a ser disponibilizado para o tratamento de infecções graves em 1985, apresenta alta afinidade pelas PBPs e estabilidade frente às β -lactamases, porém sofre inativação pela enzima renal desidropeptidase I (DHP-I) devendo, portanto ser administrado concomitantemente com a cilastatina sódica que é um inibidor da DHP-I (PAPP-WALLACE et al., 2011). Esse fármaco vem sendo amplamente utilizado em infecções causadas por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bacilos Gram-negativos não fermentadores e por bactérias anaeróbicas (BUSH, BRADFORD, 2016).

Posteriormente, com o intuito de se obter fármacos mais estáveis frente à DHP-I, foram desenvolvidos os carbapenêmicos que possuíam o radical metil em R1. Este radical protege a molécula contra a ação da DHP-I, dispensando assim a co-administração da cilastatina (BUSH, BRADFORD, 2016). Surgem nesse contexto o meropenem, ertapenem, doripenem, biapenem e tebipenem.

O meropenem, quando comparado ao imipenem, é de duas a quatro vezes mais potente contra Enterobactérias, apresenta a mesma ação contra *P. aeruginosa*; no entanto, contra bactérias Gram-positivas, é de duas a oito vezes menos potente. É o único carbapenêmico aprovado para casos de meningite (BUSH, BRADFORD, 2016).

Vale ressaltar que tanto o meropenem como o doripenem possuem uma excelente ação contra isolados de *P. aeruginosa* que apresentam perda de porinas (OprD), proteínas presentes na membrana externa de bactérias, cuja ausência afeta a permeabilidade aos antibióticos (BUSH, BRADFORD, 2016).

O biapenem e o tebipenem, até o momento, foram aprovados para uso apenas no Japão. O biapenem possui um espectro de ação semelhante ao meropenem e ao doripenem, o tebipenem apresenta uma boa biodisponibilidade oral, sendo indicado em infecções respiratórias pediátricas; no entanto, possui uma significativa perda de atividade contra *P. aeruginosa* (BUSH, BRADFORD, 2016).

O terceiro grupo dos antibióticos carbapenêmicos inclui os compostos com atividade contra o *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), como o PZ-601, que está em fase de desenvolvimento (KATTAN et al., 2008).

Interessantemente, os antibióticos carbapenêmicos apresentam uma dupla função. Além de inibirem as PBPs eles também possuem a capacidade de inibir certas β -lactamases (as não carbapenemases), mostrando assim uma grande vantagem para o tratamento de doenças infecciosas. No entanto, o constante aparecimento de cepas multirresistentes, principalmente aquelas produtoras de metalo- β -lactamases, continua a ser um grande desafio (PAPP-WALLACE et al., 2011).

O uso disseminado e por vezes abusivo desses medicamentos tem contribuído para a seleção de microrganismos multirresistentes e conseqüentemente para a redução significativa da eficácia dos principais antimicrobianos utilizados na prática clínica diária (*Center for Disease Control and Prevention – CDC, 2012*).

Desde 1960, a resistência antimicrobiana tem se tornado progressivamente mais complexa e um dos primeiros sinais foi a descoberta dos plasmídeos de resistência e a sua capacidade de transmissão por conjugação. Esse quadro agravou-se a partir da década de 1980, quando foram detectadas enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado e progressivamente foi detectada a sua disseminação em todo o mundo. Na primeira década do século XXI, observou-se a disseminação de carbapenemases do tipo KPC e NDM em diferentes continentes (*WHO Workshop on the Containment of Antimicrobial Resistance in Europe – WHO, 2004*).

Atualmente, a inativação dos antibióticos β -lactâmicos pela produção de β -lactamases é considerada a maior limitação no uso dessa classe no tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos (BUSH, 2013).

2. Resistência bacteriana

Os principais mecanismos de resistência bacteriana são:

- Alterações na permeabilidade da membrana externa, o que dificulta ou impede a entrada de fármacos no interior da bactéria;
- Hiperexpressão das bombas de efluxo, que secretam os antibióticos que penetraram no citoplasma bacteriano antes dos mesmos exercerem suas funções;
- Alteração do alvo do antibiótico, por mutações ou aquisição de material genético;
- Produção de enzimas capazes de degradar os antibióticos;

A produção de enzimas que degradam antimicrobianos é frequentemente codificada por elementos genéticos móveis como plasmídeos ou transpósons, propiciando assim a sua disseminação e aumento da frequência de infecções por isolados multirresistentes (TENOVER; 2006).

2.1 Mecanismos Enzimáticos: β -lactamases

A produção das β -lactamases foi um dos primeiros e mais eficientes mecanismos de resistência bacteriana descritos (BERTONCHELI; HORNER, 2008). Já foram identificadas, até o momento, mais de 1.300 variantes de β -lactamases (BUSH, 2013). Essas enzimas hidrolisam os anéis β -lactâmicos e consequentemente inativam essa classe de antibióticos (BERTONCHELI; HORNER, 2008).

Existem dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar os antibióticos β -lactâmicos: as serino- β -lactamases e as metalo- β -lactamases (DALMARCO, 2006). As serino- β -lactamases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, já as metalo- β -lactamases necessitam de cátions divalentes, normalmente o zinco, como co-fator para a reação de hidrólise do anel β -lactâmico (QUEENAN; BUSH, 2007; MENDES et al., 2006).

Essas enzimas foram classificadas por Ambler (1980) de acordo com suas estruturas primárias em quatro classes (A a D) e também por Bush-Jacoby-Medeiros (1995) por suas características funcionais, ficando divididas em quatro grandes grupos (1 – 4) e subgrupos (a – f) (BUSH; JACOBY, 2010).

As classes moleculares A, C e D são as serino- β -lactamases, já as metalo- β -lactamases são enzimas da classe B de Ambler e pertencem ao grupo 3 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (QUEENAN; BUSH, 2007; DALMARCO, 2006). A figura mostra um esquema da classificação das principais β -lactamases segundo as duas propostas:

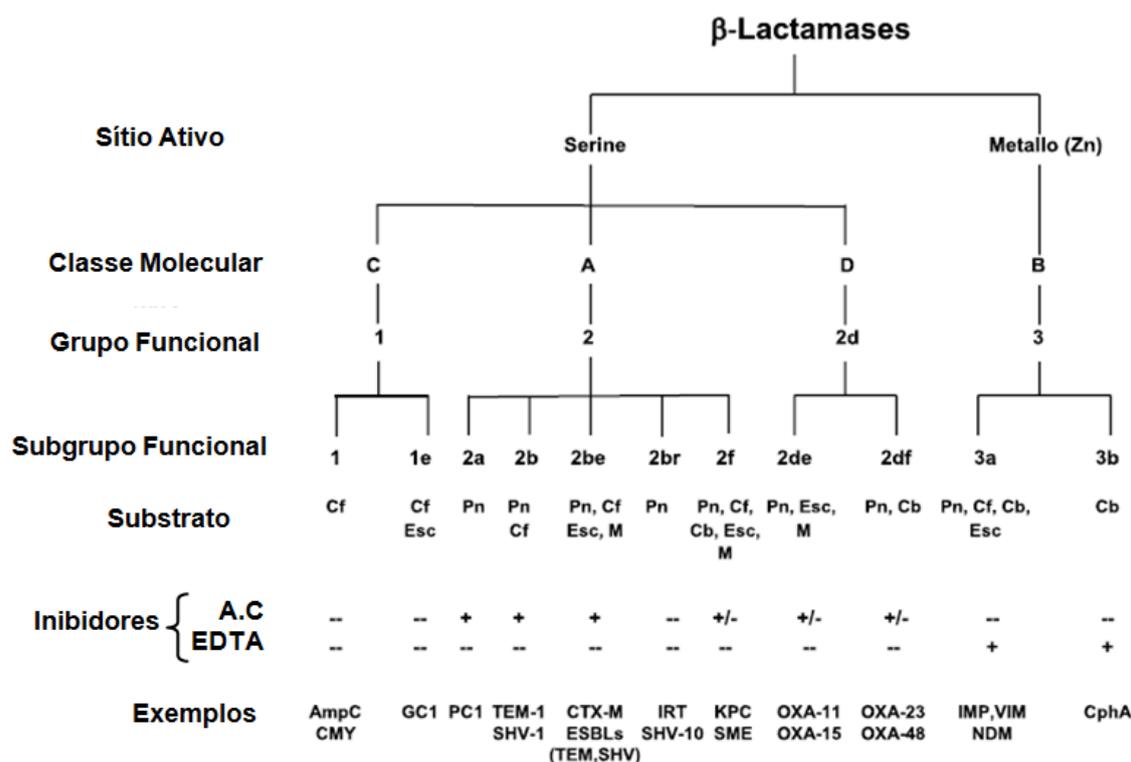


Figura 2 – Classificação molecular e funcional das principais β -lactamases. A classificação molecular foi proposta inicialmente por Ambler; O grupamento funcional das enzimas, com seu substrato e inibidor foi proposto por Bush em 1995, atualizado em 2010. (adaptado de BUSH, 2013). Abreviações: Cb, carbapenêmicos; Cf, cefalosporinas; A.C, ácido clavulânico; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; Esc, cefalosporinas de espectro ampliado; M, monobactam; Pn, penicilinas.

São representantes do grupo das serino- β -lactamases as famílias SME, KPC e GES. Pertencem à classe A de Ambler e possuem a capacidade de hidrolisar uma grande variedade de antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos,

cefalosporinas, penicilinas e o aztreonam, sendo, no entanto, inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. Vale ressaltar que KPC e GES são codificadas por genes localizados em plasmídeos o que propicia sua disseminação (QUEENAN; BUSH, 2007).

Outros dois importantes grupos que estão incluídos na classe A de Ambler e no subgrupo 2b de Bush-Jacoby-Medeiros são o da TEM e o da SHV. São β -lactamases que hidrolisam penicilinas e algumas cefalosporinas, sendo facilmente inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam (BUSH, 2010). Atualmente já foram descritas e identificadas 193 variantes do gene SHV e 223 variantes do gene TEM (<http://www.lahey.org/studies/>; acesso em 04 de junho de 2017). Substituições em aminoácidos das enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 deram origem à β -lactamases de espectro estendido (ESBL) que foram reunidas no subgrupo 2be, onde também são incluídas as enzimas CTX-M (BUSH, 2010).

Algumas variantes das enzimas TEM e SHV não são inibidas pelo ácido clavulânico, e são agrupadas no subgrupo 2br, sendo que o seu espectro de ação é o mesmo daquelas que sofrem inibição pelo clavulanato (BUSH, 2010).

A maioria das enzimas CTX-M hidrolisa cefotaxima, ceftazidima e cefepima e são inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam (BUSH, 2010).

Ainda pertencendo à classe A de Ambler encontramos as carbenicilinas de espectro estendido, CARB, enzimas que degradam o antibiótico carbenicilina o qual pertence ao grupo das ureidopenicilinas (BUSH, 2010).

As serino- β -lactamases, pertencentes à classe C de Ambler, também chamadas de cefalosporinases, são consideradas as β -lactamases mais abundantes devido ao grande número de bactérias que as produzem (BUSH, 2010). Geralmente, essas enzimas apresentam resistência à inibição feita pelo ácido clavulânico e apresentam alta afinidade pelo aztreonam. São representantes desse grupo as enzimas CMY, ACT, DHA, FOX, MIR e AmpC. O gene *ampC*, localizado no cromossomo bacteriano, pode ter sua expressão induzida por certos β -lactâmicos como a amoxicilina, ampicilina, imipenem e o ácido clavulânico (QUEENAN; BUSH, 2007).

A classe D das serino- β -lactamases é representada pela família OXA (QUEENAN; BUSH, 2007) sendo incluídas nos subgrupos 2d, 2de e 2df de Bush-

Jacoby-Medeiros (BUSH, 2010). Atualmente existem 498 variantes (<http://www.lahey.org/studies/>; acesso em 04 de junho de 2017).

As β -lactamases do grupo OXA possuem a capacidade de hidrolisar eficientemente os antibióticos oxacilina e cloxacilina, sendo fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e EDTA; são frequentemente encontradas em *Enterobacteriaceae* (QUEENAN; BUSH, 2007).

Essa classe de enzimas inclui algumas carbapenemases, ou seja, enzimas capazes de hidrolisar carbapenêmicos, sendo reunidas no subgrupo 2df. Essas carbapenemases são frequentemente encontradas em *Acinetobacter baumannii*; como exemplo desse subgrupo temos a OXA-23 e a OXA-48, enzimas codificadas por genes localizados em plasmídeos, que já foram identificadas em membros da família das Enterobactérias (BUSH, 2010). As oxacilinases contribuem significativamente para o perfil de resistência aos β -Lactâmicos em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (BUSH, 2013).

As metalo- β -lactamases possuem um amplo espectro de ação, sendo capazes de hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o aztreonam, um antibiótico da classe dos Monobactâmicos (MENDES et al., 2006). Essas enzimas são especialmente deletérias, pois são resistentes à ação dos inibidores clássicos das β -lactamases, como o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam e também aqueles que estão em estágio final de desenvolvimento (MENDES et al., 2006; BUSH, 2013). Essa classe de enzimas é inibida pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e por derivados do ácido tiolático (MENDES et al., 2006).

As metalo- β -lactamases podem ser produzidas intrinsecamente por determinados microrganismos ou os genes que as codificam podem estar inseridos em estruturas genéticas móveis, o que propicia a disseminação desses elementos de resistência bacteriana. Neste caso são conhecidas como metalo- β -lactamases móveis ou adquiridas (MENDES et al., 2006).

Até o momento, foram descritas as seguintes metalo- β -lactamases adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (German imipenemase), SIM (Seoul imipenemase), NDM (New

Delhi metalo- β -lactamase) e FIM (Firenze imipenemase) (MENDES et al., 2006; YONG et al., 2009; POLLINI et al., 2013).

A primeira descrição da metalo- β -lactamase IMP-1 adquirida foi em 1988, em uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* isolada no Japão, esse gene foi localizado em um integron de classe 1 de um plasmídeo conjugativo (HONG, 2015). Atualmente, existem 53 variantes pertencentes à subclasse IMP, sendo comumente encontradas em bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp (<http://www.lahey.org/studies/>; acesso em 04 de junho de 2017).

Em 1999, em amostras de *P. aeruginosa* isoladas em Verona, na Itália, foi descrita outra subclasse de metalo- β -lactamase adquirida, essa enzima foi denominada VIM-1 (LAURETI et al., 1999). Até o momento, foram relatadas 46 variantes dessa subclasse (<http://www.lahey.org/studies/>; acesso em 04 de junho de 2017), dessas 24 já foram reportadas em *P. aeruginosa*, a variante VIM-2 é a metalo- β -lactamase mais amplamente distribuída, sendo responsável por diversos surtos (HONG, 2015).

As metalo- β -lactamase IMP e VIM possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo atualmente detectadas por todo o mundo (QUEENAN; BUSH, 2007).

Em 1997 foi isolada outra subclasse de metalo- β -lactamase adquirida, em uma cepa de *P. aeruginosa* proveniente de um paciente de São Paulo que faleceu por choque séptico após tentativas de tratamento com ceftriaxona combinada com amicacina, ceftazidima e polimixina B. Essa enzima foi denominada SPM-1 (TOLEMAN et al.; 2002).

A enzima SPM-1, que antes só havia sido relatada no Brasil foi isolada na Europa, no ano de 2007, em uma cepa de *P. aeruginosa*, proveniente de um paciente suíço que iniciou seu tratamento no Brasil (SALABI et al.; 2009).

Atualmente, o gene *bla*_{SPM-1} possui grande prevalência em isolados de *P. aeruginosa*, sendo um dos grandes responsáveis pela alta taxa de resistência aos carbapenêmicos encontrada na América do Sul; vale ressaltar que essa taxa está entre as mais altas do mundo (HONG, 2015).

Posteriormente, na Alemanha foi encontrada uma nova subclasse de metalo- β -lactamase adquirida em cinco cepas de *P. aeruginosa*; essa nova subclasse de enzima recebeu o nome de GIM-1 (CASTANHEIRA et al., 2004; MENDES et al., 2006). Análises moleculares que comparam a composição e a sequência de aminoácidos dessa enzima com outras metalo- β -lactamase, como IMP e VIM, mostraram que elas possuem menos de 45% de semelhança, indicando assim que a enzima GIM pertence a um novo grupo filogenético. Essa enzima já foi identificada em outras espécies bacterianas como *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter freundii*; no entanto, até o momento não há relatos desse gene fora da Alemanha (HONG, 2015).

A sexta subclasse de metalo- β -lactamase descrita foi a NDM. Essa enzima foi inicialmente isolada em 2009, em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* provenientes de um paciente sueco que havia recebido tratamento médico em New Delhi, na Índia; por esse motivo a denominação New Delhi Metalo- β -lactamases (NDM-1). Sendo uma carbapenemase de amplo espectro, a enzima NDM possui a capacidade de hidrolisar praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, com exceção do aztreonam. No entanto, algumas cepas produtoras de NDM-1 também são capazes de inativar esse antibiótico, pois produzem concomitantemente β -lactamases como CTX-M, o que torna essas cepas resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos disponíveis atualmente para uso clínico (SHAKIL et al.; 2011).

O mapa abaixo mostra a distribuição mundial das principais metalo- β -lactamase.

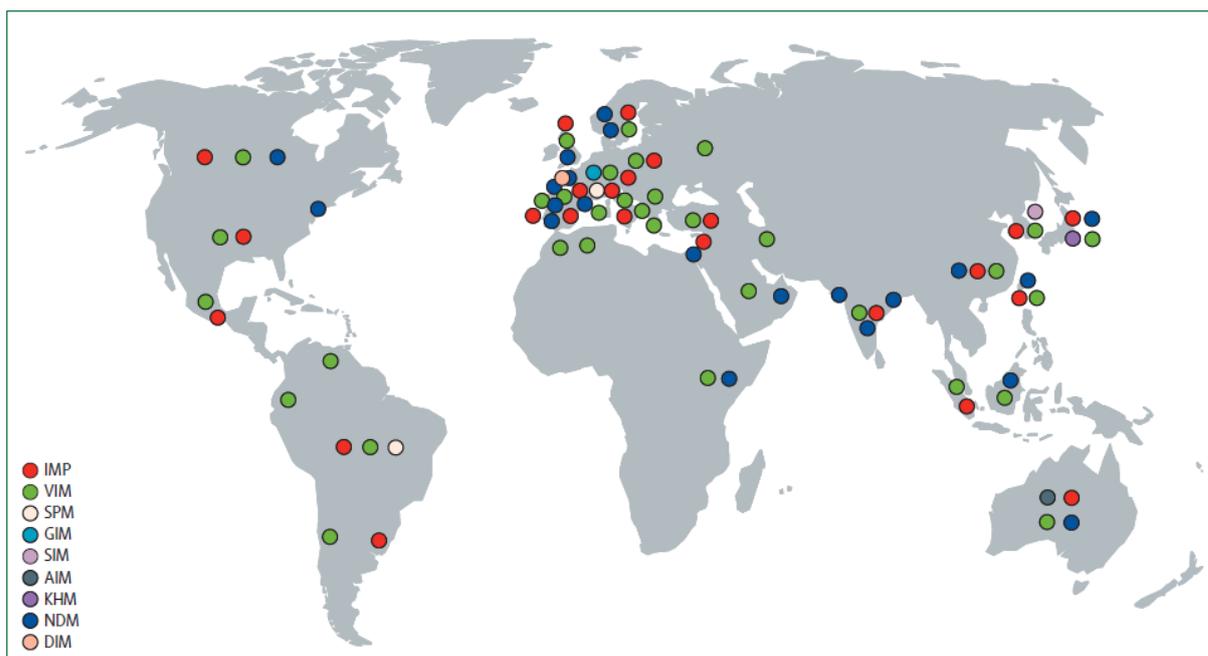


Figura 3 – Distribuição mundial dos diferentes tipos de metalo- β -lactamase. (CORNAGLIA et al., 2011).

Um estudo multicêntrico conduzido com amostras da China, cujo objetivo era investigar a prevalência do gene bla_{NDM-1} em bactérias Gram-negativas, identificou a presença deste gene em amostras de *Acinetobacter baumannii* de quatro diferentes províncias chinesas, sendo que essas amostras mostraram ser de diferentes perfis clonais. As amostras de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, testadas nesse estudo, não apresentaram resultado positivo para esta subclasse de enzima (CHEN et al.; 2011).

Os genes bla_{NDM} vem apresentando uma rápida e ampla disseminação. Pouco tempo após sua identificação na Índia, bactérias produtoras de NDM-1 foram reportadas nos Estados Unidos e Reino Unido. Em 2010, o Canadá, Japão e Oriente Médio também relataram seus primeiros casos de bactérias portadoras do gene bla_{NDM} . No ano de 2011, esse gene também foi encontrado em patógenos na Suíça (SHAKIL et al.; 2011).

Em *P. aeruginosa* esse gene foi isolado pela primeira vez em 2011, na Sérvia, posteriormente, em 2012, foi identificada em um paciente da França anteriormente internado na Sérvia, desde então, *P. aeruginosa* albergando o gene NDM-1 já foi isolada e identificada em diversas partes do mundo (HONG, 2015).

Em junho de 2011 a primeira variante do gene bla_{NDM-1} foi identificada, em um isolado de *A. baumannii* de um paciente proveniente do Egito, essa variante foi denominada de bla_{NDM-2} (KAASE et al.; 2011).

No Brasil, o primeiro relato do gene bla_{NDM-1} ocorreu em 2013, no Rio Grande do Sul, em *Providencia rettgeri* isolada de um fragmento de tecido de um paciente diabético que estava com uma infecção no pé, curiosamente esse paciente nunca viajou para fora do país e também não teve contato com pessoas que viajaram para fora do país (CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

Em 2014, o gene bla_{NDM} foi detectado em uma amostra de *Acinetobacter baumannii* isolada de um paciente idoso com infecção urinária, no Estado do Paraná. O gene foi detectado por PCR e o sequenciamento confirmou que se tratava da variante bla_{NDM-1} que estava presente em um plasmídeo de aproximadamente 100 kb (PILLONETTO et al., 2014).

Até o momento já foram identificadas 16 variantes do gene bla_{NDM-1} (<http://www.lahey.org/studies/>; acesso em 04 de junho de 2017), sendo que já foram reportados casos em quase todos os continentes (PILLONETTO et al., 2014), o mapa abaixo mostra a ampla disseminação do gene NDM pelo mundo.

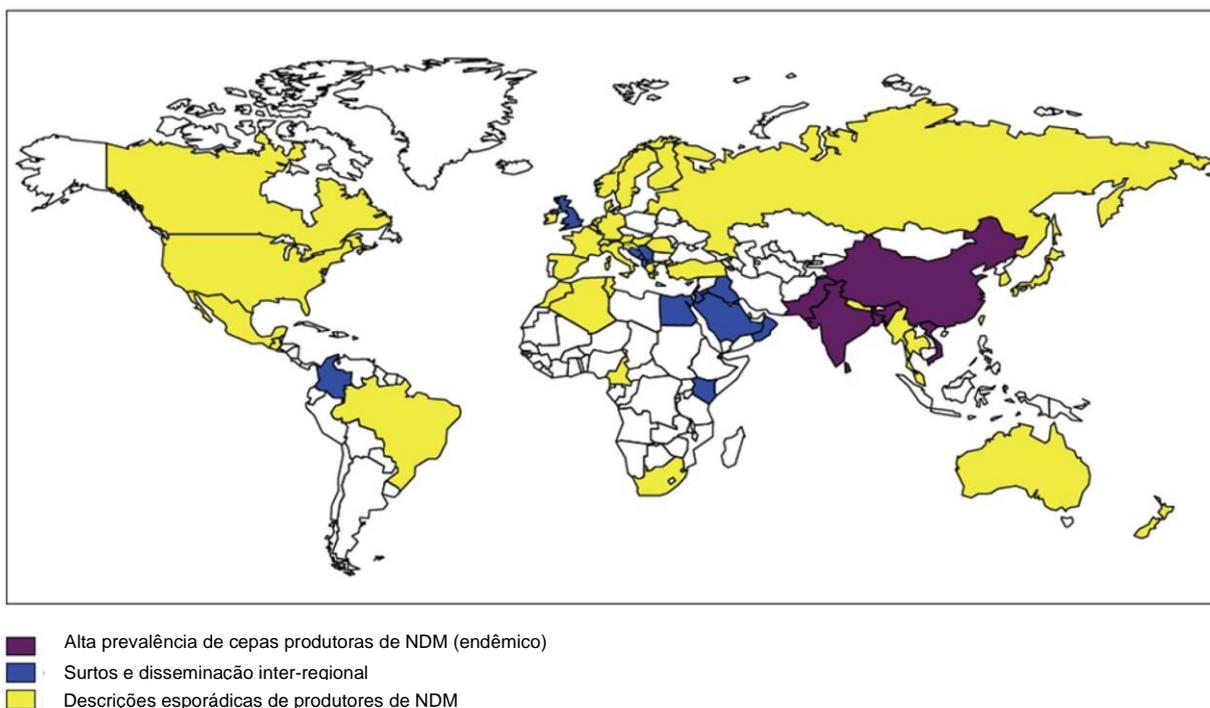


Figura 4 – Distribuição mundial de cepas produtoras de NDM. (ZMARLICKA et al., 2015).

Em 2012, uma nova metalo- β -lactamase foi identificada em *P. aeruginosa* na Firenze, Itália. Essa enzima apresenta similaridade com as enzimas NDM, com 40% de identidade entre as sequências de aminoácidos. O gene *bla_{FIM-1}* está localizado no cromossomo bacteriano associado a sequências de inserção (ISCR-19), o que propicia sua captura e mobilização (POLLINI et al., 2013).

3. Resistência antimicrobiana em bacilos Gram-negativos

Bactérias Gram-negativas caracterizam-se por possuírem uma complexa parede celular, constituída pela membrana citoplasmática, uma ou poucas camadas de peptidoglicano e pela membrana externa (LIVERMORE et al., 2012). A figura abaixo mostra a estrutura da parede celular de bacilos Gram-negativos.

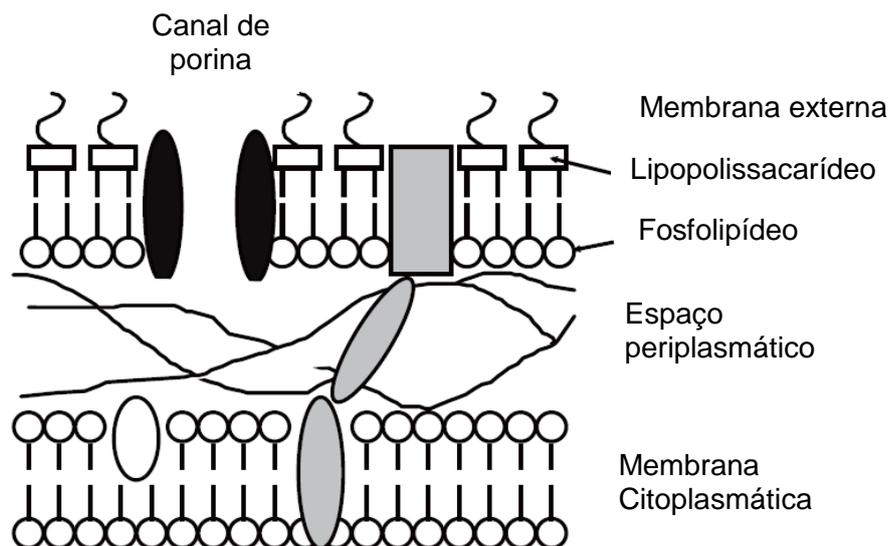


Figura 5 – Estrutura geral da parede celular de bacilos Gram-negativos. (Figura adaptada da revisão LIVERMORE et al., 2012).

A membrana externa dessas bactérias limita a entrada de moléculas grandes ou hidrofóbicas, o que diminui a permeabilidade de certos fármacos. Esse fato, associado à presença de enzimas β -lactamases e ao mecanismo de bombas de efluxo, tornam essas bactérias mais resistentes aos antimicrobianos do que as bactérias Gram-positivas, e também restringe o número de medicamentos eficazes contra esses patógenos (LIVERMORE, 2012). Vale ressaltar que a produção de β -

lactamases mostrou ser o mecanismo mais importante e eficiente de resistência, contra os antibióticos β -lactâmicos, apresentados por esses patógenos (BASSETTI et al., 2011).

Essa somatória de mecanismos resulta em cepas multirresistentes, sendo que alguns patógenos Gram-negativos mostram-se resistentes à maioria ou mesmo a todos os antibióticos atualmente disponíveis, estabelecendo-se o que chamamos de “crise de resistência a antibióticos”, que associado ao baixo ritmo de desenvolvimento de novos fármacos gera um grave problema de saúde pública que chama a atenção de autoridades mundiais (ROSSOLINI, 2014).

Os fármacos que ainda mostram alguma eficácia contra bactérias Gram-negativas multirresistentes são as polimixinas, a fosfomicina, a tigeclicina e os carbapenêmicos (BASSETTI et al., 2011; BERTONCHELI; HORNER, 2008).

Entre janeiro de 2008 e dezembro de 2010 bacilos Gram-negativos foram isolados de pacientes provenientes de centros médicos da América Latina (Argentina, Brasil, Chile e México) e incluídos no estudo SENTRY, programa de vigilância antimicrobiana. Os patógenos de maior prevalência foram *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (GALES; 2012).

Das cepas de *Acinetobacter*, 67,8% mostraram-se resistentes ao imipenem e 66,1% ao meropenem. Apenas 0,1% das cepas de *E. coli* foram resistentes ao imipenem e ao meropenem e 18,2% foram resistentes ao aztreonam. Dos isolados de *Klebsiella* 6,2% foram resistentes ao imipenem, 6,5% ao meropenem e 46,4% foram resistentes ao aztreonam. Das cepas de *P. aeruginosa*, 27,6% apresentaram resistência ao imipenem, 34,7% ao meropenem e 30,5% ao aztreonam (GALES; 2012).

P. aeruginosa e *A. baumannii* causam um número significativo de infecções hospitalares em todo o mundo. Vale ressaltar que esses patógenos são intrinsecamente resistentes a vários antimicrobianos, sendo que seus principais mecanismos de resistência são: produção de enzimas β -lactamases, bombas de efluxo, modificação no alvo de ação do fármaco e modificações na membrana externa. Esses patógenos podem se tornar resistentes à praticamente todas as drogas atualmente disponíveis pela transferência de material genético entre as diferentes cepas (ZAVASCKI, 2010).

Vale ressaltar que tanto *P. aeruginosa* como *Acinetobacter* spp. produzem a cefalosporinase cromossômica do tipo AmpC, sendo esse um dos fatores relacionados ao fenótipo de resistência intrínseca dessas espécies. A expressão dessa enzima em *P. aeruginosa* é induzida pela exposição à cefoxitina e ao imipenem; em contrapartida, em *Acinetobacter*, a expressão dessa enzima não é induzível (ZAVASCKI, 2010).

A somatória de diversos mecanismos de resistência ou a ação acentuada de um desses mecanismos geram cepas multirresistentes (ZAVASCKI, 2010). Um efetivo monitoramento da presença desses patógenos multirresistentes se faz necessário para que se possa fazer a prevenção da disseminação desses determinantes de resistência e também para direcionar a racionalização do uso de antimicrobianos.

3.1 Resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa pode ser encontrada no meio ambiente, no solo e também na água (HANCOCK, 2002). É considerada um dos principais patógenos oportunistas, podendo causar uma grande variedade de infecções hospitalares, a exemplo de pneumonias associadas a ventilação mecânica, infecções do trato urinário, bacteremias e infecções de tecidos moles (HONG, et al., 2015).

Foi o primeiro patógeno descrito com o fenótipo de extrema resistência (XDR, do Inglês *extremely drug resistance*) (ROSSOLINI, 2014). Essas cepas mostram-se resistentes inclusive aos antibióticos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e às polimixinas (HONG, et al., 2015). Estão associadas a uma alta taxa de mortalidade, sendo consideradas de difícil erradicação (CANEIRAS, 2010).

Vale ressaltar que os carbapenêmicos ainda são os fármacos que mostram uma maior potência contra essas cepas com fenótipo de multirresistência; com isso, a disseminação de carbapenemases nessas cepas é considerada um grande desafio na prática clínica (HONG, et al., 2015).

Seu fenótipo multirresistente se deve à associação de vários mecanismos distintos de resistência, como a hiperexpressão das bombas de efluxo do tipo Mex,

produção de β -lactamases do tipo AmpC, alteração da topoisomerase gerando resistência à quinolonas ou pela aquisição de genes de resistência que codificam as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, as ESBL e as carbapenemases. Neste último grupo destacam-se as metalo- β -lactamases (ROSSOLINI, 2014). Além da produção de AmpC, encontramos nas cepas de *P. aeruginosa* a carbapenemase OXA-50, também de produção intrínseca, que gera uma diminuição da susceptibilidade de fármacos como penicilina e meropenem (ZAVASCKI, 2010).

A figura mostra a distribuição geográfica de isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.

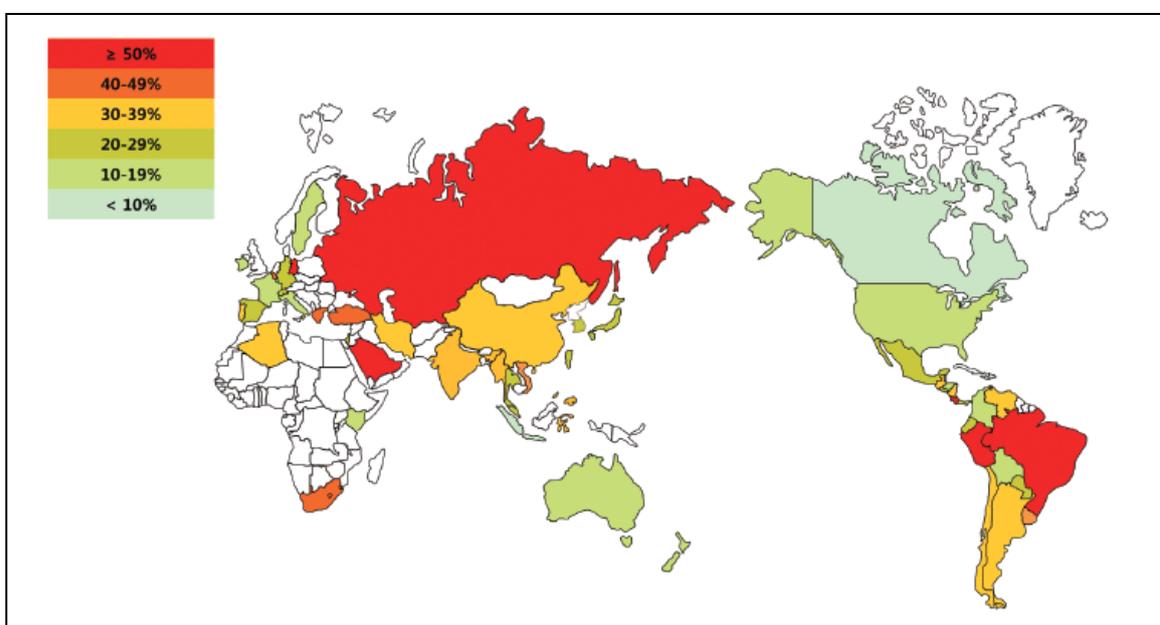


Figura 6 – Distribuição geográfica e frequência de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. As áreas em branco não possuem dados publicados (HONG, et al., 2015).

A porcentagem mostrada na figura é a razão entre as cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e o total de *P. aeruginosa* isoladas naquele local. Foram reportados isolados resistentes em 50 países. As menores porcentagens foram encontradas no Canadá e na República Dominicana, menos de 10%. Por outro lado, as razões encontradas no Brasil, Peru, Costa Rica, Rússia, Grécia, Polônia, Irã e Arábia Saudita foram maiores do que 50%, o que é motivo de grande preocupação para as autoridades de saúde pública desses países (HONG, et al., 2015).

Uma grande porcentagem dessas cepas multirresistentes apresenta o mesmo contexto genético, o que ressalta a importância dos elementos genéticos móveis na

disseminação da resistência bacteriana (HONG, et al., 2015). A tabela abaixo mostra as principais β -lactamases encontradas em cepas de *P. aeruginosa* divididas de acordo com a sua classificação molecular.

Tabela 2 – Principais β -lactamases identificadas em *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela adaptada da revisão ZAVASCKI, 2010; HONG, et al., 2015).

Classe Molecular de Ambler	Enzimas
A	TEM-1, 2, 4, 21, 24, 42, 90, 110 e 116. SHV-1, 2a, 5 e 12 PER-1 e 2 VEB-1, 2 e 3 GES-1, 2, 5, 8 (IBC-2) e 9 BEL LBT 802 CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-43 PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3, CARB-4, CARB-like e ERA-1 KPC-2 e KPC-5
B	IMP-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 29, 30, 31, 33, 35, 37, 40, 41, 43, 44, 45 e 48. VIM-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 28, 30, 36, 37, 38 e 43. SPM-1 GIM-1 AIM-1 FIM-1 NDM-1
C	AmpC (PDC)
D	Espectro reduzido: LCR-1, NPS-1, OXA-1, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 20, 21, 30 e 46 Espectro estendido: OXA-11, 14, 19, 28, 31, 32, 35, 45, 53 e 161. Carbapenemase de ocorrência natural: OXA-50 Carbapenemase adquirida: OXA-24/40

A enzima KPC gera uma grande preocupação na comunidade médica, pois confere resistência a todos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos e carbapenêmicos. Essa enzima era inicialmente restrita a membros da família das Enterobactérias; no entanto, já existem relatos, na América Latina, da existência dessa enzima em isolados de *P. aeruginosa* (ZAVASCKI, 2010).

O primeiro relato da existência do gene *bla*_{KPC} em *P. aeruginosa* ocorreu, em 2007, na Colômbia, onde foi identificado o gene *bla*_{KPC-2} de localização cromossômica (VILLEGAS, 2007).

No Brasil há relatos da detecção de *bla*_{KPC-2} em *P. aeruginosa*, mas a sequência completa do plasmídeo ainda não foi publicada (Carrara-Marroni, 2015; Jácome, 2012; Rizek, 2014). Na publicação de Carrara-Marroni (2015) o gene foi detectado em plasmídeo de 11 kb, em contexto genético distinto daquele descrito por Naas e colaboradores.

Em 2013, Naas e colaboradores caracterizaram os dois primeiros plasmídeos (pCOL-1 e pPA-2) contendo o gene *bla*_{KPC-2} encontrados em *P. aeruginosa*. O plasmídeo pCOL-1 possui 31.529 pb e pertence ao grupo de incompatibilidade IncP-6. Já o plasmídeo pPA-2 possui 7.995 pb e pertence ao grupo de incompatibilidade IncU, sendo que ambos os plasmídeos não possuem genes conjugativos. A figura abaixo mostra os plasmídeos caracterizados por Naas e colaboradores.

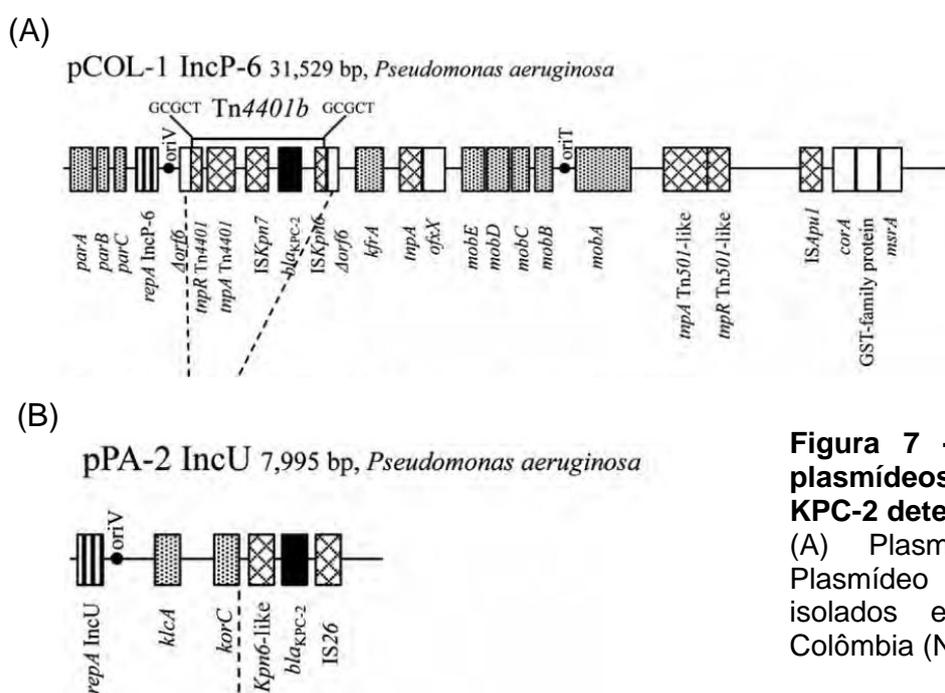


Figura 7 – Comparação dos plasmídeos contendo o gene KPC-2 detectados na Colômbia. (A) Plasmídeo pCOL-1; (B) Plasmídeo pPA-2; ambos isolados e caracterizados na Colômbia (NAAS, et al., 2013).

Dentre as β -lactamases isoladas em *Pseudomonas* spp ganham destaque as metalo- β -lactamases, cuja frequência é maior nesse gênero bacteriano do que nas Enterobactérias, atualmente já foram descritas e identificadas as enzimas VIM, IMP, SPM-1, GIM-1, AIM-1 (ZAVASCKI, 2010), FIM-1 e NDM-1 (HONG, 2015).

Os mecanismos de resistência em cepas de *P. aeruginosa* também podem estar associados a alterações da membrana como a perda ou a diminuição da expressão de porinas (ZAVASCKI, 2010) e a hiperexpressão das bombas de efluxo (CANEIRAS, 2010).

A hiperexpressão das bombas de efluxo pode ser uma característica intrínseca da espécie ou pode ser resultado de alterações genéticas nos sistemas que regulam a expressão dessas proteínas, sendo que essas informações podem estar inseridas tanto no cromossomo como em plasmídeos, propiciando assim sua disseminação (ZAVASCKI, 2010).

Até o momento, já foram caracterizadas sete sistemas de efluxo em *P. aeruginosa*: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexGHI-OpmD, MexJK- OprM e MexVW- OprM (bombas de efluxo do tipo Mex) (CANEIRAS, 2010).

As bombas do tipo MexAB-OprM e MexXY-OprM possuem expressão constitutiva, ou seja, natural, sendo este outro fator que justifica o fenótipo intrínseco multirresistente dessa espécie bacteriana (POOLE, 2005).

A figura abaixo mostra o esquema da bomba de efluxo do tipo MexAB-OprM, encontrada em *P. aeruginosa*.

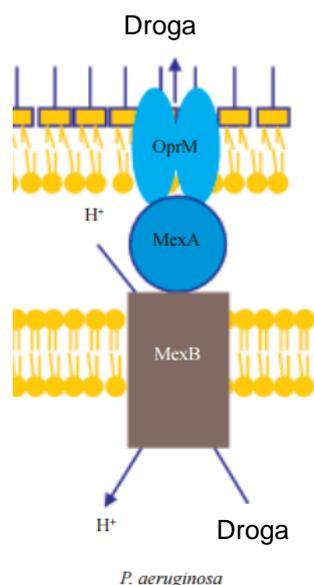


Figura 8 - Representação esquemática da bomba de efluxo do tipo MexAB-OprM. (Adaptado de SCHWEIZER, 2003).

Antimicrobianos, usualmente utilizados no tratamento de infecções geradas por *Pseudomonas aeruginosa*, como fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas e aminoglicosídeos, são substratos para essas bombas de efluxo, gerando com isso um aumento nas concentrações inibitórias mínimas (MICs) desses fármacos (ZAVASCKI, 2010).

Porinas são proteínas que formam canais na membrana externa dos bacilos Gram-negativos, os tornando semipermeáveis, servindo de passagem para diversas substâncias, incluindo moléculas grandes (HANCOCK, 2002).

Existem três grandes famílias de porinas descritas em *P. aeruginosa*: OprD com 19 membros, OprM com 18 membros e TonB com 35 membros (HANCOCK, 2002).

A perda dos canais de porina, principalmente dos OprD, também mostra ser um importante mecanismo de resistência em *P. aeruginosa*, contribuindo para o seu alto nível de resistência intrínseca, principalmente contra os β -lactâmicos, incluindo os fármacos como o imipenem (ZAVASCKI, 2010).

Muitas cepas de *P. aeruginosa* eram consideradas sensíveis apenas à polimixina, no entanto, já foram reportados isolados resistentes inclusive a esse

antibiótico, devido a mutações do lipídeo A do polissacarídeo da parede celular bacteriana, alvo desse fármaco, ou devido a alterações das proteínas de membrana externa (ROSSOLINI, 2014).

3.2 Resistência antimicrobiana em *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* possui uma grande diversidade de espécies, podendo ser encontrados no solo, água, esgoto, alimentos e animais como pássaros e peixes. Em humanos, normalmente é considerado componente normal da microbiota da pele e da mucosa do trato respiratório; no entanto, também pode causar infecções locais e sistêmicas, como pneumonias, bacteremias e infecções em feridas da pele (ALMASAUDI, 2016). É atualmente um dos patógenos mais isolados em alguns ambientes hospitalares (KIM, et al., 2014).

As taxas de resistência no gênero *Acinetobacter* estão em crescente aumento (ROSSOLINI, 2014), o que explica, em parte a alta porcentagem de mortalidade nas infecções causadas por esses microrganismos, que pode variar entre 20-60% dos casos (KASSAMALI, 2014).

Vale ressaltar que esse gênero bacteriano possui uma alta habilidade em formar biofilme (KIM, et al., 2014), o que propicia sua persistência e transmissão nos ambientes hospitalares. Já foram isolados em equipamentos médicos reutilizáveis, como tubos de ventilação, monitores de pressão arterial, umidificadores, colchões e travesseiros (ALMASAUDI, 2016).

Acinetobacter baumannii, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* formam um grupo denominado “Complexo *Acinetobacter baumannii*” e são os responsáveis pela maioria dos casos de infecções nosocomiais (KIM, et al., 2014).

Nesse contexto, ganham destaque as cepas de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos, pois são resistentes a todos antibióticos indicados para esse patógeno, ficando apenas a polimixina como opção de tratamento (ROSSOLINI, 2014).

O mapa mostra a epidemiologia global dos isolados de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos.

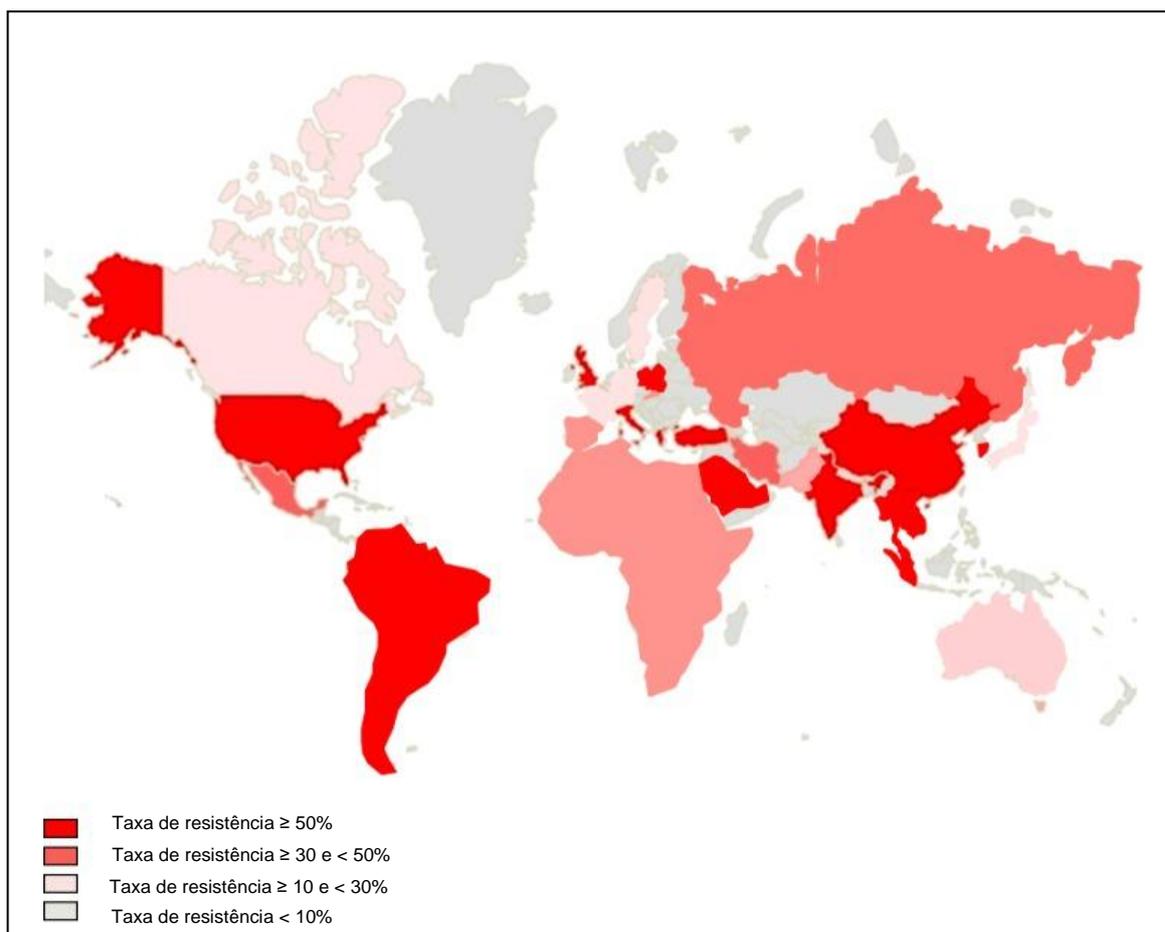


Figura 9 – Distribuição geográfica e frequência de isolados de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos. (KIM, et al., 2014).

A resistência aos carbapenêmicos em cepas de *Acinetobacter* spp ocorre principalmente pela produção de oxacilinases, OXA-23, OXA-40 e OXA-58 e também pela produção das metalo- β -lactamases da família VIM, IMP e SIM. Em *Acinetobacter baumannii* a resistência aos carbapenêmicos está frequentemente associada à produção das enzimas OXAs. (KIM, et al., 2014).

A tabela 3 mostra as principais β -lactamases encontradas em cepas de *Acinetobacter baumannii* divididas de acordo com a sua classificação molecular.

Tabela 3 – Principais β -lactamases identificadas em *Acinetobacter baumannii* (Tabela adaptada da revisão ZAVASCKI, 2010; SAAD, 2016).

Classe Molecular de Ambler	Enzimas
A	PER-1 e 2 VEB-1, 1a e 3 TEM-1, 2, 92 e 116 SHV-5 e 12 GES-11 CTX-M-2 e CTX-M-43 RTG-2 (CARB-5), CARB-8, RTG-4 KPC-2 e KPC-5
B	IMP-1, 2, 4, 6, 8 e 11 VIM-1, 4 e 11 SIM-1
C	AmpC (ADC)
D	Espectro reduzido: OXA-2, 20, 21 e 37 Carbapenemase de ocorrência natural: OXA-51-like (OXA-64-66, OXA-68-71, OXA-78-80), OXA-82, OXA-86, OXA-92 e OXA-104-112 Carbapenemase adquirida: OXA-23 (ARI-1), 24/40, 25-27, 43, 49, 58, 72, 96 e 97

Outro importante mecanismo de resistência relatado em *A. baumannii* são as bombas de efluxo. O sistema normalmente expresso nesse gênero bacteriano é o AdeABC que, quando hiperexpresso, confere resistência a aminoglicosídeos e diminuição da sensibilidade à fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim, netilmicina e meropenem (ZAVASCKI, 2010).

Em 2008, outro importante sistema de efluxo foi identificado em *Acinetobacter baumannii*: o sistema AdeIJK. O sistema confere, em baixo nível, resistência intrínseca a várias classes de antibióticos (ZAVASCKI, 2010).

A resistência encontrada nesses bacilos também está associada a alterações de proteínas da membrana externa (OMPs). As principais OMPs encontradas em *Acinetobacter baumannii* são a HPM-AB (termo do inglês “heat-modifiable protein”) e a CarO; essas proteínas formam canais que permitem a passagem de diversas substâncias, dentre elas os antibióticos β -lactâmicos. A diminuição ou a ausência da

expressão dessas proteínas foram reportadas em cepas resistentes aos antibióticos carbapenêmicos (SAAD, 2016; ZAVASCKI, 2010).

Uma das poucas opções terapêuticas disponíveis para os isolados resistentes aos carbapenêmicos é a polimixina, no entanto, um fato preocupante é que já foram reportados isolados resistentes inclusive a esse fármaco, devido a mutações no lipídeo A da membrana dessas bactérias, alvo desse antibiótico ou devido à redução das OMPs, felizmente esses casos ainda são pouco frequentes (ROSSOLINI, 2014).

No geral, o tratamento de pacientes com infecções por bactérias Gram-negativas, em especial *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, que apresentam múltiplos mecanismos de resistência, são atualmente um grande desafio para a medicina (ZAVASCKI, 2010; BASSETTI et al., 2011). O controle da disseminação desses patógenos assim como a racionalização da utilização de antimicrobianos são as principais medidas que devem ser adotadas para a redução da atual crise de multirresistência bacteriana (ROSSOLINI, 2014).

Os carbapenêmicos em doses elevadas e/ou em associação a outros antimicrobianos ainda são os mais utilizados no tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos. Por outro lado, a produção de carbapenemases é um dos mais eficientes mecanismos de resistência aos carbapenêmicos. Para que seja possível a sua rápida detecção por método molecular há necessidade de que seja conhecida a diversidade dessas enzimas no Brasil.

II. Objetivos

1. Objetivo Geral

Determinar características fenotípicas e genotípicas de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*, produtores de carbapenemases, isolados de pacientes atendidos em hospitais da Grande São Paulo.

2. Objetivos Específicos

1. Padronizar o teste fenotípico de hidrólise enzimática em espectrofotômetro para detecção de carbapenemases.
2. Determinar a frequência de genes de carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. resistentes aos carbapenêmicos;
3. Avaliar a relação clonal entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos através da eletroforese de campo pulsado (PFGE);
4. Caracterizar o plasmídeo contendo o gene *bla_{KPC}* isolado em uma amostra de *Pseudomonas aeruginosa*, no Brasil.

III. Material e Métodos

1. Isolados e Cepas de Referência

Todos os isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes ao imipenem e/ou meropenem detectados no Fleury Medicina Diagnóstica, no período de fevereiro de 2013 a outubro de 2013, foram selecionados para análise neste estudo. A técnica de disco-difusão foi aplicada para a seleção dos isolados não sensíveis.

A identificação da espécie foi confirmada por espectrometria de massas utilizando-se o equipamento Vitek MS (bioMérieux).

2. Padronização do ensaio fenotípico para detecção de carbapenemases - detecção da hidrólise enzimática por espectrofotômetro

O ensaio de hidrólise tem como objetivo principal a determinação da atividade enzimática dos isolados clínicos o que nos permite inferir se a resistência observada nessas amostras ocorre devido à presença dessas enzimas ou por outros mecanismos, principalmente aqueles relacionados à parede celular bacteriana.

As amostras foram repicadas em ágar LB, com um disco de imipenem, e incubadas por 18-24 horas a 37°C. Posteriormente, as colônias foram inoculadas em 5 mL de caldo LB com 2 µg/mL de imipenem e incubadas sob agitação por 18 horas à 37°C. A cultura bacteriana foi centrifugada a 3.000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 7,0). As bactérias foram lisadas, em banho de gelo, com auxílio de sonicador (Branson Digital Sonifier - modelo 102C) aplicando-se 4 ciclos de 30 segundos, em pulso constante e potência de 30%, com intervalos de 30 segundos entre os pulsos. A seguir, o extrato bacteriano foi centrifugado à 13.000 x g, por 3 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e mantido no gelo até o momento do uso.

Para a análise espectrofotométrica foram misturados 900 µL de imipenem a 100µM com 100 µL do extrato proteico, a absorbância foi medida a 297 nm em

cubeta de quartzo. Durante toda análise a temperatura foi mantida a 37°C (adaptado de ANTONIO, 2010).

A variação da absorvância foi monitorada a cada 30 segundos durante os primeiros 10 minutos de análise e posteriormente a cada 5 minutos até completar 2 horas. A diminuição da absorvância da solução de imipenem com o extrato proteico quando comparada com a solução de imipenem pura indica um resultado positivo para a presença de carbapenemases. O espectrofotômetro utilizado neste trabalho foi modelo Evolution 260 Bio (Thermo Scientific).

3. Extração de DNA genômico pelo método de lise térmica

Os lisados bacterianos foram preparados a partir do crescimento recente da cepa em ágar LB ou BHI. Algumas colônias da bactéria foram resuspendidas em 100 µL de água grau reagente estéril, em seguida, essa suspensão bacteriana foi fervida por 10 minutos e congelada a -20°C por um mínimo de 10 minutos. Para amplificação do DNA, os lisados foram descongelados, à temperatura ambiente, homogeneizados e centrifugados a 12.000 x g por 2 minutos e os sobrenadantes foram utilizados nas reações de amplificação do DNA.

4. Detecção genotípica da produção de carbapenemases

Foram padronizadas duas reações de PCR multiplex, uma para detecção dos genes *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA}, e outra para a detecção dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{KPC}. Os primers utilizados foram aqueles descritos por Poirel, et al., 2011. Foi acrescentado, nas reações, um par de primers para amplificação do rRNA 16S como controle interno da reação. As sequências dos primers estão descritas na Tabela 4.

A mistura da reação de PCR foi composta por 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,125 mM de cada um dos desoxinucleotídeos, 0,2 µM dos primers para *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{VIM} e *bla*_{KPC}; 0,5 µM dos primers para *bla*_{IMP}; 0,3 µM dos primers para amplificação do gene *rrs* (rRNA 16S) e 0,5 U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

As condições da PCR multiplex para os genes *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA} e *rrs* foram: 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 40 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de 72°C por 7 minutos para extensão final.

Já as condições da PCR multiplex para os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{KPC} e *rrs* foram: 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de 72°C por 7 minutos para extensão final.

Para detecção dos genes que codificam enzimas da família OXA foi realizada a PCR multiplex descrita por Woodford (2006), onde foram pesquisados os genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-58-like}. Essa reação foi feita em todas as cepas de *Acinetobacter* spp. com teste de hidrólise positivo. A mistura da reação de PCR foi composta por 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,125 mM de cada uma das bases nitrogenadas, 0,25 µM dos primers e 0,5 U da enzima Platinum *taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 25 segundos, 52°C por 40 segundos e 72°C por 50 segundos, seguidos de 72°C por 6 minutos para extensão final.

Para as cepas de *Acinetobacter* com teste de hidrólise positivo também foram pesquisados os genes *bla*_{OXA-72} e *bla*_{OXA-143}. Os primers para a amplificação desses genes foram desenhados neste trabalho. A mistura da reação de PCR foi composta por 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,125 mM de cada uma dos desoxinucleotídeos, 0,2 µM dos primers, 0,3 µM dos primers para amplificação do gene *rrs* e 0,5 U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições da PCR multiplex foram: 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de 72°C por 7 minutos para extensão final.

Para as cepas de *P. aeruginosa* que apresentaram teste de hidrólise positiva e cuja PCR foi negativa para os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA} reações adicionais foram realizadas:

- 1) PCR multiplex descrita por Woodford (2006), conforme descrito acima, para os genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58}.

2) PCR para o gene BKC. Essa reação foi realizada utilizando-se o Master Mix (Promega) e 0,25 μ M dos primers. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minutos, seguidos de 72°C por 10 minutos para extensão final.

3) PCR para os genes AIM e GIM. A mistura da reação de PCR foi composta por 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,125 mM de cada um dos desoxinucleotídeos, 0,2 μ M dos primers e 0,5 U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições da PCR foram: 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 40 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de 72°C por 7 minutos para extensão final.

4) PCR multiplex para os genes GES, FIM e BKC. A mistura da reação de PCR foi composta por 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,125 mM de cada um dos desoxinucleotídeos, 0,2 μ M dos primers; 0,3 μ M dos primers para amplificação do gene *rrs* (rRNA 16S) e 0,5 U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições da PCR foram: 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 40 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de 72°C por 7 minutos para extensão final.

5) PCR multiplex para amplificação dos genes AmpC (ACC, MOX, CIT, ACT, FOX, DHA), conforme descrito por Dallene (2010) nessa reação também foi acrescentado os genes para amplificação do controle interno de *rrs*.

A tabela abaixo mostra as sequências dos primers utilizados.

Tabela 4 – Sequência dos iniciadores utilizados

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	Referência
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM-1 – F SPM-1 - R	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	Poirel, et al., 2011
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-1 – F NDM-1 - R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	Poirel, et al., 2011
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA-F OXA-R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	Poirel, et al., 2011
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	Poirel, et al., 2011
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F VIM-R	GATGGTGTGGTTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	Poirel, et al., 2011
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F KPC-R	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	Poirel, et al., 2011
<i>rrs</i>	RRS27-Fw RRS1492-Rv	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	Maiwald, 2004
<i>bla</i> _{AIM}	AIM-F AIM-R	CTGAAGGTGTACGGAAACAC GTTCGGCCACCTCGAATTG	Poirel, et al., 2011
<i>bla</i> _{GIM}	GIM-F GIM-R	TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACCTTGCCATGC	Poirel, et al., 2011
Entorno do gene IMP-1	IMP1-644-663-Fw aadA1-285-266-Rv	ACAGTGAAGTTGGAGACGCA GTCGTCGTGCACAACAATGG	Este trabalho
OXA-51	OXA-51-likeF OXA-51-likeR	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	Turton, 2006
OXA-23	OXA-23-likeF OXA-23-likeR	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT	Woodford, 2006
OXA-24	OXA-24-likeF OXA-24-likeR	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAA AGGGGATT	Woodford, 2006
OXA-58	OXA-58-likeF OXA-58-likeR	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	Woodford, 2006

Continuação

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	Referência
OXA-72	OXA-72-F OXA-72-Rv	TGAAGCTCAAACACAGGGTG TTAGCTTGCTCCACCCAACC	Este trabalho
OXA-143	OXA-143-F OXA-143-Rv	CGAGCACATACAGAATATGTCCC TTACATCCATTCCCCAGCCG	Este trabalho
<i>bla</i> _{GES-2}	GES-2-F GES-2-R	TCCTGCCACGGAGCGGTTTCTA TCGTAGTGTCGCGTCTCCCGTT	Este trabalho
<i>bla</i> _{GES-23}	GES-23-F GES-23-R	TGGAGAAGCTGGAGCGCGAGAA ATCATGTCCGGGCGTAGCTCA	Este trabalho
<i>bla</i> _{FIM}	FIM-F FIM-R	GTCATTTGCCTGCTGACGGCCT ACACCCCTGCGTAATAGCGGT	Este trabalho
<i>bla</i> _{BKC}	BKC-F BKC-R	CAATCTCGGCGATGACGGCGTT TCGATTGCCGAGCTTTGCGAGG	Este trabalho
ACC (<i>bla</i> _{ACC-1} e <i>bla</i> _{ACC-2})	MultiCaseACC_for MultiCaseACC_rev	CACCTCCAGCGACTTGTTAC GTTAGCCAGCATCACGATCC	Dallenne, et al, 2010
FOX (<i>bla</i> _{FOX-1} a <i>bla</i> _{FOX-5})	MultiCaseFOX_for MultiCaseFOX_rev	CTACAGTGCGGGTGGTTT CTATTTGCGGCCAGGTGA	Dallenne, et al, 2010
MOX(<i>bla</i> _{MOX-1} , <i>bla</i> _{MOX-2} , <i>bla</i> _{CMY-1} , <i>bla</i> _{CMY-8 A} , <i>bla</i> _{CMY-11} , <i>bla</i> _{CMY-19})	MultiCaseMOX_for MultiCaseMOX_rev	GCAACAACGACAATCCATCCT GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	Dallenne, et al, 2010
DHA (<i>bla</i> _{DHA-1} e <i>bla</i> _{DHA-2})	MultiCaseDHA_for MultiCaseDHA_rev	TGATGGCACAGCAGGATATTC GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	Dallenne, et al, 2010
CIT (<i>bla</i> _{LAT-1} a <i>bla</i> _{LAT-3} , <i>bla</i> _{BIL-1} , <i>bla</i> _{CMY-2} a <i>bla</i> _{CMY-7} , <i>bla</i> _{CMY-12} a <i>bla</i> _{CMY-18} e <i>bla</i> _{CMY-21} a <i>bla</i> _{CMY-23})	MultiCaseCIT_for MultiCaseCIT_rev	CGAAGAGGCAATGACCAGAC ACGGACAGGGTTAGGATAGY	Dallenne, et al, 2010
EBC (<i>bla</i> _{ACT-1} e <i>Bla</i> _{MIR-1})	MultiCaseEBC_for MultiCaseEBC_rev	CGGTAAAGCCGATGTTGCG AGCCTAACCCCTGATACA	Dallenne, et al, 2010

F: primers senso; R: primer anti-senso; Y= C ou T

Os produtos da amplificação do DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% diluído em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA), foi utilizado como escala de referência 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com Gel Red[®] (Biotium) e observados em transiluminador UV.

Posteriormente, foi realizado o sequenciamento dos produtos de PCR obtidos para confirmação dos resultados. Para isso foi utilizado o BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

5. Extração de DNA plasmidial

A extração plasmidial foi realizada seguindo o protocolo descrito por BIRNBOIM: DOLY, 1979. Os isolados foram cultivados em caldo Mueller Hinton e incubados a 37°C por 18 a 24 horas. Cerca de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada por 30 segundos a 16.000 g a 4°C, e em seguida todo o sobrenadante foi retirado.

Ao sedimento foram adicionados 100 µL de solução I (20 mg/mL de lisozima, 50 mM glicose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl – pH 8.0); em seguida foram adicionados 200 µL da solução II (0,2M NaOH, SDS 1%) e a suspensão foi homogeneizada por inversão dos tubos. Após a incubação por cinco minutos em gelo picado, foram adicionados 150 µL da solução III (3M acetato de sódio – pH 4.8), os tubos foram homogeneizados por inversão por cinco vezes e incubados por mais 5 minutos em banho de gelo; depois foram centrifugados a 16.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (250 µL) foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL onde foi adicionado 1,0 mL de etanol absoluto gelado e em seguida os tubos foram homogeneizados por inversão. Os tubos foram mantidos a -20°C por 30 minutos.

Após a incubação, os tubos foram novamente centrifugados a 16.000 g por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi dissolvido em 100 µL da solução IV (0,1 M acetato de sódio, 0,05 M Tris-HCl – pH 8.0). A seguir foram adicionados 200 µL de etanol absoluto gelado, as soluções foram homogeneizadas por inversão dos tubos, e em seguida, foram novamente incubados a -20°C por 20 minutos, sendo então centrifugados a 16.000 x g por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e descartado. Após evaporação completa do álcool, o

precipitado foi resuspendido em 40 μ L de tampão TE (Tris-EDTA). Os plasmídeos extraídos foram quantificados no Nanodrop e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,7% por 5 horas. A cepa *E.coli* 39R861 foi utilizada como referência. A revelação do gel foi feita com GelRed e as imagens foram obtidas com o transiluminador UV.

6. Preparação de bactérias competentes.

Para o preparo de bactérias competentes uma colônia da bactéria *Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies) foi inoculada em 5 mL de meio LB sem antibiótico e mantida sob agitação (200 rpm) a 37°C por 18 a 24 horas. Posteriormente, 2,5 mL dessa cultura foram inoculados em 250 mL de caldo LB. A suspensão foi mantida sob as mesmas condições de crescimento até atingir a atingir DO 600nm entre 0,5 e 0,7. Após o período de crescimento a cultura foi mantida no gelo por 20 minutos. As células foram centrifugadas a 4.000 g, por 15 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi resuspendido em 45 mL de glicerol a 10% gelado. Uma nova centrifugação foi realizada (4.000 g, 15 minutos, 4°C). Esse procedimento de lavagem do pellet foi repetido por mais três vezes, diminuindo-se apenas o volume final em que o pellet foi resuspendido, em seguida, uma nova centrifugação foi realizada (4.000 g, 15 minutos, 4°C). O sedimento foi resuspendido em 1,0 mL de água milli-Q estéril contendo glicerol e alíquotas de 100 μ l foram realizadas em microtubos estéreis e congeladas a -80°C até o momento de uso.

7. Transformação por Eletroporação

Para a realização da transformação, uma alíquota da bactéria competente foi retirada do freezer e descongelada dentro do gelo. Após o descongelamento completo adicionou-se aproximadamente 10 μ g do plasmídeo. O tubo foi incubado, no gelo, por 1 minuto. Seu conteúdo foi transferido para uma cubeta de 0,2 cm (BioRad) gelada que foi incubada, no gelo, por mais 1 minuto. Seguir, as mesmas

foram eletroporadas no eletroporador E. coli Pulser (BioRad). Após o choque, adicionou-se imediatamente 1mL de meio SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,02 M de glicose e 0,01 M MgCl₂). As células transformadas foram transferidas para tubos estéreis e incubadas durante 1 hora, a 200 rpm a 37°C. Após esse período, a suspensão foi semeada em ágar LB contendo ceftazidima (2 mg/L) ou imipenem (1 mg/L) para que transformantes contendo o plasmídeo de interesse fossem selecionados. As placas foram mantidas na estufa a 37°C, por 18 a 24 horas.

8. Ensaio de Conjugação

Os ensaios de conjugação foram baseadas nos protocolos descritos por Hardy, K., 1986 e por Miller, J.H., 1992. Resumidamente, a cepa *E. coli* J53 (receptora) e as cepas doadoras de plasmídeos, foram inoculadas em 5mL de caldo LB (Luria Bertani), e incubadas à 37°C, a 175 rpm até atingir DO_{600nm} 0.5-0.7A (aproximadamente 5 horas após a inoculação). Em um tubo foram adicionados 900 µL da cepa doadora e 100 µL da cepa receptora (J53). O tubo foi centrifugado por 2 minutos a 16.000 g, o sobrenadante foi retirado e o sedimento bacteriano foi homogeneizado com 100 µL de caldo LB. Esse sedimento foi colocado sobre uma membrana de acetato de celulose estéril, com porosidade de 0,45 µm, previamente depositada sobre ágar LB. A placa foi incubada, em estufa, a 37°C por 18 a 24 horas. Após esse período a membrana foi lavada com 5 mL de caldo LB, e alíquotas de 50 µL dessa suspensão foram semeadas em placas contendo 125 µg/mL de azida sódica e 4 µg/mL de ceftazidima, para o isolamento dos transconjugantes.

9. Determinação do perfil de sensibilidade bacteriano

Foram selecionadas 2 a 3 colônias com crescimento de 18 a 24 horas para preparo da suspensão bacteriana, em solução salina, na concentração equivalente à escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL). Foi realizada uma diluição de 1:100 da

suspensão bacteriana em caldo Muller-Hinton cátion ajustado (BD™) - 0,1 ml da suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland diluída em 10 ml de caldo MH.

Os antibióticos a serem testados foram diluídos em placas de 96 poços em formato de “U”, sendo que foi deixado um volume final de 50 µL em cada poço. A coluna 12 foi utilizada para controle de crescimento bacteriano (sem o antibiótico). Para controle de qualidade foi utilizada a cepa de referência *E. coli* ATCC 25922.

Foram inoculados 50 µL da suspensão bacteriana diluída nas placas já contendo os antibióticos com o dobro da concentração, para que haja uma diluição do antibiótico e o mesmo atinja as concentrações desejadas. Após a inoculação, a placa foi incubada a 37°C por 18-24 horas antes da leitura. A interpretação dos resultados foi feita com base nos critérios interpretativos do CLSI 2014 e do EUCAST 2014 (CLSI, 2014a; EUCAST, 2014).

10. Determinação da clonalidade bacteriana por ERIC-PCR

A determinação do perfil clonal dos isolados de *Acinetobacter baumannii* com hidrólise positiva foi realizada através da técnica de ERIC-PCR (sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias) por se tratar de uma técnica rápida, de fácil execução, reprodutível e com um poder discriminatório semelhante ao gerado pelo PFGE (SILBERT, et al.; 2004).

O ERIC-PCR foi realizado com base no protocolo descrito por Presterl e colaboradores (1997) com modificações. A mistura da reação de PCR foi composta por 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uma das bases nitrogenadas, 2 µM do primer ERIC2 (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) e 0,5 U da enzima Platinum *taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições da PCR foram: 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 25°C por 60 segundos e 72°C por 3 minutos, seguidos de 72°C por 16 minutos para extensão final.

Os produtos da amplificação do DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% diluído em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA), foi utilizado como escala de referência 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com

GelRed e observados em transiluminador UV. Os resultados foram analisados com os programas BioNumerics (Applied Maths, Bélgica), foi utilizado o índice de similaridade de Dice 1% e os dendogramas foram obtidos utilizando-se o método UPGMA. Foram considerados como pertencentes a um mesmo tipo clonal isolados com similaridade genética superior a 90% (SILBERT, et al.; 2004).

11. Determinação da clonalidade bacteriana por eletroforese em campos pulsados (PFGE)

Para determinarmos o perfil clonal das amostras com teste de hidrólise positivo seguimos o protocolo descrito por Galetti e Darini em 2010, com modificações.

Inicialmente, as bactérias foram cultivadas em meio ágar sangue de carneiro, no dia seguinte uma suspensão bacteriana foi preparada de modo a se obter uma densidade medida no DENSICHEK™ (VITEK) de 1,0. Um volume de 500 µL dessa suspensão foi transferido para um microtubo e centrifugado por 2 minutos a 20.000G. As células bacterianas foram lavadas com 500µL de solução PIV (10mM Tris, pH8,0; 1,0M NaCl), centrifugadas novamente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado formado foi ressuspenso em 200µL de solução de suspensão (10mM Tris, pH8,0; 100mM EDTA, pH 8,0), desses 150µL foram transferidos para um novo tubo e deixados em banho seco a 55°C por 5 a 10 minutos, em seguida foi adicionado 150µL de agarose (1,5% agarose Ultra Pure, Gbco BRL), essa suspensão foi transferida para os moldes, para confecção dos blocos contendo DNA bacteriano.

Após solidificação dos blocos, os mesmos foram transferidos para uma placa de 12 poços e incubados com tampão de lise (6mM Tris, pH 8,0; 1M NaCl, 100mM EDTA, pH 8,0; 0,2% deoxicolato de sódio; 0,5% N-laurylsarcosine) acrescido de RNase (20 µg/mL) por 4 horas a 37°C. Após esse período a solução foi retirada e foi adicionado 1 mL de solução tamponante ES (EDTA, pH9,0; sarcosil 1%) com 1mg/mL de proteinase K, a placa foi novamente incubada a 50°C por 18 a 24 horas.

Os blocos foram lavados duas vezes com água milliQ estéril e cinco vezes com 1 mL de tampão TE (10mM Tris; 1mM EDTA, pH 8,0); as lavagens foram feitas

a 37°C, por 15 minutos cada a 160 rpm. Os blocos foram mantidos em tampão TE a 4°C até o momento do uso.

Para a corrida, metade de cada um dos blocos foi novamente lavada com tampão TE (três lavagens de 15 minutos) e em seguida os blocos foram digeridos com 5 unidades da enzima Spe I. As digestões foram feitas a 37°C por 18 a 24 horas.

Os blocos foram fixados no gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese de campo pulsado. As condições da corrida foram: pulso inicial 5 segundos, pulso final 60 segundos por 18h, sendo que ao tampão de corrida foi acrescentado tiouréia.

A revelação do gel foi feita com GelRed e as imagens foram obtidas com o transiluminador UV.

Os perfis obtidos foram analisados utilizando-se os programas Bionumerics e GelJ para definição de relação clonal foi utilizado um mínimo de 80% para o índice de similaridade de Dice.

12. Sequenciamento de plasmídeo – Illumina

O sequenciamento do plasmídeo contendo o gene *bla_{KPC}* proveniente da cepa de *P. aeruginosa* (D5170990) isolada e identificada neste trabalho foi realizado utilizando-se o equipamento MiSeq (Illumina). Para isso o DNA do transformante foi extraído conforme descrito anteriormente (item 5). Para preparação da biblioteca de DNA foi utilizado o kit Nextera DNA Sample Preparation, seguindo as especificações do fabricante. O kit Nextera XT baseia-se na fragmentação do DNA genômico ou plasmidial (tagmentação), ligação de adaptadores e índices, amplificação dos fragmentos, purificação com esferas magnéticas e normalização/quantificação da biblioteca.

Para preparo da biblioteca, o DNA plasmidial foi diluído para 2 ng/μL. O DNA foi tagmentado e marcado com adaptadores para sequenciamento em termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies) com Nextera XT DNA Sample Preparation Kit. Em seguida, foi realizada a ligação de respectivos index utilizando-se Nextera®

XT Index Kit – 24 indexes, 96 samples (Illumina) para amplificação dos fragmentos de DNA plasmidial.

A amostra foi purificada utilizando-se esferas magnéticas (Agencourt AMPure XP – Beckman Coulter) para fazer a remoção de pequenos fragmentos de DNA. A biblioteca foi normalizada para preparação do “pool” de DNA, sendo validada através da análise do tamanho dos fragmentos utilizando-se kit High Sensitivity D1000 ScreenTape System (Agilent). O “pool” de DNA foi diluído e desnaturado conforme determinado pelo fabricante. Duas corridas foram realizadas, uma com o MiSeq Reagent Kit, v3 (150 cycles) e a outra com o MiSeq Reagent Nano Kit, v2 (500 cycles) utilizando a plataforma MiSeq (Illumina).

As sequências obtidas foram montadas utilizando-se o programa SeqMan NGen (DNASStar). As extremidades dos contigs (500 bases) foram analisadas utilizando-se o programa BLAST e a seguir os contigs foram ordenados de modo a obter uma sequência única redundante. A exatidão da ordenação dos contigs preliminares foi confirmada em nova montagem utilizando-se o contig único como referência no programa Geneious (Biomatters Limited). O contig único foi submetido a anotação automática utilizando-se o programa RAST, seguido de curadoria manual utilizando-se o programa Artemis (Sanger Institute).

O contexto genético do gene *bla_{KPC-2}* foi reconfirmado desenhando-se primers (Tabela 4) com base nas sequências conhecidas e realizando-se reações de PCR. Os amplicons foram sequenciados utilizando-se o kit BigDye Terminator versão 3.1 no sequenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

IV. Resultados

1. Isolados clínicos

Foram obtidos um total de 229 isolados clínicos, sendo 119 *Pseudomonas aeruginosa*, 109 *Acinetobacter complexo baumannii* e 1 *Acinetobacter ursingii*. As amostras, em sua maioria, foram provenientes de 10 hospitais do estado de São Paulo, mostrados no mapa abaixo. Apenas 6 amostras tiveram outra procedência, sendo uma de outro laboratório, uma de outro estado e quatro de coleta domiciliar. Os isolados foram coletados, um por paciente, durante o ano de 2013.

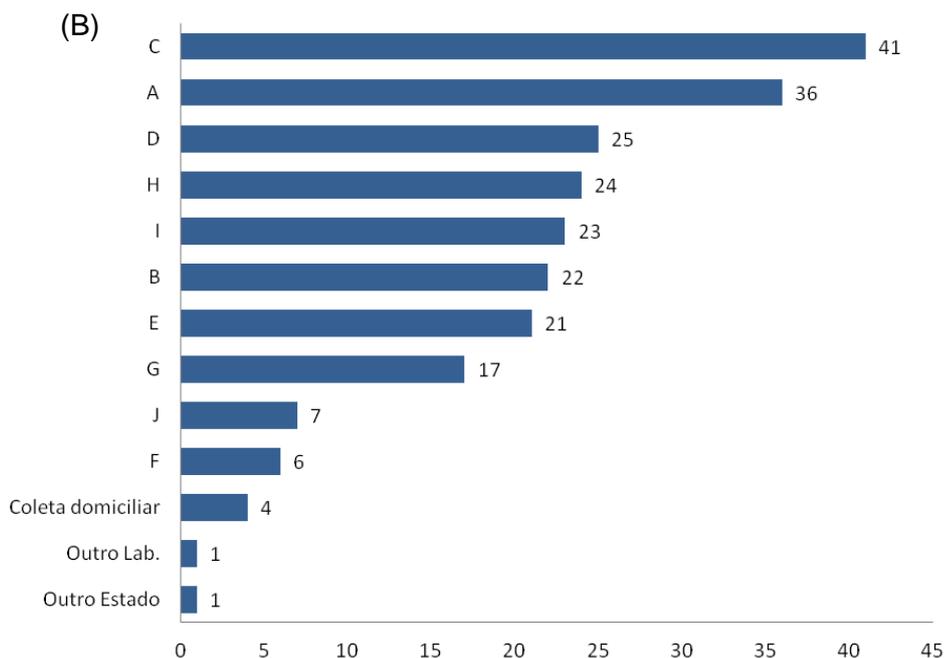
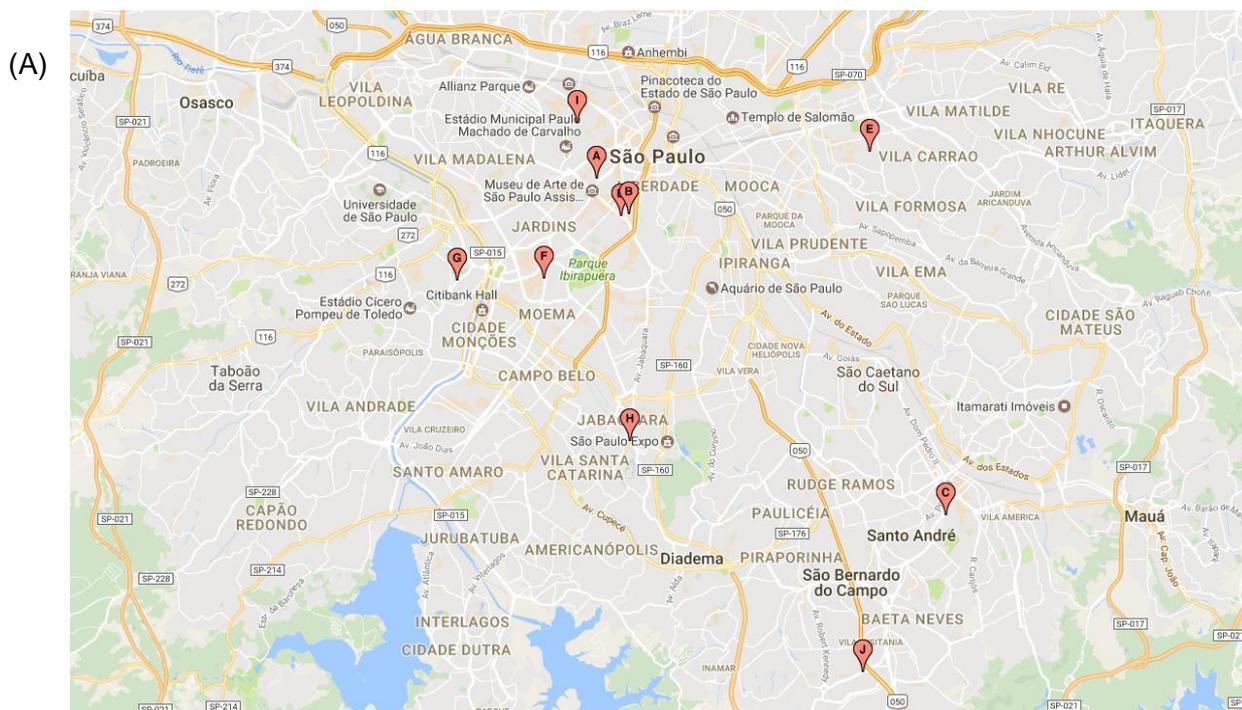


Figura 10 – Distribuição dos isolados bacterianos de acordo com a localização de seu isolamento. (A) Mapa com a localização aproximada dos hospitais participantes desse estudo. (B) distribuição dos isolados de acordo com sua procedência. Letras de A a J representam os hospitais.

Os isolados foram obtidos de diferentes materiais clínicos, sendo a maioria, 48,7% dos isolados, provenientes de secreção traqueal; 14,9% de hemocultura; 8,4% de secreções (abdominal, ferida, membro, entre outras), os outros materiais clínicos apresentam uma menor frequência de distribuição, conforme apresentado nas figuras abaixo.

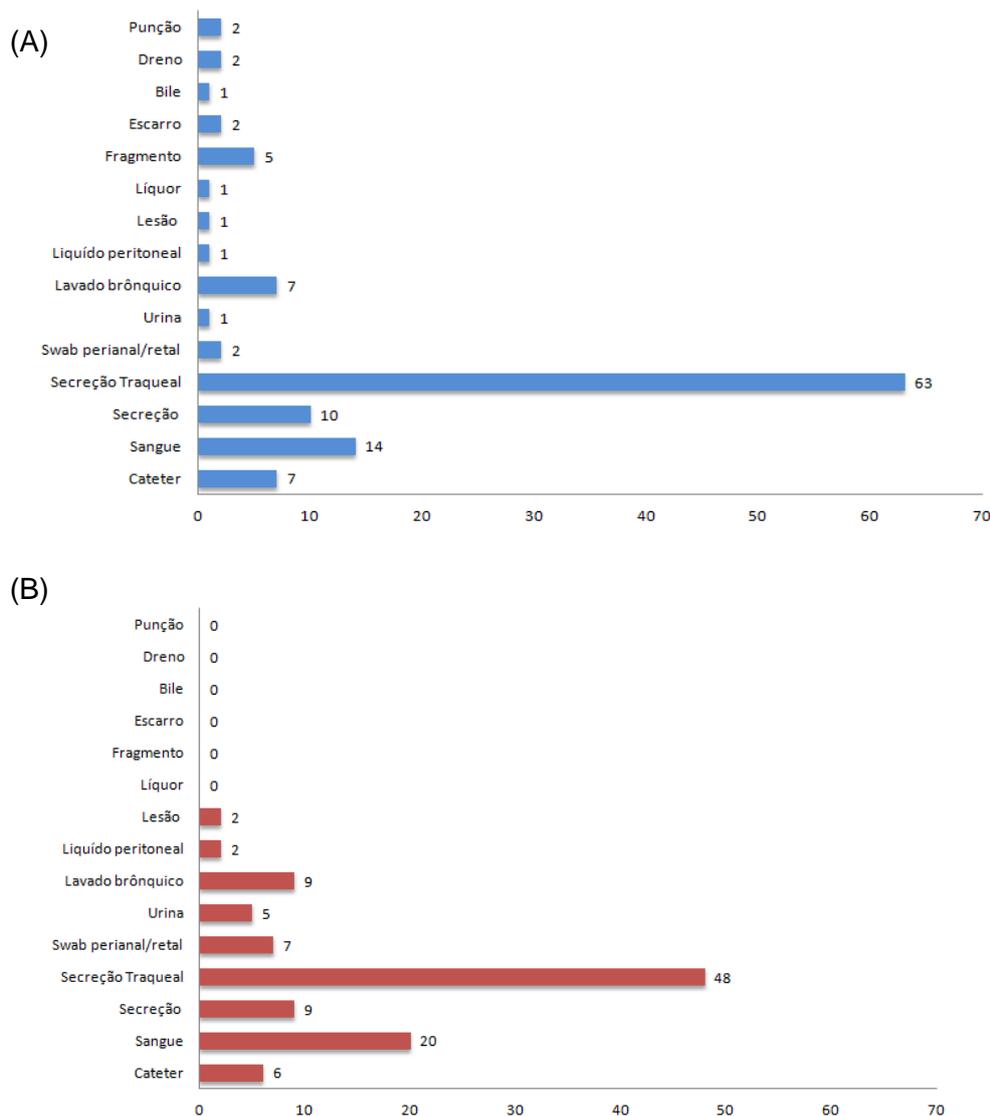


Figura 11 – Distribuição dos isolados bacterianos de acordo com o material clínico. (A) distribuição dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com o material clínico; (B) distribuição dos isolados de *Acinetobacter spp.* de acordo com o material clínico.

2. Detecção da Hidrólise Enzimática por Espectrofotômetro.

O ensaio de hidrólise do imipenem foi inicialmente padronizado com cepas controle, ou seja, cepas que sabidamente possuíam as enzimas KPC-2, IMP-1, VIM-1, NDM-1, SPM-1, OXA-72, OXA-48, OXA-58 e OXA-143. Uma das cubetas continha apenas o imipenem com o extrato bacteriano da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 (linha azul) a qual não possui carbapenemases, servindo de controle da degradação natural do imipenem ao longo do experimento, ou seja, sem ser devido a ação de uma carbapenemase. Os resultados são mostrados na figura abaixo.

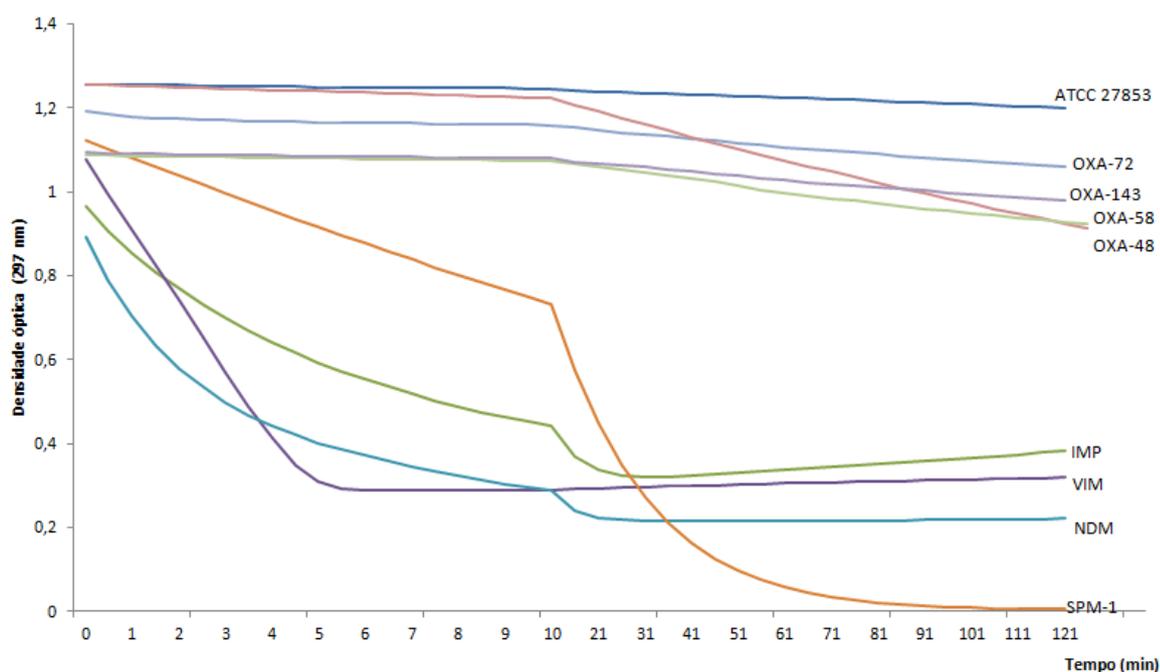


Figura 12 – Hidrólise enzimática do imipenem por cepas de referência. A linha azul mostra a estabilidade do imipenem adicionado apenas do extrato bacteriano da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. As outras linhas mostram o imipenem adicionado do extrato bacteriano de cada uma das cepas controles.

A cubeta contendo apenas imipenem e extrato da cepa ATCC 27853 (linha azul) apresentou uma discreta redução da D.O. durante o ensaio, mas insignificante em relação às demais cubetas. A diferença (Δ) entre a absorbância inicial e a absorbância final foi calculada com o intuito de padronizarmos um ponto de corte

para que uma amostra fosse considerada positiva. Os valores de Δ para as cepas controles são mostrados na tabela abaixo:

Tabela 5 – Valores de Δ das cepas controles

Amostra	Espécie bacteriana	Leitura inicial	Leitura final	Δ
OXA-48	<i>A. baumannii</i>	1,060883	0,435675	0,625208
OXA-58	<i>A. baumannii</i>	1,08754	0,915096	0,172444
OXA-72	<i>A. baumannii</i>	1,071387	0,953087	0,1183
OXA-143	<i>A. baumannii</i>	1,093257	0,970588	0,122669
NDM-1	<i>E. coli</i>	0,892757	0,220724	0,672033
IMP-1	<i>P. aeruginosa</i>	0,964133	0,381317	0,582816
SPM-1	<i>P. aeruginosa</i>	1,124174	0,006758	1,117416
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	1,07568	0,319125	0,756555

Como podemos observar o menor valor de Δ encontrado foi de 0,1183, referente à amostra produtora de OXA-72, sendo assim amostras com valor de Δ maior ou igual a 0,1183 foram consideradas positivas para o ensaio de hidrólise do imipenem.

Dentre as amostras de *Acinetobacter* spp, uma alta porcentagem dos isolados foi capaz de hidrolisar o antibiótico imipenem, cerca de 80% das cepas apresentaram atividade hidrolítica (88 isolados) e 20% não foram capazes de degradar o antibiótico (22 isolados).

Já dentre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* apenas uma pequena parcela foi capaz de degradar o antibiótico: 35,3%, ou 42 isolados clínicos. A grande maioria 64,7% (77 isolados) não apresentaram atividade hidrolítica. Ressaltando assim, que para essa espécie bacteriana, na amostragem analisada, outros mecanismos que não os enzimáticos são mais proeminentes para a determinação do fenótipo de resistência a essa classe de antibióticos.

A figura abaixo mostra um gráfico com o resumo dos resultados do teste de hidrólise enzimática, detectados por espectrofotometria, obtidos para os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa* testados nesse trabalho.

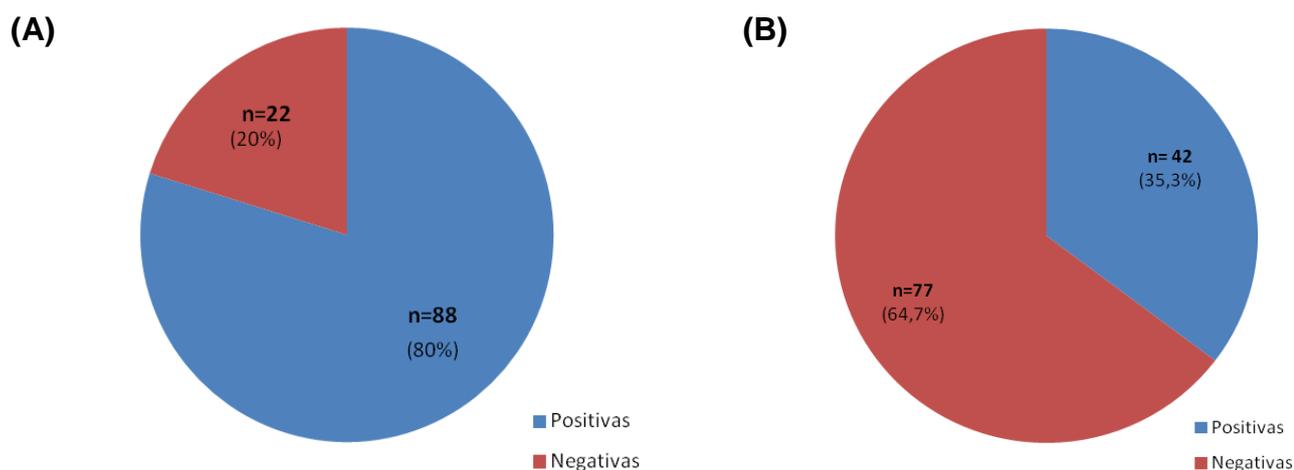


Figura 13 – Hidrólise enzimática do imipenem, por espectrofotometria. (A) Resultados obtidos com os isolados de *Acinetobacter* complexo *baumannii* e **(B)** Resultados obtidos com os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Detecção genotípica da produção de carbapenemases

A detecção genotípica de carbapenemases foi realizada nos isolados clínicos que apresentaram resultado positivo na detecção da hidrólise enzimática, por espectrofotometria.

As reações em cadeia da polimerase foram executadas conforme descrito no item Materiais e Métodos.

A tabela abaixo mostra os genes encontrados nos isolados de *Acinetobacter* spp.

Tabela 6 – Carbapenemases encontrados nos isolados de *Acinetobacter* spp.

Gene	Número de isolados
OXA-51-like	67
OXA-72	17
OXA-23	1
OXA-482	1
OXA-Nova	1
IMP-1 (<i>A. ursingii</i>)	1
TOTAL	88

Dos 110 isolados clínicos, 88 apresentaram hidrólise positiva e como podemos observar conseguimos determinar os genes de todos esses isolados. Todas as amostras apresentam pelo menos um gene da família OXA, confirmando assim a alta frequência desses genes em *Acinetobacter* spp. A única exceção foi o isolado de *Acinetobacter ursingii* que, interessantemente, apresentou o gene *bla*_{IMP-1}. Os resultados obtidos com esse isolado serão discutidos a seguir.

Os resultados genotípicos obtidos com as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentaram teste de hidrólise enzimática positiva são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 7 – Carbapenemases encontrados nos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

Genes	Número de isolados
<i>bla</i> _{SPM-1}	14
<i>bla</i> _{KPC-2}	1
<i>bla</i> _{IMP}	1
<i>bla</i> _{VIM}	1
<i>Bla</i> _{GES-23}	1
TOTAL	18

Das 119 amostras, apenas 42 apresentaram hidrólise enzimática positiva, dessas 4 tornaram-se inviáveis ao longo do estudo, o que impossibilitou sua caracterização genotípica. Dos 38 isolados restantes, 14 continham o gene SPM-1, o que é comum nessa espécie bacteriana no estado de São Paulo, 1 isolado apresentou o gene KPC-2, 1 o gene IMP, 1 o gene VIM e 1 isolado apresentou o gene GES-23. Interessantemente, não foi possível determinar o gene responsável pela hidrólise enzimática de 20 amostras que não apresentaram amplificação para nenhum dos genes testados, podendo assim indicar a presença de novas enzimas.

Vale ressaltar que o sequenciamento do entorno do gene SPM-1, das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* coletadas nesse estudo, mostrou que esse gene está flanqueado pelas sequências de inserção ISCR4 conforme descrito anteriormente por Picão e colaboradores em 2009.

4. Avaliação da relação clonal

4.1 ERIC-PCR amostras de *Acinetobacter baumannii* com hidrólise positiva

Para avaliar a relação clonal dos isolados de *Acinetobacter baumannii* com hidrólise positiva, foi realizada a extração do DNA e em seguida a reação de ERIC-PCR. A similaridade entre os perfis gerados foi avaliada utilizando-se o programa Bionumerics, com cálculo do coeficiente de Dice, 1% de otimização e tolerância. Foram interpretados como possivelmente relacionados os perfis com similaridade igual ou maior que 90% (GALETTI; DARINI, 2010).

A análise do perfil clonal das amostras de *Acinetobacter baumannii* com hidrólise positiva revelou a presença de 59 grupos clonais (Figura 14). As amostras que possuem a enzima OXA-72 estão destacadas com um quadrado vermelho, a amostra que possui a OXA-23 está destacada em verde, em amarelo a OXA-nova e em laranja a destacamos a OXA-482.

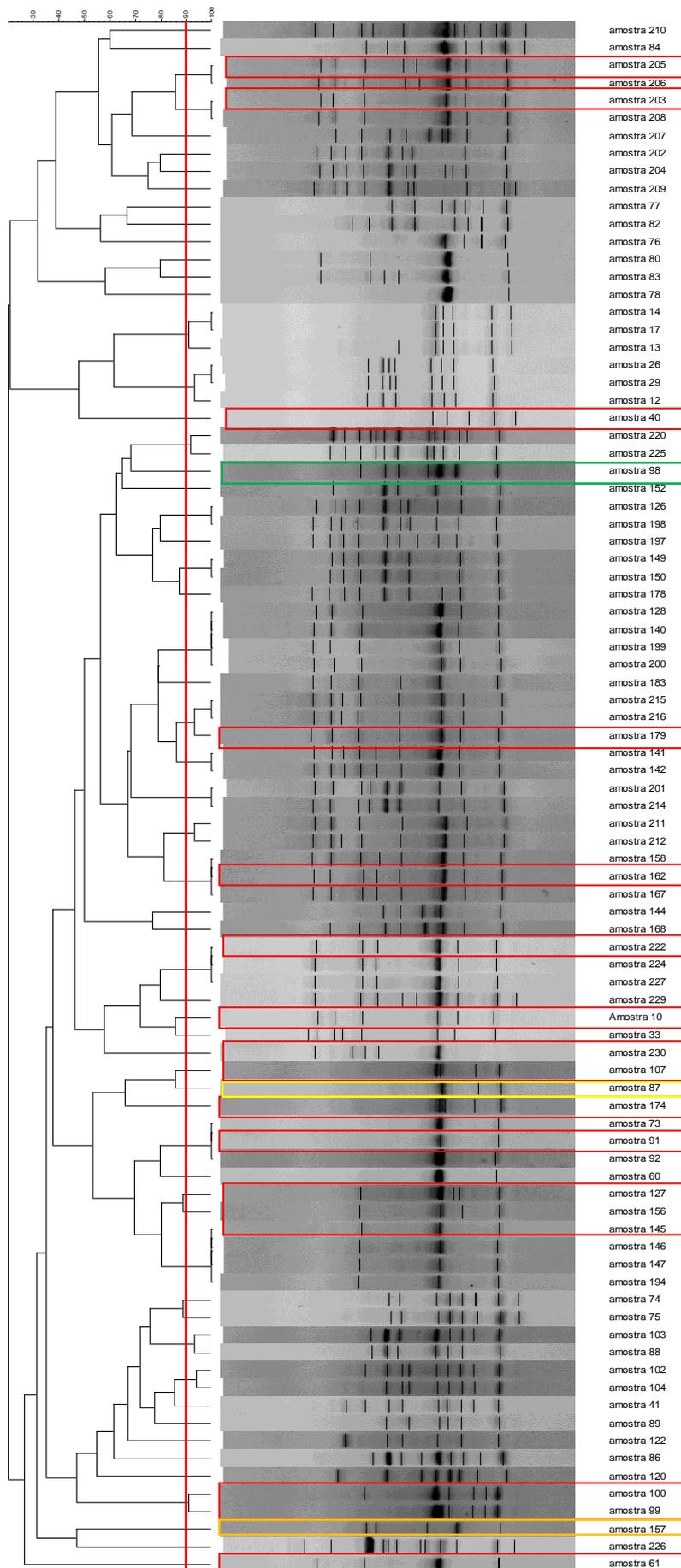


Figura 14 – Avaliação da clonalidade dos isolados do complexo *Acinetobacter baumannii* com hidrólise positiva. Linha vermelha evidenciando o limite de 90% de similaridade. As amostras que possuem a enzima OXA-72 estão destacadas com um quadrado vermelho, a amostra que possui a OXA-23 está destacada em verde, em amarelo a OXA-nova e em laranja a destacamos a OXA-482.

4.2 PFGE das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* com hidrólise positiva e gene desconhecido

Para avaliar a relação clonal entre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com hidrólise positiva e carbapenemase desconhecida foi realizada o PFGE conforme descrito no item materiais e métodos. A similaridade entre os perfis gerados foi avaliada utilizando-se o programa GelJ, com cálculo do coeficiente de Dice, 1% de otimização e tolerância. Foram interpretados como possivelmente relacionados os perfis com similaridade igual ou maior que 80% (TENOVER, 1995). Como podemos notar foram encontrados 19 perfis clonais, indicando que cada amostra pertence a um perfil clonal diferente.

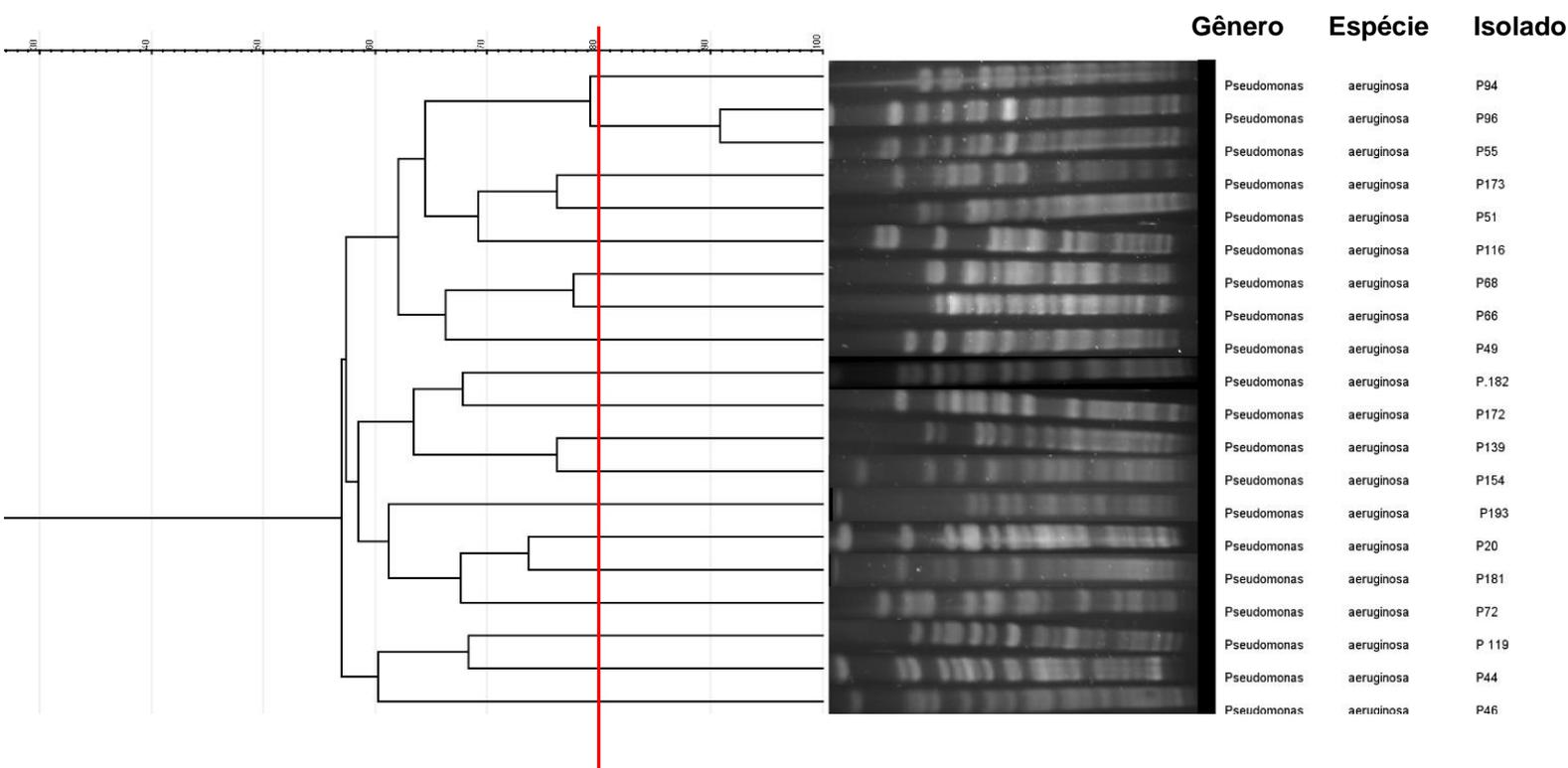


Figura 15 – Avaliação da clonalidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com hidrólise positiva e gene desconhecido. Linha vermelha evidenciando o limite de 80% de similaridade. A maioria dos isolados pertence a diferentes grupos clonais.

4.3 PFGE das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1}

Para avaliar a relação clonal entre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* albergando o gene *bla*_{SPM-1} também foi realizado o PFGE. A análise visual do perfil clonal dessas cepas evidenciou que todos os isolados analisados possuem perfis indistinguíveis, e pertencem, portanto, ao mesmo grupo clonal (TENOVER, 1995).

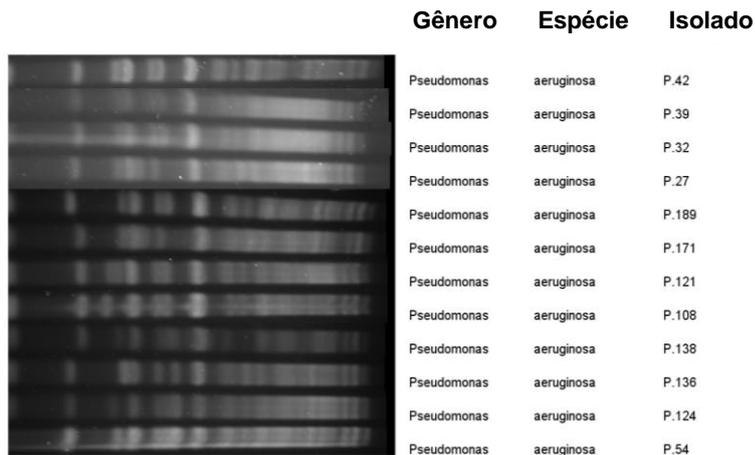


Figura 16 – Avaliação da clonalidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1}. Linha vermelha evidenciando o limite de 80% de similaridade.

5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* com hidrólise positiva e PCR negativa

A concentração inibitória mínima das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* com hidrólise positiva e PCR negativa para genes conhecidos de carbapenemases foi determinada. Os resultados são mostrados na Tabela abaixo.

Tabela 8 – Concentração inibitória mínima dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

Isolado	Imipenem		Meropenem		Cefepima		Ceftazidima	
	CIM	Categoria	CIM	Categoria	CIM	Categoria	CIM	Categoria
	($\mu\text{g/mL}$)	CLSI						
P. 20	16	R	32	R	32	R	32	R
P. 44	32	R	64	R	32	R	16	I
P. 46	16	R	64	R	32	R	32	R
P. 49	16	R	32	R	16	S	16	I
P. 51	16	R	32	R	64	R	>64	R
P. 55	16	R	32	R	64	R	64	R
P. 66	32	R	16	R	16	I	32	R
P. 68	16	R	8	R	4	S	4	S
P. 72	32	R	8	R	32	R	>64	R
P. 94	16	R	16	R	16	S	32	R
P. 96	32	R	32	R	64	R	>64	R
P. 116	8	R	4	I	4	S	2	S
P. 119	16	R	32	R	32	R	64	R
P. 139	16	R	32	R	64	R	>64	R
P. 154	2	S	4	I	32	R	8	S
P. 172	32	R	32	R	32	R	64	R
P. 173	16	R	16	R	16	I	64	R
P. 181	16	R	16	R	16	I	32	R
P. 182	32	R	>64	R	64	R	8	S
P. 193	16	R	>64	R	>64	R	32	R

Legenda: R – resistente; S – sensível.

Todas as amostras foram resistentes ao menos a um dos antibióticos testados. Apenas uma das amostras testadas apresentou sensibilidade ao imipenem.

6. *Acinetobacter ursingii* (D8143399)

Interessantemente, o isolado *Acinetobacter ursingii* (D8143399) apresentou uma expressiva e rápida hidrólise do imipenem, como mostrado na figura abaixo.

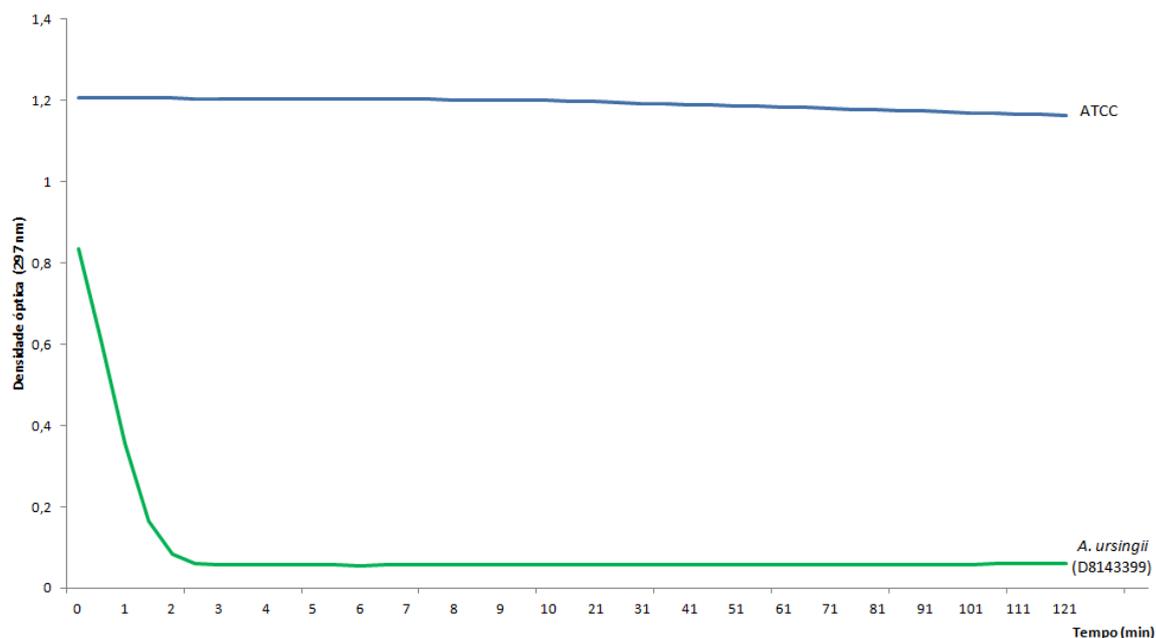


Figura 17 – Hidrólise enzimática do imipenem pelo *Acinetobacter ursingii* (D8143399). A linha azul mostra a estabilidade do imipenem adicionado apenas do extrato bacteriano da cepa *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 14987. A linha verde mostra a hidrólise do imipenem gerada pelo lisado bacteriano do *Acinetobacter ursingii* D8143399.

Com o intuito de investigarmos qual carbapenemase estava presente na amostra, as reações de PCR multiplex e as reações de sequenciamento foram realizadas, conforme descrito no item Materiais e Métodos. Adicionalmente, foram realizadas as reações de PCR e sequenciamento para os genes do integron de classe 1 utilizando-se os primers INT-5LCS: GGCATCCAAGCAGCAAG e INT-3LCS: AAGCAGACTTGACCTGA, confirmando assim a presença do gene *bla*_{IMP-1} na amostra, com 100% de similaridade com o depósito GQ864268.1 do GenBank. A identificação genômica da espécie bacteriana foi confirmada por sequenciamento parcial do gene da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) e do gene 16S rRNA.

Para analisarmos o entorno do gene *bla*_{IMP-1} utilizamos o programa Primer-Blast e desenhamos dois primers denominados IMP1-644-663-Fw (ACAGTGAAGTTGGAGACGCA) e aadA1-285-266-Rv (GTCGTCGTGCACAACAATGG). Posteriormente realizamos reações de sequenciamento com os produtos obtidos e verificamos a presença do gene *intl 1* na porção 5' e do gene *aacA31* na porção 3' seguido do gene *aadA1*. Os resultados obtidos estão esquematizados na figura abaixo.

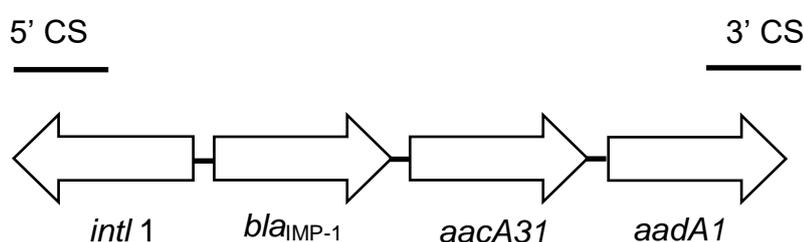


Figure 18 – Representação esquemática do integron de classe 1 com o gene *bla*_{IMP-1} no *Acinetobacter ursingii* (D8143399). As setas indicam as orientações de transcrição dos genes.

As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas conforme descrito no item Material e Métodos. O isolado mostrou ser resistente aos antibióticos ceftazidima (≥ 32 mg/L) e cefepima (≥ 128 mg/L), mas susceptível aos antibióticos meropenem (4,0 mg/L), polimixina B (0,25 mg/L) e imipenem (4 mg/L).

Até o momento, poucos relatos de infecção causados por *Acinetobacter ursingii* estão disponíveis, e há apenas um relato na literatura desta espécie com a carbapenemase IMP-1, isolada no Japão (ENDO, 2012). Descrevemos aqui a primeira detecção de *bla*_{IMP-1} em *Acinetobacter ursingii* no Brasil.

7. *Pseudomonas aeruginosa* (D5170990)

A amostra de *Pseudomonas aeruginosa* (D5170990) também apresentou uma rápida e expressiva hidrólise do antibiótico imipenem. A análise genotípica mostrou que esse isolado possui o gene *bla*_{KPC-2}. Foi realizada a extração de plasmídeos e a posterior eletroporação.

O teste fenotípico utilizando-se inibidores enzimáticos foi feito para a amostra selvagem e para os seus transformantes (Figura 19).

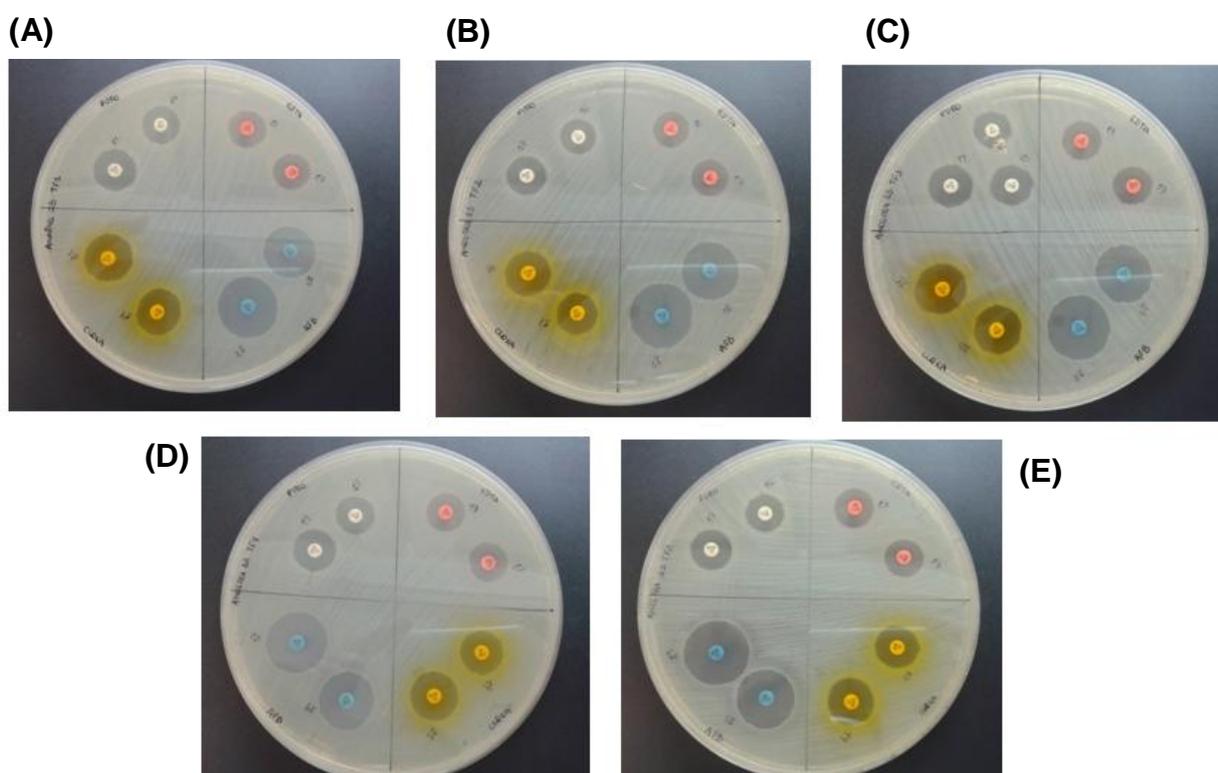


Figura 19 – Teste fenotípico dos transformantes da *Pseudomonas aeruginosa* (D5170990). (A) transformante 1; (B) transformante 2; (C) transformante 3; (D) transformante 4 e (E) transformante 5. Os inibidores utilizados foram o ácido fenilborônico - AFB (40mg/mL), discos coloridos de azul; a cloxacilina – CLOXA (75mg/mL), discos amarelos e o EDTA (0,1M), discos vermelhos; os discos brancos não possuem nenhum inibidor associado.

A cepa selvagem foi resistente a ambos os antibióticos testados, imipenem e meropenem, não apresentando aumento no halo de inibição com nenhum dos inibidores enzimáticos (EDTA, cloxacilina e ácido fenilborônico). A figura 19 mostra o

teste fenotípico realizado com os seus transformantes. Houve aumento do diâmetro do halo maior que 5 mm com ácido fenilborônico.

A sequência completa do plasmídeo albergando o gene foi obtida utilizando-se o sistema Illumina, conforme descrito no item Material e Métodos. A figura abaixo mostra a representação esquemática desse plasmídeo, que foi depositado no Genbank e pode ser acessado através do número KX169264. Comparando-se a sequência nucleotídica completa (32.424 pares) com aquelas disponíveis na base de dados PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface.fcgi?jobid=5724C274000026F201089F4E>), foi evidenciado que o plasmídeo tem 99,5% similaridade com o gene *repB* de plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncU e possui um operon *trb* incompleto, o que confirma os achados dos experimentos de conjugação que não obtiveram sucesso.

O plasmídeo possui ainda os dois genes do sistema toxina-antitoxina Doc-PhD, implicados na estabilidade do plasmídeo (nucleotídeos 13.975 a 14.534). Possui um integron classe 1 com gene *aacA7*, de uma acetil-transferase que codifica resistência à amicacina (nucleotídeos 10.580 a 13.609).

A região que contém o gene *bla*_{KPC-2} está flanqueada à montante pela IS6100 e à jusante pela ISKpn6. Como esta estrutura é diferente daquelas descritas anteriormente, mesmo para *P. aeruginosa*, para confirmação foram desenhados *primers* (Tabela 9) e realizadas reações de PCR e sequenciamento pelo método de Sanger.

Tabela 9 – Primers utilizados para reações de PCR para confirmação do entorno do gene *bla*_{KPC-2}

Designação	Sequencia Nucleotídica - 5'- 3'
korC-ISKpn6-4064FW	CGTTCGCTGAAGATTGGCAG
ISKpn6-korC-5217RV	ACCGCCTTGATCCAACCATT
ISKpn6- <i>bla</i> KPC-4956FW	AGGCCAACACCGGAGAAATG
<i>bla</i> KPC-ISKpn6-6317RV	TGTGTACGCGATGGATACCG
<i>bla</i> KPC-IS6100-5968FW	CCAGACGGAACGTGGTATCG
IS6100- <i>bla</i> KPC-7392RV	TCGATTTCTACCTGTGCCG
IS6100-Tn5564-7079FW	TCGCATGACTTCGAATCCCTT
Tn5564-IS6100-8396RV	CAACGGGTCGGCATAACAGAT
Tn5564-cmx-8224FW	GTTTCGGCCTCTGAACCGTAA
cmx-Tn5564-9438RV	CTGACAGGCTGGATCGTGTT
cmx-sul1-9261FW	TATTCAATGCTGCGGTTGCG
sul1-cmx-10769RV	CACCGTTGGCCTTCCTGTAA

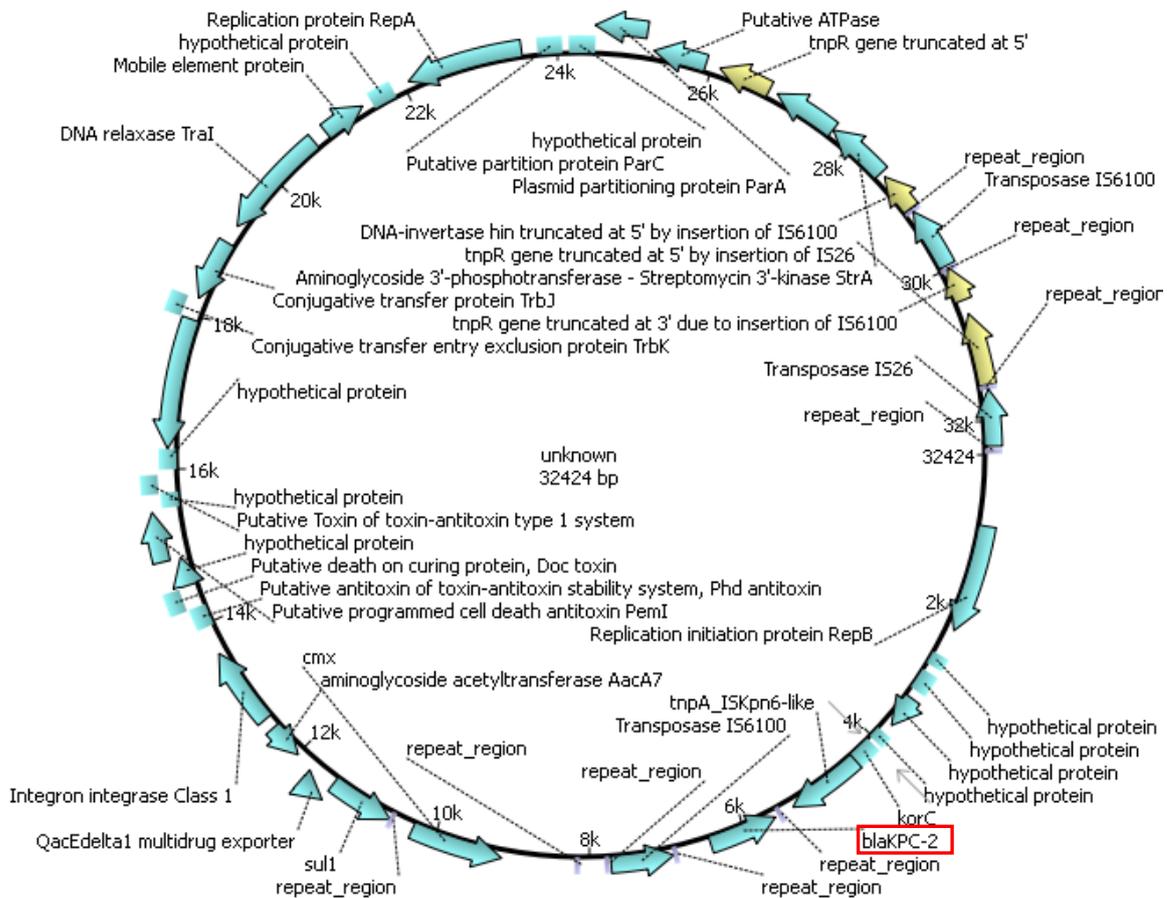


Figura 20 – Representação esquemática do plasmídeo da cepa *Pseudomonas aeruginosa* (D5170990).

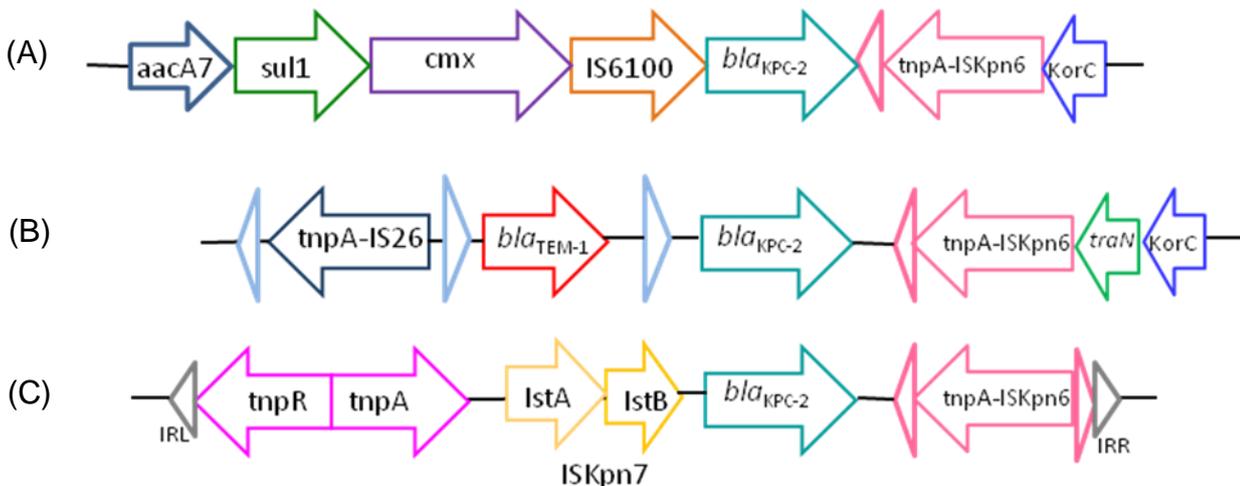


Figura 21 – Comparação da estrutura do entorno do gene *bla*_{KPC-2} detectado no Brasil com aqueles já descritos na Colômbia. (A) Plasmídeo descrito neste trabalho, isolado de uma amostra do Brasil; (B) Plasmídeo pPA-2; (C) Plasmídeo pCOL-1, ambos isolados na Colômbia.

8. *Acinetobacter* complexo *baumannii* (D7292589) – OXA nova

Para confirmarmos a sequência do gene encontrada na amostra D7292589 novos amplificadores foram desenhados nesse trabalho, conforme descrito na tabela abaixo:

Tabela 10 – Primers utilizados para reações de PCR para confirmação do gene da amostra D7292589

Designação	Sequencia Nucleotídica - 5'- 3'
blaOXA489_248_64FW	TGTTGAATGCCCTGATCGGA
blaOXA489_out_948_25RV	CCATTTATCTCAAATGGGCTTTTT
blaOXA252_71FW	GAATGCCCTGATCGGATTGG
blaOXA_489_out_817R	AGAGTTTCTGTCAAGCTCTTAAATA
blaOXA_489_822_797R	TTAAATAATATTCAGCTGTTTTAATG
blaOXA489_19_43FW	CATGAGTTATCTATTTTTGTCTGT
blaOXA489_664RV	CCATTGCCCAACCAGTCTTT

O sequenciamento mostrou uma única diferença entre as sequências de nucleotídeos da amostra D7292589 com o gene da enzima OXA-482, essa diferença foi encontrada na posição 424, havendo substituição de uma fenilalanina por uma leucina (Figura 22).



Figura 22 – Comparação entre as sequências de nucleotídeos da amostra D7292589 e do gene blaOXA-482. Uma única diferença na posição 424 foi encontrada na amostra isolada nesse estudo.

V. Discussão

Vivemos atualmente uma grave crise de resistência a antibióticos, sendo que é cada vez maior o número de isolados clínicos resistentes a múltiplos fármacos, incluindo os carbapenêmicos, que são considerados fármacos de última escolha. Essa ocorrência é considerada atualmente um grave problema de saúde pública (WHO, 2004; ROSSOLINI, 2014). Esse cenário ressalta a necessidade do constante monitoramento e controle de cepas resistentes; para isso é de fundamental importância sabermos quais são os mecanismos de resistência normalmente encontrados no Brasil.

Um dos mecanismos de resistência mais preocupante em bacilos Gram-negativos, é a produção de β -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar os antibióticos β -lactâmicos, fármacos amplamente utilizados. Em particular pelo fato de que o espectro de um grupo dessas enzimas inclui antibióticos de escolha para infecções graves, como os carbapenêmicos (PAPP-WALLACE, 2011; BUSH, 2013).

Selecionamos para esse estudo cepas de *Acinetobacter* complexo *baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, dois dos principais bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose, resistentes ao imipenem pela técnica de disco-difusão. Padronizamos o ensaio de hidrólise enzimática do imipenem, por espectrofotometria, para avaliarmos se a resistência apresentada ocorria devido a mecanismos enzimáticos ou a outros mecanismos relacionados à membrana dessas bactérias, como alterações na permeabilidade, hiperexpressão de bombas de efluxo ou pela alteração do alvo de ação dos antibióticos (TENOVER; 2006).

A análise fenotípica das cepas de *Acinetobacter* complexo *baumannii* mostrou que o mecanismo de resistência mais comum é a produção de β -lactamases, uma vez que 80% dos isolados (88 isolados) apresentaram positividade para o teste de hidrólise enzimática do imipenem, sendo que os genes da família OXA foram amplamente detectados.

Em nossa amostragem o principal gene encontrado foi o da carbapenemase *bla*_{OXA-51-like}, grupo com 95 variantes identificadas até o momento. Apesar desse grupo enzimático ser considerado intrínseco para a espécie *Acinetobacter baumannii*, por ser codificado em seu cromossomo, não pôde ser considerado

benigno, pois apresentam um importante papel em sua resistência, principalmente quando o seu contexto genético promove sua expressão (EVANS; AMYES, 2014).

Apenas duas enzimas desse grupo tiveram seus parâmetros cinéticos avaliados, frente aos antibióticos imipenem e meropenem, a OXA-51 e a OXA-69, apesar de terem demonstrado uma baixa atividade hidrolítica *in vitro*, ensaios *in vivo* mostram que essas enzimas podem aumentar a CIM para carbapenêmicos desses isolados conferindo assim resistência. Vale ressaltar que mais testes devem ser realizados com outras enzimas para uma melhor caracterização do grupo, pois através dessas enzimas todos os isolados de *A. baumannii* podem se tornar resistentes aos carbapenêmicos (EVANS; AMYES, 2014). Um aspecto relevante recentemente discutido no trabalho de Antunes e colaboradores (2014) é quanto ao nível de expressão em *Escherichia coli*, de genes originalmente detectados em *Acinetobacter*. Esses autores demonstraram que OXA-2 e OXA-10, originalmente classificadas como de espectro estreito com base no fenótipo obtido em *E. coli*, quando expressas em *A. baumannii* ATCC 17978, levam à resistência aos carbapenêmicos. Atualmente as carbapenemases de classe D estão subdivididas em subgrupos cujos representantes principais são: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58 e OXA-143. A maioria absoluta delas, excetuando OXA-48, tem sido detectada ou foi originalmente detectada em *A. baumannii*.

O perfil clonal dessas amostras produtoras de enzimas da família OXA-51 revelou uma grande diversidade, 59 grupos clonais. Este achado contrasta com descrições de surtos monoclonais em instituições públicas do Brasil (TAKAGI et al., 2009; DALLA-COSTA et al., 2003; CHAGAS et al., 2014). Uma das possibilidades para a diferença encontrada pode ser o nível de adesão a medidas de precaução de contato e ou desinfecção terminal nas diferentes instituições. Outra possibilidade é que a maioria dos estudos utilizou a PFGE, enquanto neste estudo foi utilizada a ERIC-PCR.

Em nosso estudo, outra enzima que apresentou uma alta frequência de isolamento foi a OXA-72, um dos sete membros do grupo OXA-40/24-like, que tipicamente conferem resistência aos antibióticos carbapenêmicos (EVANS; AMYES, 2014). Nossos achados estão em conformidade com as descrições de disseminação desse patógeno no Brasil. Desde a primeira descrição no Brasil em 2011

(WERNECK et al., 2011), vários trabalhos tem demonstrado a disseminação de *A. baumannii* produtores dessa enzima no Brasil, sendo a descrição mais recente de Pagano e colaboradores (2016).

Das 88 amostras do complexo *Acinetobacter baumannii* com hidrólise positiva apenas uma apresentou o gene *bla*_{OXA-23}, uma o gene *bla*_{OXA-482} e um isolado apresentou uma OXA semelhante à OXA-482, diferindo apenas em um nucleotídeo na posição 424 do gene *bla*_{OXA}, que leva à substituição de fenilalanina por uma leucina na proteína. Os dois aminoácidos são apolares, o que sugere não haver alteração estrutural ou funcional significativa na proteína, pois a posição não corresponde a nenhum dos resíduos críticos para a atividade enzimática (KAITANY et al., 2013). A OXA-482 tem depósito no GenBank (referência KP264124), foi detectada em *A. baumannii* na China, mas ainda não há artigo indexado com sua descrição detalhada.

Vale destacar que depois que ocorreu a introdução dos carbapenêmicos na prática clínica e da grande disseminação das cepas de *A. baumannii*, houve uma verdadeira explosão de novas enzimas do grupo OXA, que na maioria das vezes são estritamente relacionadas entre si. A possibilidade de migração desses genes, para elementos genéticos móveis, tornou essas enzimas o principal mecanismo de resistência para o *Acinetobacter baumannii* e também para outras espécies do gênero (EVANS; AMYES, 2014).

Outro interessante achado foi o *Acinetobacter ursingii* isolado do sangue de um paciente internado em um hospital particular na cidade de São Paulo. Esse isolado apresentou uma expressiva e rápida hidrólise do imipenem. Vimos que essa amostra é produtora da enzima IMP-1 e que o gene que a codifica está inserido em integron de classe-1. Integrons de classe 1 tem sido descritos em diferentes espécies como *A. baumannii*, *A. junii* e *A. pittii*, e em outros bacilos Gram-negativos não fermentadores, a exemplo de *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, assim como em *Enterobacteriaceae* (<http://integrall.bio.ua.pt/?search&ob=org>). Apesar da presença em diferentes espécies e gêneros bacterianos, integrons não são considerados elementos genéticos móveis, mas um sistema de captura de genes. Podem ser transferidos de localização no genoma ou entre espécies e gêneros bacterianos quando localizados

em transpósons ou plasmídeos (MAZEL, 2006). Vale ressaltar que existe apenas um relato de *Acinetobacter ursingii* produtor de IMP-1 no Japão (ENDO et al., 2012), sendo este o primeiro relato do continente Americano nesta espécie.

No Brasil, em *Pseudomonas aeruginosa*, o fenótipo multirresistente ocorre principalmente devido à produção da metallo-beta-lactamases do tipo SPM-1, da metilase 16S rRNA RmtD, que confere resistência aos aminoglicosídeos, e devido a mecanismos relacionados à impermeabilidade da membrana celular bacteriana, como a perda de porinas e a superexpressão das bombas de efluxo (NEVES et al, 2011). Na amostragem estudada neste trabalho, a alteração de permeabilidade e/ou superexpressão de bombas de efluxo são os principais mecanismos, uma vez que apenas 35,3% (42 isolados) das cepas analisadas apresentaram o teste de hidrólise positivo, dentre essas, a análise genotípica revelou que 14 apresentaram a enzima SPM-1.

Para verificarmos qual seria o entorno do gene *bla*_{SPM-1} dessas amostras, realizamos a reação em cadeia da polimerase (PCR) inicialmente para o integron de classe 1, mas nenhuma das amostras apresentou amplificação com esses iniciadores. Novos iniciadores foram desenhados e foi possível demonstrar que esse gene está flanqueado pelas sequências de inserção *ISCR4*. Picão e colaboradores já haviam descrito esse contexto genético para o gene *bla*_{SPM-1}, em 2009; portanto nossos dados confirmam os achados anteriores. Para analisarmos a relação clonal existente, essas amostras foram analisadas por PFGE, que revelou que os isolados de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 eram estreitamente relacionadas. Os achados neste estudo confirmam a descrição prévia de Gales e colaboradores que evidenciaram a disseminação desse clone no Brasil em publicação de 2003. É intrigante a persistência desse clone após 10 anos, assim como a virtual ausência de variantes do gene *bla*_{SPM-1}.

Interessantemente, 20 isolados clínicos que se mostraram resistentes ao imipenem e com o teste de hidrólise positivo não apresentaram amplificação para nenhum dos genes testados, o que pode significar que podemos estar diante de novas carabapenemases. A análise do perfil clonal desses isolados identificou 19 grupos clonais distintos, sendo que os dois isolados pertencentes ao mesmo grupo clonal foram isolados no mesmo hospital, ambos foram provenientes de secreção

traqueal, de pacientes distintos, um isolado em abril e o outro em maio de 2013, o que indica a persistência do mesmo clone no ambiente hospitalar.

A análise genotípica dos isolados de *P. aeruginosa* também revelou a presença das enzimas IMP, VIM e GES-23, sendo um isolado de cada. A PCR para pesquisa do integron de classe 1 foi realizada para os isolados produtores das enzimas IMP e VIM e não houve amplificação, indicando que esses genes não possuem esse contexto genético ou que houve uma modificação nessas regiões o que impossibilitou sua amplificação. Uma limitação deste estudo é que esses isolados não foram estudados por sequenciamento completo do genoma, o que possibilitaria a elucidação do contexto genético desses genes.

Foi testada a concentração inibitória mínima das cepas que apresentaram hidrólise do imipenem positiva, com gene desconhecido, para os antibióticos imipenem, meropenem, cefepima e ceftazidima. Digno de nota poucos isolados apresentaram CIM para carbapenêmicos igual ou maior que 64 mg/L, o que sugere a presença de carbapenemases com menor poder de hidrólise do que aquele observado para metalo- β -lactamases em *P. aeruginosa* (RIZEK et al, 2014).

Outro interessante achado, entre os isolados obtidos nesse trabalho, foi a cepa de *P. aeruginosa* albergando o gene *bla*_{KPC-2}. Essa cepa foi isolada do sangue de um paciente internado após ser submetido a uma cirurgia no ombro, local onde já havia sido isolado uma cepa de *Acinetobacter* complexo *baumannii* albergando o gene *bla*_{OXA-51-like}. O plasmídeo dessa amostra foi extraído, introduzido por eletroporação em *E. coli*, e posteriormente sequenciado pelo sistema Illumina. Descrevemos neste trabalho um novo contexto genético para o gene *bla*_{KPC-2}, que normalmente encontra-se inserido no transpósion Tn4401, que possui a uma alta frequência de transposição, sendo encontrado em uma grande variedade de plasmídeos o que justifica a rápida disseminação desse gene principalmente entre os isolados da família das Enterobactérias.

Nass e colaboradores caracterizaram a estrutura dos dois primeiros plasmídeos contendo o gene *bla*_{KPC-2} isolados em *P. aeruginosa*, ambos provenientes da Colômbia. Um dos plasmídeos (pCOL-1) possui o tamanho aproximado de 40kb e apresenta a isoforma Tn4401b, enquanto o segundo plasmídeo (pPA-2) mostrou ter um contexto genético diferente para o gene *bla*_{KPC-2}

possuindo um tamanho aproximado de 10kb. A sequência nucleotídica completa do plasmídeo isolado nesse trabalho possui 32.424 pares de bases.

Ao compararmos o entorno do gene *bla*_{KPC-2} nos três plasmídeos (pCOL-1, pPA-2 e o isolado neste trabalho), notamos que todos apresentam à direita do gene da transposase ISKpn6, sendo que o plasmídeo descrito nesse trabalho e o pPA-2 também possuem o gene *korC* que atua como repressor transcricional. A região à montante do gene *bla*_{KPC-2} mostra-se diferente nos três plasmídeos analisados. O plasmídeo isolado no Brasil apresenta a transposase IS6100, enquanto o plasmídeo pPA-2 o gene que codifica a β-lactamase TEM-1 e o pCOL-1 a transposase ISKpn7.

É importante notar que a presença desse gene em diferentes contextos genéticos, nos isolados de *P. aeruginosa*, sugere uma rápida disseminação desse mecanismo de resistência, semelhante àquela encontrada em *Enterobacteriaceae*.

Interessantemente, o plasmídeo descrito nesse trabalho também apresenta os genes *cmx* que codifica a bomba de efluxo para cloranfenicol e o gene *aacA7* que codifica a enzima acetil-transferase, gerando resistência à amicacina. Assim como os plasmídeos descritos na Colômbia, o plasmídeo caracterizado nesse trabalho não apresenta genes conjugativos, o que limita a sua mobilidade entre amostras bacterianas. Esse foi o primeiro sequenciamento completo de um plasmídeo contendo o gene *bla*_{KPC-2} isolado de uma amostra de *P. aeruginosa* isolada no Brasil.

Atualmente estamos vivenciando uma grave crise de resistência bacteriana, que ocorre principalmente devido à rápida disseminação de genes que codificam mecanismos de resistência. Dentre esses mecanismos devem ganhar destaque a produção de carbapenemases, por codificarem resistência a antibióticos considerados de última escolha para infecções graves. Nesse contexto, é de extrema importância a rápida e precisa identificação dos mecanismos de resistência de uma determinada amostra, para que isso ocorra de maneira mais rápida e eficaz devemos inicialmente conhecer quais são os mecanismos de resistência disseminados em nossa região, com isso medidas de contenção e controle desses patógenos podem ser rapidamente aplicadas evitando assim possíveis surtos.

Os achados deste trabalho evidenciam que o uso de iniciadores para genes de carbapenemases atualmente conhecidos não é suficiente para detecção de

grande parte das carbapenemases presentes em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* no Brasil.

VI. Conclusões

1. O mecanismo de resistência aos carbapenêmicos mais frequente nos isolados do complexo *Acinetobacter baumannii* foi o enzimático, sendo que o gene *bla*_{OXA-51-like} foi o mais frequentemente detectado.
2. O mecanismo de resistência aos carbapenêmicos mais frequente nos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram outros que não a produção de carbapenemases. O gene com maior prevalência nas amostras analisadas foi *bla*_{SPM-1}.
3. As amostras de *P. aeruginosa* que albergam o gene *bla*_{SPM-1} pertencem a um mesmo grupo clonal. Em contraste, as amostras nas quais não foram detectados genes de carbapenemase apresentam grande diversidade clonal.
4. Na amostragem do complexo *Acinetobacter baumannii* foi observada uma grande diversidade clonal.
5. Foram detectados pela primeira vez no Brasil os genes *bla*_{OXA-482} e *bla*_{OXA-482-like} em *A. baumannii*.
6. Foi detectado pela primeira vez nas Américas *Acinetobacter ursingii* albergando o gene *bla*_{IMP-1}.
7. A sequência nucleotídica completa do plasmídeo IncU D5170990 evidenciou um novo contexto genético do gene *bla*_{KPC-2} em *P. aeruginosa*;
8. Há potencialmente um grande número de novas carbapenemases em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. em amostras da cidade de São Paulo.

VII. Referências Bibliográficas

ALMASAUDI, S.B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamase. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v. 289, n. 1036, p.321-331. 1980.

ANTONIO, C. S. **Prevalência de genes codificadores de carbapenemases em isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* recuperados de amostras clínicas de hospitais do Sudeste e Sul do Brasil**. 2010. 113 (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ANTUNES, N.T.; LAMOUREAUX, T.L.; TOTH, M.; STEWART, N.K.; FRASE, H.; VAKULENKO, S.B. Class D β -lactamases: are they all carbapenemases? **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 58, n. 4, p. 2119-2125, 2014.

ANVISA. Nota Técnica N. 1/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias Multiresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online] 17 de Abril de 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word++NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013%281%29.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 22 de dez. de 2014.

BASSETTI, M.; GINOCCHIO, F.; MIKULSKA, M. New treatment options against gram-negative organisms. **Crit Care**. v. 15, n. 2, p. 215, 2011.

BELKUM, A.; PELT-VERKUIL, E.; HAYS, J.P. The application of randomly amplified DNA analysis in the molecular epidemiology of microorganisms. **Methods Mol Biol.**; V. 551, p. 37-47, 2009.

BERTONCHELI, C.M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 44, n. 4, p. 577-599, 2008.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**. v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BOU, G.; OLIVER, A.; MARTÍNEZ-BELTRÁN, J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Antimicrob Agents Chemother**. v.44, n.6, p.1556-1561, 2000.

BRINK, A. J.; FELDMAN, C.; GROLMAN, D. C.; MUCKART, D.; PRETORIUS, J.; RICHARDS, G. A.; SENEKAL, M.; SIELING, W. Appropriate use of the carbapenems. **S Afr Med J**. v. 94, n.10, Pt 2, p. 857-61, 2004.

BUSH K.; Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1277, n. 1, p. 84-90, 2013.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Crit Care**. v. 14, n. 3, p. 224, 2010.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. **Annu Rev Microbiol**. v. 65, p. 455-478, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, 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, 2016.

BUSH, K.; SINGER, S.B. Effective cooling allows sonication to be used for liberation of beta-lactamases from gram negative bacteria. **J Antimicrob Chemother**. v. 24, n.1, p.82-84,1989.

CANEIRAS, C.; MARCOS, C.; FERREIRA, T.; HANSCHIED, T.; MELO-CRISTINO, J.; DUARTE. A. Bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*. **RPDI**. v. 6, n 2, 2010.

CARRARA-MARRONI, F.E.; CAYÔ, R.; STRELING, A.P.; DA SILVA, A.C.; PALERMO, R.L.; ROMANIN, P.; VENÂNCIO, E.; PERUGINI, M.R.; PELISSON, M.; GALES, A.C. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **J Glob Antimicrob Resist**. v. 3, n 4, p. 304-306, 2015

CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; NICOLETTI, A.G.; XAVIER, D.E.; GALES, A.C. Cloverleaf test (modified Hodge test)for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: beware of false positive results. **J Antimicrob Chemother**. v.65, n.2, p. 249-251, 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S. "Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**. v.68, n.12, p.2956-2957, 2013.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. A.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. ; SCHMIDT, F. J. . Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n.12, p. 4654-4661, 2004.

Center for Disease Control and Prevention – CDC. **Antibiotic / Antimicrobial Resistance**. Disponível em <<http://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>>. Acesso em 13 set. 2012.

CHAGAS, T.P.; CARVALHO, K.R.; DE OLIVEIRA SANTOS, I.C.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; ASENSI, M.D. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 79, n. 4, p. 468-472, 2014.

CHEN, Y.; ZHOU, Z.; JIANG, Y.; YU, Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. **J Antimicrob Chemother**. v. 66, n. 6, p. 1255-1259, 2011.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013. 2013.

_____. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eleventh Edition; M07-A9 -Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition; and M11-A8 - Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard - Eighth Edition are followed. 2014a.

_____. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. 2014b.

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G.M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? **Lancet Infect Dis**. v.11, n.5, p.381-93, 2011.

DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A.; CASTRO, M.E.; STIER, C.J.; BRAGAGNOLO, K.L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S.R.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n. 7, p. 3403-3406, 2003.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 490-5, 2010.

DALMARCO, E. M.; SOLANGE LÚCIA BLATT, S. L.; CÓRDOVA, C. M. M. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. **RBAC**. v. 38, n. 3, p. 171-177, 2006.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by using a biochemical test. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 56, n.12, p.6437-6440, 2012.

ENDO, S.; SASANO, M.; YANO, H.; INOMATA, S.; ISHIBASHI, N.; AOYAGI, T.; HATTA, M.; GU, Y.; YAMADA, M.; TOKUDA, K.; KITAGAWA, M.; KUNISHIMA, H.; HIRAKATA, Y.; KAKU, M.; IMP-1-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter ursingii* from Japan. **J Antimicrob Chemother**. v. 67, n. 10, p: 2533-2534, 2012.

ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A.; YAO, J. D.; WENGENACK, N. L.; ROSENBLATT, J. E.; COCKERILL, F. R.; SMITH, T. F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clin Microbiol Rev**. v. 19, n. 1, p. 165-256, 2006.

EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters - Version 4.0. 2014.

EVANS, B.A.; AMYES, S.G. OXA β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**. v.27, n.2, p. 241-63, 2014.

GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J. Antimicrob. Chemother**. v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GALETTI, R. **Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos**. 2010. (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GIBB, A. P.; TRIBUDDHARAT, C.; MOORE, R. A.; LOUIE, T. J.; KRULICKI, W.; LIVERMORE, D. M.; PALEPOU, M. F.; WOODFORD, N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla (IMP-7). **Antimicrob Agents Chemother.** v. 46, n. 1, p. 255-258, 2002.

HANCOCK, R.E.; BRINKMAN, F.S.; Function of pseudomonas porins in uptake and eff lux. **Annu Rev Microbiol.** v. 56, p.17-38, 2002.

HARDY, K. **Bacterial Plasmids.** Washington, American Society for Microbiology, 1986.

HIGGINS, P. G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents.** v. 35, n. 3, p. 305, 2010.

HONG, D.J.; BAE, I.K.; JANG, I.H.; JEONG, S.H.; KANG, H.K.; LEE, K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Chemother.** v.47, n.2, p. 81-97, 2015.

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

JAMES, C. W.; GURK-TURNER, C. Cross-reactivity of beta-lactam antibiotics. **Proc (Bayl Univ Med Cent).** v. 14, n. 1, p. 106-107, 2001.

KAASE, M.; NORDMANN, P.; WICHELHAUS, T. A.; GATERMANN, S. G.; BONNIN, R. A.; POIREL, L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. **J Antimicrob Chemother.** v. 66, n. 6, p.1260-1262, 2011.

KAITANY, K.C.; KLINGER, N.V.; JUNE, C.M.; RAMEY, M.E.; BONOMO, R.A.; POWERS, R.A.; LEONARD, D.A. 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, n. 10, p. 4848-4855, 2013.

KASSAMALI, Z.; JAIN, R.; DANZIGER, L.H. An Update on the arsenal for multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: Polymyxin antibiotics. **Int J Infect Dis.** p.1- 8, 2014.

KATTAN, J. N.; VILLEGAS, M. V.; QUINN, J. P. New developments in carbapenems. **Clin Microbiol Infect.** v. 14, n. 12, p. 1102-1111, 2008.

KIM, U.J.; KIM, H.K.; NA, J.H.; CHO, S.K.; PARK, K.H.; JANG, H.C. Update on the epidemiology, treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. **Chonnam Med J.** v.50, n.2, p.37-44, 2014.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LEE, K.; YONG, D.; JEONG, S. H.; CHONG, Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. **Yonsei Med J.** v. 52, n. 6, p. 879-891, 2011.

LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 49, n.11, p. 4485-4491, 2005.

LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. **Korean J Intern Med.** v. 27, n. 2, p. 128-142, 2012.

MAIWALD, M. Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. **American Society for Microbiology**, 2004.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nat. Ver. Microbiol.** v. 4, n. 8, p. 608-620, 2006.

MENDES, R. E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Metallo- β -lactamases. **J Bras Patol Med Lab.** v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MENDES, R. E.; KIYOTA, K. A.; MONTEIRO, J.; CASTANHEIRA, M.; ANDRADE, S. S.; GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C.; TUFIK, S. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **J Clin Microbiol.** v. 45, n.2, p. 544-547, 2007.

MILLER, J.H. Experiments in molecular genetics. New York. Cold Spring Harbor. 1992.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

MONTEIRO, J.; WIDEN, R. H.; PIGNATARI, A. C.; KUBASEK, C.; SILBERT, S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **J Antimicrob Chemother.** v. 67, n. 4, p. 906-909, 2012.

NAAS, T.; BONNIN, R.A.; CUZON, G.; VILLEGAS, M.V.; NORDMANN, P. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother.** v.68, n.8, p.1757-1762, 2013.

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

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

OSTERBLAD, M.; HAKANEN, A.J.; JALAVA, J. Evaluation of the Carba NP Test for Carbapenemase Detection. **Antimicrob Agents Chemother.** v.58, n.12, p.7553-7556, 2014.

PAGANO, M.; ROZALES, F.P.; BERTOLINI, D.; ROCHA, L.; SAMPAIO, J.L.; BARTH, A.L.; MARTINS, A.F. Emergence of *Acinetobacter baumannii* ST730 carrying the *bla*_{OXA-72} gene in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 111, n. 9, p. 597-598, 2016.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.

PATERSON, D.L; BONOMO, R.A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. **Clin Microbiol Rev.** v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PICÃO, R.C.; POIREL, L.; GALES, A.C.; NORDMANN, P. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v.53, n.9, p.3908-13, 2009.

PILLONETTO, M.; AREND, L. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v.58, n.12, p.7592-7594, 2014.

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

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, n. 1, p. 119-23, 2011.

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

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **J Antimicrob Chemother.** v. 56, n.1, p. 20-51, 2005.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev.** v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

RIBOT, E.M.; FAIR, M.A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D.N.; HUNTER, S.B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T.J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis.** v. 3, n. 1, p.59-67, 2006.

RIZEK, C.; FU, L.; DOS SANTOS, L.C.; LEITE, G.; RAMOS, J.; ROSSI, F.; GUIMARAES, T.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** v. 2, n. 13, p.43, 2014.

ROSSOLINI, G.M.; ARENA, F.; PECILE, P.; POLLINI, S. Update on the antibiotic resistance crisis. **Curr Opin Pharmacol.** v.18, p. 56-60, 2014.

SADER, H. S.; PFALLER, M. A.; HOLLIS, R. J. Chromosomal Restriction Fragment Analysis By Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Henry D. Isenberg. (Org.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook.** Washington: Sociedade Americana de Microbiologia, p. 01-12, 1992.

SALABI, A. E.; TOLEMAN, M. A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T.; FREI, R.; WALSH, T. R. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 54, n. 1, p. 582, 2009.

SCHWEIZER, H.P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. **Genet Mol Res.** v.2, n.1, p.48-62, 2003.

SHAKIL, S.; AZHAR, E.I.; TABREZ, S.; KAMAL, M. A.; JABIR, N. R.; ABUZENADAH, A. M.; DAMANHOURI, G. A.; ALAM, Q. New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1): an update. **J Chemother.** v. 23, n. 5, p. 263-265, 2011.

SILBERT, S.; PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; BARTH, A.L.; SADER, H.S. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** V. 25, n. 10, p. 847-851, 2004.

TAKAGI, E.H.; LINCOPAN, N.; CASSETTARI, V.C; PASSADORE, L.F.; MAMIZUKA, E.M.; MARTINEZ, M.B. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak at university hospital. **Braz J Microbiol.** v. 40, n. 2, p. 339-341, 2009.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol.** v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Infect Control.** v.119, n.6A, p.S3-S10, 2006.

TIJET, N.; BOYD, D.; PATEL, S.N.; MULVEY, M.R.; MELANO, R.G. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.57, n.9, p.4578-4580, 2013.

TOLEMAN, M. A.; SIMM, A. M.; MURPHY, T. A.; GALES, A. C.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother.** v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TURTON, J.F.; WARD, M.E.; WOODFORD, N.; KAUFMANN, M.E.; PIKE, R.; LIVERMORE, D.M.; PITT, T.L. The role of ISAb₁ in expression of OXA

carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 258, n.1, p. 72-77, 2006.

VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J.N.; LOPEZ, J.A.; QUINN, J.P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.** v.51, n.4, p.1553-1555, 2007.

WERNECK, J.S.; PICÃO, R.C.; CARVALHAES, C.G.; CARDOSO, J.P.; GALES, A.C. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 66, n. 2, p. 452-454, 2011.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M.; TURTON, J.F.; WARD, M.E.; BROWN, S.; AMYES, S.G.; LIVERMORE, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents.** v. 27, n. 4, p. 351-253, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Workshop on the Containment of Antimicrobial Resistance in Europe.** Geneva, 2004.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAVASCKI, A. P.; CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; GALES, A. C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 8, p. 71-93, 2010.

ZHANEL, G.G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D.J.; NOREDDIN, A.M.; KARLOWSKY, J.A. Comparative Review of the Carbapenems. **Drugs.** v. 67, n. 7, p. 1027-1052, 2007.

ZMARLICKA, M. T.; NAILOR, M. D.; NICOLAU, D. P. Impact of the New Delhi metallo-beta-lactamase on beta-lactam antibiotics. **Infect Drug Resist,** v. 8, p. 297-309, 2015.

VIII. Anexo



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6382512/2 - Mayne de Oliveira Pereira

Email: mayneop@usp.br
Data de Nascimento: 31/03/1987
Cédula de Identidade: RG - 30.156.665-3 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2010
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 07/02/2013
Início da Contagem de Prazo: 07/02/2013
Data Limite para o Depósito: 07/02/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Irene da Silva Soares - 07/02/2013 até 11/11/2014. Email: isoares@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Jorge Luiz Mello Sampaio - 12/11/2014 até o presente. Email: sampaio@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/02/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 24/03/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/02/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2016

Impresso em: 31/01/2017 17:49:32



Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6382512/2 - Mayne de Oliveira Pereira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMM5803-3/1	Fundamentos de Biologia Molecular Bacteriana (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/03/2013	26/04/2013	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5791-5/10	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2013	28/06/2013	120	8	93	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	6	100	B	N	Concluída
MIP5723-4/3	Antibioticoterapia e Resistência Bacteriana: Análise Crítica de Métodos de Investigação e Intervenção (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	05/08/2013	01/09/2013	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0517 - Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas e Parasitárias, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	01/02/2014	30/06/2014	-	3	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 20/01/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2016

Impresso em: 31/01/2017 17:49:32