

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS EM UNIDADES DE
TRATAMENTO INTENSIVO EM MANAUS**

VANDA SANTANA QUEIROZ DINI

**MANAUS – AM
2016**

VANDA SANTANA QUEIROZ DINI

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS EM UNIDADES DE
TRATAMENTO INTENSIVO EM MANAUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia como etapa obrigatória para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Microbiologia aplicada a Biotecnologia

ORIENTADORA: PROFA. DRA. PATRÍCIA PUCCINELLI ORLANDI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ADOLFO JOSÉ DA MOTA

**MANAUS – AM
2016**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D585a Dini, Vanda Santana Queiroz
Análise da resistência antimicrobiana em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em Unidades de Tratamento Intensivo em Manaus / Vanda Santana Queiroz Dini. 2016
136 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli
Coorientador: Adolfo José da Mota
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Cassetes gênicos. 3. Antimicrobianos. 4. Infecções nosocomiais. I. Puccinelli, Patrícia II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

VANDA SANTANA QUEIROZ DINI

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DAS UNIDADES DE
TRATAMENTO INTENSIVO EM MANAUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia como etapa obrigatória para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Data de aprovação: _____ de _____ de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi
Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ-Amazonia

Prof. Dr. Gustavo Nunes
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dr. Daniel Saito
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Dedico esse trabalho ao meu esposo, Rodrigo Dini, que sempre com muito amor e companherismo me dá forças para conquistar os meus objetivos, sempre incentivando e apoiando a persistir e vencer os desafios de cada nova jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a força que me inspira nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Dra. Patrícia, criadora do projeto, agradeço pelas oportunidades de conhecimentos e ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Dr. Adolfo Mota, por todos os ensinamentos e paciência que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Aos pacientes, familiares, profissionais, coordenadores e demais funcionários dos hospitais participantes, que foram o pivô desse projeto.

Aos companheiros (as) do laboratório, João, Fernanda, Paula Taquita, Diogo, Paloma, Ana Paula e Daniel, que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada.

Aos demais membros das equipes de pesquisa da FIOCRUZ e UFAM, que contribuíram em várias etapas do projeto.

A FAPEAM, pelo incentivo financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao Antônio, por ter contribuído com suas análises e conhecimentos estatísticos.

À Natália, que executou algumas etapas desse projeto.

À dona Juracy, que tanto ajudou com materiais para coleta.

A todos os meus professores e coordenadores do curso de pós-graduação pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

À Dra. Ana Carolina e ao Dr. Paulo por terem contribuídos para realização desse projeto.

Ao meu marido, pela paciência e força dada em todos os momentos dessa trajetória e por sua capacidade de me trazer paz na correria.

Aos meus pais, Creuza e Nilo, que sempre me incentivaram a buscar a realização dos meus objetivos.

As minhas irmãs (Myshelly e Vanessa), meu irmão Victor e sobrinhos (José Henrique, Gabriela e Manuel), que pelo amor fraterno me fortalecem a nunca desistir.

As minhas amigas, Alita, Ana Paula, Tatiane e Nayanne, pelas dicas valiosas e pelo incentivo e apoio constante.

E a todos aqueles que contribuíram de certa forma para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

DINI, V.S.Q. **Análise da resistência antimicrobiana em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em Unidades de Tratamento Intensivo em Manaus.** 2016. Dissertação de Mestrado – Univerisidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

Introdução: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiplos antimicrobianos (MDR, *multi-drug-resistance* e PDR, *pan-drug-resistance*) é um agente etiológico frequente em infecções hospitalares, acometendo principalmente pacientes imunossuprimidos, tal como os internados em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). **Objetivos:** (1) Detectar *P. aeruginosa* resistente a múltiplos antimicrobianos em pacientes, profissionais e estruturas hospitalares; (2) identificar fatores genéticos que conferem resistência antimicrobiana, tais como integrons, cassetes gênicos e genes codificadores de enzimas β -lactamases; e (3) Detectar grupos clonais entre os isolados MDR/PDR. **Metodologia:** Foram realizadas coletas de amostras de pacientes, profissionais e estruturas de UTIs dos Hospitais 28 de Agosto (HPS28), Francisca Mendes (HUFM) e João Lúcio Pereira Machado (HPSJL), dos quais foram isoladas e identificadas cepas de *P. aeruginosa* por metodologia microbiológica clássica e molecular (amplificação e sequenciamento do gene 16s rRNA); O perfil de resistência aos antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco-difusão; A pesquisa de grupos clonais foi determinada por similaridade genética entre os isolados MDR/PDR por PFGE; A detecção de genes que codificam resistência (integrons, cassetes gênicos e enzimas β -lactamases) foi realizada por PCR e confirmadas por RFLP e/ou sequenciamento genético. **Resultados:** Os fenótipos MDRs e PDR foram detectados em, respectivamente, 13,3% e 1,2% dos isolados estudados. Em 32 (38,5%) foram detectados integrons de classe 1. Destes, três (3,6%) também foram positivos para integrons de classe 2. A presença de integrons nos isolados estudados demonstra correlação estatística ($P < 0,05$) significativas com os fenótipos de resistência aos fármacos testados. Uma alta frequência de integrons não continha cassete gênico ou apenas carregava genes que codificavam resistência aos aminoglicosídeos estreptomicina e espectinomicina e ao trimetropin. A pesquisa de β -lactamases revelou a produção de enzimas KPC-2 (66,7%), VIM (8,3%) e OXA-50 (100%) por isolados de *P. aeruginosa* MDR/PDR. Dois grupos clonais foram detectados entre os isolados MDR/PDR estudados, indicando disseminação clonal inter e intrahospitalares. **Conclusão:** O isolamento de *P. aeruginosa* a partir dos hospitais estudados evidencia que esses patógenos, capazes de causar graves infecções nosocomiais, em especial, cepas MDR e PDR, estão se disseminando em ambiente hospitalar. Além disso, constata-se que a presença de elementos genéticos como integrons, cassetes gênicos e genes codificadores de β -lactamases estão correlacionadas aos fenótipos de resistência nesses isolados, sendo, portanto, mecanismos genéticos potenciais capazes de conferir resistência antimicrobiana. Apesar disso, estudos futuros são necessários para avaliar a contribuição de outros mecanismos moleculares e a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos que contribuem para o desenvolvimento destes fenótipos.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, integrons, cassetes gênicos e β -lactamases.

ABSTRACT

DINI, V.S.Q. **Analysis of antimicrobial resistance in isolated *Pseudomonas aeruginosa* strains in Intensive Care Units in Manaus.** 2016. Masters Dissertation – Univerisidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* resistant to multiple antibiotics (MDR , multi-drug-resistance and PDR , pan-drug-resistance) is a frequent etiologic agent of nosocomial infections, mainly affecting immunocompromised patients, such as those admitted to the Intensive Care Unit (ICU). **Objectives:** (1) Detect *P. aeruginosa* resistant to multiple antimicrobials in patients, professionals and hospital environment; (2) Identify genetic factors that confer antibiotic resistance such as integrons, gene cassettes and genes encoding enzymes β -lactamases; and (3) Detect clonal groups among isolates MDR/PDR. **Methods:** Samples were collected samples from patients, professionals and structures in ICUs of Hospitals 28 de Agosto (HPS28), Francisca Mendes (HUFM) e João Lúcio Pereira Machado (HPSJL), which were isolated and identified strains of *P. aeruginosa* by classical and molecular microbiological methods (amplification and sequencing of the 16S rRNA gene); The antimicrobial resistance profile was determined by disk diffusion technique; The research groups was determined by clonal genetic similarity among isolates MDR/PDR by PFGE; The detection of genes that encode resistance (integrons, gene cassettes and β -lactamases enzymes) was performed by PCR and confirmed by RFLP and/or genetic sequencing.

Results: The phenotypes MDR and PDR were detected, respectively, 13.3 % and 1.2 % of the isolates. In 32 (38.5%) were detected class integrons 1. Of these, three (3.6%) were also positive for integrons class intengrons 2. The presence of the isolates showed statistical correlation ($P<0.05$) with significant phenotypic resistance to the tested drugs. A high frequency of integrons contained no genetic cassette or carried only genes that encode resistance to aminoglycosides streptomycin and spectinomycin and trimethoprim. The β -lactamase showed the production of enzyme KPC -2 study (66,7%), VIM (8.3%) and OXA -50 (100%) *P. aeruginosa* isolates MDR/PDR. Two clonal groups were detected among MDR/PDR isolates, indicating clonal intra and inter-hospital. **Conclusion:** The isolation of *P. aeruginosa* from hospitals studied shows that these pathogens, which can cause severe nosocomial infections, in particular MDR and PDR strains are spreading in a hospital environment. Moreover, it appears that the presence of genetic elements such as integrons, gene cassettes and genes encoding β -lactamases are correlated to the resistance fenótops these isolates and therefore potential genetic mechanisms that confer antimicrobial resistance. Nevertheless, further studies are needed to assess the contribution of other molecular mechanisms and the selective pressure exerted by antimicrobial agents that contribute to the development of these phenotypes.

Keywords: Antimicrobial resistance, integrons, gene cassettes and β -lactamases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características morfo-tintoriais de <i>P. aeruginosa</i> sob coloração de Gram	21
Figura 2 – Estrutura química dos β -lactâmicos.	27
Figura 3 – Distribuição geográfica de isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos (CRPA).	31
Figura 4 – Mecanismos de resistência antimicrobiana em cepas de <i>P. aeruginosa</i>	34
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura dos integrons.	36
Figura 6 – Integração de genes cassetes por recombinação sítio-específica.	36
Figura 7 – Mecanismo de resistência aos β -Lactâmicos conferido por enzimas M β L.	38
Figura 8 – Distribuição mundial de diferentes metalo- β -lactamases.	39
Figura 9 – Fluxograma das atividades realizadas.	46
Figura 10 – Fluxograma das coletas e transporte de amostras.	48
Figura 11 – Fluxograma dos métodos microbiológicos clássicos empregados.	50
Figura 12 – Colônias de <i>P. aeruginosa</i> .com crescimento característico	51
Figura 13 – Testes bioquímicos para identificação de <i>P. aeruginosa</i>	52
Figura 14 – Estoque de cepas de <i>P. aeruginosa</i> em meio definitivo	52
Figura 15 – Placas de petri contendo inóculos bacterianos e halos de inibição dos discos de antibióticos.	53
Figura 16 – Amplicons de 956pb correspondentes ao gene 16s rRNA.	65
Figura 17 - Dendograma de similaridade genética dos perfis de PFGE apresentado pelos isolados de <i>P. aeruginosa</i> MDR/PDR.	69
Figura 18 – Amplicons de 698pb correspondentes ao gene <i>intI1</i>	71
Figura 19 - Amplicons de 395pb correspondentes ao <i>intI2</i>	71
Figura 20 – Amplicons de 491 pb correspondentes aos genes <i>intI1</i> , 2 e/ou 3.	72
Figura 21 – Perfil de restrição (RFLP) dos amplicons correspondentes aos genes <i>intI1</i> e 2.	72
Figura 22 - Amplicons correspondentes a região cassette de integrons de classe 1.	74
Figura 23 – Dendograma demonstrando 8 perfis das regiões cassetes dos integrons de classe 1.	75
Figura 24 – Amplicons correspondentes aos genes 16s rRNA (956pb) e <i>bla_{KPC-2}</i> (864pb).	77
Figura 25 – Amplicons de 781pb correspondentes ao gene <i>bla_{VIM-2,-3,-6,-8,-9,-10,-11,-18}</i>	77
Figura 26 – Amplicons de 869 correspondentes ao gene <i>bla_{OXA-50}</i>	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Percentual de cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas por hospital.....	63
Gráfico 2 - Percentual de cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de acordo com as amostras clínicas colhidas de pacientes.	64
Gráfico 3 – Percentual de cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas a partir da estrutura hospitalar da UTI, de acordo com a fonte de isolamento.....	64
Gráfico 4 – Panorama de isolamento de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com os hospitais estudados e tipos de amostras coletadas.	65
Gráfico 5 - Percentual de fenótipos de suscetibilidade antimicrobiana em cepas de <i>P. aeruginosa</i>	66
Gráfico 6 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	66
Gráfico 7 – Panorama de suscetibilidade antimicrobiana de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com os hospitais estudados.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Controles positivos e negativo utilizados no trabalho.....	49
Tabela 2 - Pares de iniciadores (<i>forward</i> e <i>reverse</i>) de interesse para a detecção de genes 16S rRNA e codificadores de integrases, cassetes gênicos e de metalo- β -lactamases.....	55
Tabela 3 – Quantidade e tamanho dos fragmentos obtidos após digestão enzimática dos amplicons gerados utilizando iniciadores degenerados HEP-35/36.....	59
Tabela 4 – <i>n</i> amostral de pacientes e profissionais de Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) de três hospitais de Manaus/AM.....	61
Tabela 5 – Quantidade de amostras coletadas de acordo com os grupos e hospitais estudados.	61
Tabela 6 – Amostras coletadas de pacientes de UTI de acordo com os hospitais estudados.....	62
Tabela 7 – Amostras coletadas de profissionais de UTI de acordo com os hospitais estudados.	62
Tabela 8 – Amostras coletadas de estruturas das UTIs de acordo com os hospitais estudados.....	63
Tabela 9 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados MDR e PDR.....	68
Tabela 10 – Perfil genético para integrons e genes codificadores de β -lactamases e fonte de isolamento dos grupos clonais.	69
Tabela 11 – Correlação entre a presença ou ausência de integrons com os fenótipos n-MDR, MDR e PDR.	73
Tabela 12 - Correlação entre a presença/ausência de integrons de classe 1 com o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	73
Tabela 13 – Os grupos de RFLP de cassetes gênicos com o seu fenótipo de resistência e isolados de <i>P. aeruginosa</i> correspondentes.....	76
Tabela 14 – Análise e comparação das sequências com o banco de dados do NCBI.....	78
Tabela 15 – Características gerais dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> com fenótipos MDR E PDR.....	80

ANEXOS

Anexo 1 - Análise e comparação das sequências do gene 16s rRNA dos isolados estudados com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI.....	124
Anexo 2 - Sequência contig dos 83 isolados submetidos a amplificação e sequenciamento do gene 16s rRNA.	124
Anexo 3 – Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estudados.	125
Anexo 4 – Integrons e Cassetes Gênicos.....	129
Anexo 5 - Análise de Primeres - Programa OligoAnalyzer 3.1	130
Anexo 6 – Matriz de similaridade pelo método de Dice para dendograma RFLP de Cassetes Gênicos	132
Anexo 7 – Gel de agarose demonstrando o perfil RFLP dos Cassetes Gênicos	133
Anexo 8 – Matriz de similaridade pelo método de Dice para dendograma PFGE.	134
Anexo 9 – Sequências dos genes de resistência analisados (<i>bla_{KPC-2}</i> , <i>bla_{VIM}</i> e <i>bla_{OXA-50}</i>).....	135

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AIM	Austrália imipinemase
AME	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
AMH	Agar Mueller Hinton
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Infusão Cérebro-Coração
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta de busca de alinhamento local básico)
BLASTn	BLAST nucleotídeo
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention (Centros de controle e prevenção de doenças)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos
CGLAB	Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde
CIH	Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Instituto Laboratorial de Normas Clínicas
CNESNet	Cadastro Nacional de Estabelecimento de Saúde
CRPA	<i>Carbapenem-resistant P. aeruginosa</i> - <i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos
CTT	Cloridato de Trifenil Tetrazólio
CVC	Cateter Vascular Central
CVD	Cateter Vesical de Demora
DATASUS	Departamento de informática do SUS
DIM	<i>Dutch imipinemase</i> - imipinemase “alemã”
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
ESBL	<i>Extended-spectrum β-lactamase</i> - β -lactamases de espectro estendido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GES	<i>Guiana extended-spectrum β-lactamase</i>
GIM	<i>Germano imipinemase</i>
I	Sensibilidade intermediária
ICS	Infecção da Corrente Sanguínea

IH	Infecções Hospitalares
IMP	<i>imipinem metalo-β-lactamase</i>
IN	Infecções Nosocomiais
IPCS	Infecções Primária de Corrente Sanguínea
IPCSL	Infecções Primária de Corrente Sanguínea confirmada laboratorialmente
IRAS	Infecções relacionadas Assistência à Saúde
ISC	Infecção de Sítio Cirúrgico
ITU	Infecção do Trato Urinário
H₂S	Ácido Sulfídrico
HPS28	Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto
HUFM	Hospital Universitário Francisca Mendes
HPSJLPM	Hospital e Pronto Socorro Dr. João Lúcio Pereira Machado
KHM	<i>Kyorin health science metalo-β-lactamase</i> , indetificada na Universidade Kyorin
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LB Miller	Luria Bertani Miller
MβL	Metallo-β-lactamase
MDR	<i>Multidrug-resistant</i> – Multirresistência à drogas
MDROs	<i>multidrug-resistant organisms</i> - organismos multirresistentes
MFP	<i>membrane fusion protein</i> – proteína de fusão de membrana
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina
MS	Ministério da Saúde
n-MDR	non-Multi-drug-resistance – não multirresistente à drogas
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
NDM	<i>Nova Delhi metalo-β-lactamase</i>
NS	Não suscetível
NTSYSpc	<i>Numerical Taxonomy System</i>
OD	Densidade óptica
OMFs	<i>outer membrane channel-forming proteins</i> - proteína de membrana externa
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORFs	<i>Open Reading Frames</i> – Quadro de leitura aberta
OXA	<i>Oxacilinases</i>

PER	ESBL, <i>Pseudomonas</i> resistência estendida, do inglês, <i>Pseudomonas extended resistance</i>
PBP	<i>Penicillin binding proteins</i> - Proteínas ligadoras de penicilinas
PCIH	Programa de Controle de Infecções Hospitalares
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDR	<i>Pan-drug resistance</i> - Pan-resistentes
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> - Eletroforese em Campo Pulsado
PIA	Ágar para Isolamento de <i>Pseudomonas</i>
PVM	Pneumonia associada à Ventilação Mecânica
PVPI	Iodopovidona ou Povidona-iodo
R	Resistente
RM	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde
RND	<i>Resistance-nodulation-cell division superfamily</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> – Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição
RND	<i>resistance-nodulation-cell division</i>
S	Sensível
SADT	Serviço Auxiliar Diagnóstico e Terapia
SHV	ESBL, sulfidril variável, do inglês, <i>sulphydryl variable</i>
SIH	Sistema de Informações Hospitalares do SUS
SIM	<i>Seoul imipinemase</i>
SPM	<i>São Paulo metallo-β-lactamase</i>
SPS	Polianetol Sulfonato Sódico
SUS	Sistema Único de Saúde
TMB	<i>Tripoli metallo-β-lactamase</i>)
TSA	Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana
TSB	Caldo caseína digerida de soja
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UPGMA	<i>Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UV	Ultra violeta
VIM	<i>Verona metallo-β-lactamase codificada por integron</i>
VRE	<i>Enterococcus</i> spp. resistente à vancomicina
WHO	<i>World Health Organization</i>

XDR

Extremely drug resistant

59-be

59 base elemento - elementos de base 59

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
®	Marca registrada
T_M	Temperatura de pareamento dos iniciadores
°C	Graus Centígrados
β	Beta
Y	Citosina e Timina
R	Adenina e Guanina
B	Citosina, Timina e Guanina
K	Timina e Guanina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.2 INFECÇÕES NOSOCOMIAIS – ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	23
2.2.1 Infecções nosocomiais por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.3 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA INFECÇÕES POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.3.1 Antimicrobianos β -lactâmicos	27
2.3.1.1 Penicilinas	28
2.3.1.2 Cefalosporinas.....	29
2.3.1.3 Monobactâmos	30
2.3.1.4 Carbapenêmicos	30
2.3.2 Outras opções terapêuticas.....	32
2.3.2.1 Aminoglicosídeos	32
2.3.2.2 Fluoroquinolonas	33
2.3.2.3 Polimixinas.....	33
2.4 MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	34
2.4.1 Integrons e Cassetes Gênicos.....	35
2.4.2 Enzimas β -Lactamases.....	37
2.5 FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA EM <i>P. aeruginosa</i>	41
3. JUSTIFICATIVA	44
4. OBJETIVOS	45
4.1 OBJETIVO GERAL	45
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
5. METODOLOGIA	46
5.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	46
5.2 DESENHO EXPERIMENTAL	46
5.3 AMOSTRAGEM	47
5.4 COLETA, ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS	48

5.5. AMOSTRAS CONTROLES	49
5.6 TÉCNICAS EMPREGADAS	50
5.6.1 Metodologia Microbiológica Clássica	50
5.6.1.1 Isolamento das cepas de <i>P. aeruginosa</i>	51
5.6.1.2 Armazenamento das cepas bacterianas.....	52
5.6.2 Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA) - Antibiograma	52
5.6.3 Extração de DNA.....	54
5.6.4 Amplificação de DNA	54
5.6.5 Sequenciamento de DNA.....	57
5.6.6 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	57
5.6.7 Análise de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)	58
5.6.8 Análise Estatística.....	59
6. RESULTADOS	61
6.1 COLETA DAS AMOSTRAS	61
6.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
6.3 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
6.4 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA	66
6.5 DETECÇÃO DE GRUPOS CLONAIS	68
6.6 DETECÇÃO DE INTEGRONS DE CLASSE 1, 2 E 3	70
6.7 ANÁLISE DOS CASSETES GÊNICOS	74
6.8 DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE β -LACTAMASES	77
6.9 ANÁLISE DOS ISOLADOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR/PDR.....	79
7. DISCUSSÃO	81
8. CONCLUSÃO	96
9. PERSPECTIVAS.....	98
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
11. ANEXOS	124

1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares por organismos multirresistentes (MDROs, do inglês, *multidrug-resistant organisms*) são consideradas uma ameaça global à saúde pública, pois limitam ou até mesmo inviabilizam as opções terapêuticas, aumentam os custos hospitalares, assim como o tempo de internação dos pacientes, o que conseqüentemente eleva os índices de morbidade e mortalidade dos acometidos (WHO, 2014; ANVISA, 2015).

Dentre os micro-organismos multirresistentes frequentemente isolados em ambiente hospitalar, destaca-se *Pseudomonas aeruginosa*, presente principalmente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), a qual é correlacionada ao fenótipo MDR (do inglês *Multi-drug-resistance* - resistência a múltiplas drogas) e esporadicamente, ao fenótipo PDR (do inglês *Pan-drug-resistance* - resistência a todas drogas) (MAGIORAKOS et al., 2012; ANVISA, 2015).

Em 2009, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (rede RM) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) divulgou a frequência de micro-organismos multirresistentes isolados em UTIs de diferentes hospitais do Brasil, no período de julho de 2006 a junho de 2008. No ranking dos micro-organismos mais isolados *P. aeruginosa* ocupou o 4º lugar (ANVISA, 2009).

A mesma rede, em 2015, divulgou a ocorrência dos bacilos Gram-negativos com fenótipos de resistência mais frequentemente notificados como agentes etiológicos de infecções da corrente sanguínea (ICS) associada ao cateter vascular central (CVC) em pacientes adultos hospitalizados em UTIs. Os dados compilados demonstraram que, no Brasil, a *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos é o 5º microrganismo mais frequente entre os demais agentes etiológicos. Já na região Norte do Brasil, essa bactéria ocupou o 2º lugar no ranking dos mais isolados (ANVISA, 2015).

Desde 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) realiza campanha nacional e internacional para evitar infecções hospitalares, que tem como lema “*Uma Assistência Limpa é Uma Assistência Mais Segura*”, a qual busca a conscientização para correta higienização das mãos em serviços de saúde, principalmente antes e depois da manipulação de pacientes, objetivando evitar a propagação de bactérias entre os internados (WHO, 2008a, 2008b, 2012).

Sendo assim, várias causas estão associadas a dispersão de bactérias multirresistentes, entre outros fatores, citam-se o uso indiscriminado de antimicrobianos, uso desses fármacos em tratamentos profiláticos em animais, permanência a longo prazo de pacientes com suscetibilidade imunológica em UTI, etc. (WHO, 2008a).

No Brasil, as infecções hospitalares por *P. aeruginosa* MDR têm sido atribuído a uma disseminação clonal de cepas produtoras de metalo- β -lactamase (M β L) do tipo SPM, as quais conferem resistência a quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos (exceto aztreonam), principalmente as cefalosporinas (TOLEMAN et al., 2002; GALES et al., 2003; MARTINS et al., 2007). A disseminação desses isolados corrobora um dos principais fenótipos de resistência em *P. aeruginosa* encontrados no Brasil, que deve-se a resistência aos carbapenêmicos, antimicrobianos pertencente a classes dos β -lactâmicos. Entretanto, também são relatados com frequência resistência aos aminoglicosídeos, que por sua vez está mais correlacionada a presença de metilase do 16S rDNA *rmtD* (LI; NIKAIDO, 2009; NEVES et al., 2011; ANVISA, 2015).

Apesar de estudos atribuírem tais perfis de resistências principalmente a enzimas inativadoras de antimicrobianos, há outros mecanismos moleculares que conferem resistência, como a perda de proteínas de membrana (porina *OprD*), que tornam a bactéria impermeável às drogas, ou ainda, devido a superexpressão de bombas de efluxo, que confere a capacidade de expulsar os antimicrobianos do meio intracelular (LI; NIKAIDO, 2009; NEVES et al., 2011; ANVISA, 2015).

Esses diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana ocorrem de forma natural, através do intercâmbio de material genético intra ou interespecies, que é comum em bactérias Gram-negativas, ou devido à pressão seletiva exercida pelos antibióticos (BLAIR et al., 2015). A resistência conferida pela produção de enzimas inativadoras de antibióticos geralmente é codificada por genes presentes em integrons, que são elementos genéticos capazes de integrar e expressar genes de resistência (DENG et al., 2015).

Em estudos preliminares foram isoladas cepas de *P. aeruginosa* a partir de efluentes hospitalares brutos (sem tratamento prévio) e tratados do Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto (HPS28), localizado na zona sul de Manaus (MAGALHÃES, 2013). O isolamento dessas bactérias mesmo após o tratamento do efluente foi sugestivo de disseminação de *P. aeruginosa* em ambiente hospitalar. Os dados epidemiológicos demonstram que esse patógeno está frequentemente associado a infecções hospitalares, principalmente em UTIs, por ser uma bactéria oportunista, que causa infecções em indivíduos com condições de risco,

ou seja, imunossuprimidos, que utilizam dispositivos invasivos e que geralmente estão expostos a assistência a saúde por longos períodos, panorama visto em UTIs (VINCENT et al., 2009; CEZÁRIO et al., 2009; ANVISA, 2015).

A presença e disseminação de isolados multirresistentes em ambiente hospitalar está associada a grandes impactos sócio-econômicos, aumentando os custos com a saúde, pois prolongam o tempo de permanência e elevam os gastos com diagnósticos e terapêuticas e ainda aumentam as possibilidades de morbidade e mortalidade (WHO, 2013).

Portanto, o presente estudo tem como objetivo detectar e analisar *P. aeruginosa* com múltiplos fenótipos de resistência, isoladas a partir de amostras de pacientes, profissionais intensivistas e de estrutura de UTIs de três diferentes hospitais situados na cidade de Manaus/AM, o que evidenciará que tais hospitais corroboram com dados epidemiológicos mundiais referente a disseminação de *P. aeruginosa* como agente etiológico de infecções hospitalares, tendo em vista que tais dados, principalmente na região Norte, são escassos quando comparados a outras regiões do Brasil.

Além disso, determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados, bem como analisar alguns mecanismos moleculares que conferem resistência a esses fármacos em cepas de *P. aeruginosa*, como a presença de integrons, cassetes gênicos e genes codificadores de metalo- β -lactamases, possibilitará verificar quais são as características dos isolados presente nos hospitais estudados. Dessa forma, os dados obtidos poderão contribuir para elaboração de novos protocolos que visem evitar a disseminação de infecção hospitalar, bem como novas condutas terapêuticas, evitando a seleção de bactérias resistentes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* foi descrito em 1894 por Walter Emil Friedrich August Migula. Desde a sua primeira descrição, a taxonomia do gênero tem evoluído com o advento de novas tecnologias. Até 2015, foram descritas 230 espécies e 18 subespécies de *Pseudomonas* (<http://www.bacterio.net/p/pseudomonas.html>). Inicialmente, a descrição do gênero foi atribuída às características morfológicas e bioquímicas, entretanto, em virtude de avanços na biologia molecular do DNA, vários marcadores moleculares filogenéticos passaram a ser usados para sua classificação taxonômica (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1998; HILARIO et al., 2004; TAYEB et al, 2005, 2008; PALLERONI, 2010; KHATTAB et al., 2015).

P. aeruginosa está classificada no grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*, que além desta, compreendem as espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* (PALLERONI et al., 1973; GARRITY et al., 2004; PEIX et al., 2009). Apresentam-se como bacilos Gram-negativos, retos ou curvos, com aproximadamente 0,5 a 0,8 μ m de comprimento e 1,5 a 3,0 μ m de largura (Figura 1) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; PALLERONI, 2008).

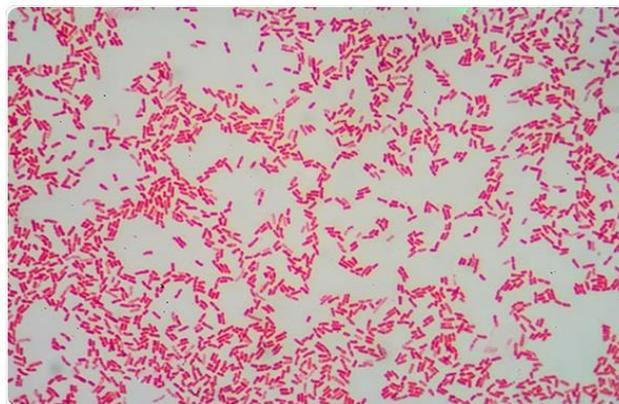


Figura 1 – Características morfo-tintoriais de *P. aeruginosa* sob coloração de Gram

FONTE: Retirado de <<http://www.news-medical.net>>Acesso em: 19 jul 2016.

É uma bactéria ubiqüitária, termolábel, hidrofílica, móvel, de vida livre, amplamente distribuída no ambiente, tendo como reservatório natural o solo, as plantas e águas, principalmente água do mar, água doce ou residuárias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; PALLERONI, 2008). Quanto as suas características metabólicas, são estritamente aeróbios, utilizam um grande número de compostos orgânicos, tais como glicose e outros carboidratos, os quais são utilizados somente pela via oxidativa de carboidratos, portanto são bactérias não fermentadoras (PALLERONI, 1993; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A maioria das cepas de *P. aeruginosa* produz um ou mais pigmentos, os quais retardam o crescimento de outras bactérias facilitando sua colonização. Os quatro pigmentos mais conhecidos são: piocianina (azul), piomelanina (marrom), pioverdina (verde) e piorrubina (vermelho), porém o mais encontrado nos isolados clínicos é a piocianina, por esse motivo, *P. aeruginosa* é conhecida como o bacilo piociânico (do grego *puoin*=pus e *kuanos*=azul escuro) (KING et al., 1954; PALLERONI, 2010). A produção de pioverdina e piocianina entre as cepas de *P. aeruginosa* é variável (GARRITY et al., 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; VOS et al., 2011). O crescimento da *P. aeruginosa* em caldo simples à temperatura de 42°C é considerado o ideal, pois permite diferenciá-la das outras espécies de *Pseudomonas* (BLONDEL-HILL et al., 2007; SILVA et al., 2010). Outras características importantes encontradas nas cepas de *P. aeruginosa* é a emissão de odor de fruta adocicado e a formação de colônias com diversos aspectos morfológicos, podendo ser diminutas ou até planas, difusas ou mucoides, com bordas serradas e brilho metálico (SILVA, 1999; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; MURRAY et al., 2015).

As características fundamentais para a identificação fenotípica de cepas *P. aeruginosa* consistem no crescimento típico de colônias em temperaturas de 5°C a 42°C, produção de pigmentos (pioverdina e piocianina), odor característico e motilidade positiva, e em testes bioquímicos, apresentam oxidase positiva, lisina descarboxilase negativo, cetrimida positivo, malonato positivo, citrato positivo, indol negativo, consome glicose apenas pela via oxidativa, não podendo fermentar esse açúcar, oxida a maltose e lactose e reduz nitrato a nitrito (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; LUCE, 2010; MURRAY et al., 2015).

P. aeruginosa apresenta vários fatores de virulência, relacionados à estrutura bacteriana, tais como a presença de flagelos e fímbrias, e produção de produtos extracelulares, como alginato, enzimas e pigmentos extracelulares, que conferem a capacidade dessa bactéria causar diversas doenças no hospedeiro (KHALIFA et al., 2011; (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; GELLATLY; HANCOCK, 2013; ALHAZMI, 2015)

2.2 INFECÇÕES NOSOCOMIAIS – ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

De acordo com o Ministério da Saúde, as Infecções Nosocomiais (IN), Infecções Hospitalares (IH) ou Infecções relacionadas Assistência a Saúde (IRAS) são aquelas adquiridas durante um procedimento assistencial ou durante o período de internamento, que não estava presente no momento da admissão do paciente em ambiente hospitalar (MS, 1998).

As infecções hospitalares dificultam e agravam a situação dos pacientes enfermos, podendo levar à sepse ou morte (CDC, 2016). Essas infecções são ainda mais preocupantes quando acometem pacientes internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), pois estão associadas a elevados índices de morbidade, mortalidade e custos elevados com a saúde (VINCENT et al., 2009). Com taxas de mortalidade entre 9 a 58%, que variam de acordo com a etiologia e topografia da infecção, doença de base e etc., atingindo 40% entre as infecções de corrente sanguínea. Os impactos econômicos, resultante de internações prolongadas, novas condutas diagnósticas e terapêuticas representam cerca de 40% do total de gastos de UTI (GUIMARÃES et al., 2011; MARRA et al., 2011).

Estimativas da OMS, em 2008, indicaram que 5 a 10% dos pacientes que utilizam serviços hospitalares adquirem uma ou mais infecções e ainda, apontaram que um em cada quatro pacientes internados em UTI vão adquirir infecção (WHO, 2008a). Em 2010, a ANVISA realizou um levantamento da incidência de IRAS nas UTI dos de 690 hospitais brasileiros. Esses estudos notificaram 18.370 infecções primárias de corrente sanguínea (IPCS) associada a cateter venoso central (CVC), sendo que destes 59,3% correspondiam a UTI adulto, 8,3% ocorreram em UTI pediátrica e 32,4% em UTI neonatal (ANVISA, 2011a, 2011b).

Essas infecções ocorrem, geralmente, após procedimento cirúrgico e dispositivos invasivos (cateteres), por esse motivo são alvos prioritários das medidas de prevenção e controle das infecções. As principais síndromes clínicas relatadas são as infecções da corrente sanguínea (ICS) associada ao cateter vascular central (CVC), infecção do trato urinário (ITU) associada ao cateter vesical de demora (CVD), infecção de sítio cirúrgico (ISC) e pneumonia associada a ventilação mecânica (PVM). (ANVISA, 2013a; MARSCHALL., 2014).

Essas infecções, quando associadas a bactérias multirresistentes, são ainda mais agravantes, pois muitas vezes tornam as opções terapêuticas ineficazes (ANVISA, 2015; WHO, 2014). Os principais micro-organismos multirresistentes isolados no ambiente dos

serviços de saúde são *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, enterobactérias produtoras de carbapenemases e beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL, do inglês, *Extended Spectrum β -lactamase*), *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (MRSA) (ANVISA, 2015; POTRON et al., 2015). Estimativas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças, indicam que um em cada quatro infecções nosocomiais são atribuídas a uma dessas bactérias (CDC, 2016).

Anualmente, a OMS realiza a campanha da Aliança Mundial pela Segurança do Paciente intitulada “Uma Assistência Limpa é uma Assistência mais Segura”, que objetiva a redução de infecções, sendo a higiene das mãos o foco maior desta campanha (WHO, 2008a, 2008b, 2012). No Brasil, existem diversas leis e portarias que objetivam controlar as infecções hospitalares, entre estas pode-se destacar a lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997 que obriga os hospitais do País a manter Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH), objetivando instituir medidas que reduzam ao máximo as possíveis incidências e agravos das infecções hospitalares (MS, 1997). E ainda destaca-se a Portaria 2.616 de 12/5/1998, criada para regulamentar a lei nº 9.431, impondo as diretrizes e normas para prevenir e controlar as infecções hospitalares e regulamentar as ações que do Programa de Controle de Infecções Hospitalares (MS, 1998).

Três esforços são considerados críticos para prevenir as IN: 1) prevenção de infecções relacionadas a cirurgia ou colocação de um cateter, 2) evitar a propagação de bactérias entre pacientes, e 3) melhor o uso de antibióticos (CDC, 2016).

Também são feitas recomendações aos profissionais de saúde para evitar infecções hospitalares e impedir a disseminação da resistência, sendo alertados a lidar com cada paciente de cada vez, isolar os doentes quando for o caso, saber dos padrões de resistência a antibióticos em sua instalação/área, prescrever antibióticos corretamente, obter culturas, iniciar antibióticos imediatamente e reavaliar 24 a 48 horas mais tarde, e por fim, saber o momento em que deve-se suspender o tratamento com antibióticos (CDC, 2016).

2.2.1 Infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa*

A colonização de indivíduos saudáveis por *P. aeruginosa* não é comum, sendo relatado que apenas 2 a 4% desses indivíduos são portadores dessa bactéria. Em contrapartida, pacientes hospitalizados podem apresentar uma taxa de 50% a 60% de colonização, o que pode resultar em diversos tipos de doenças subjacentes graves. É por esse motivo que *P. aeruginosa* é considerada oportunista e responsável por grande parte das infecções hospitalares em todo o mundo (MICEK et al., 2015).

P. aeruginosa pode desencadear tanto infecções agudas, devido a produção de toxinas, como infecções crônicas, que pode ser atribuída à vários fatores de virulência e a ação do seu biofilme. A grande variedade de virulência apresentada por essa bactéria possibilita que essa seja responsável por várias e significativas infecções hospitalares, incluindo as oculares, auditivas, cutâneas, urogenitais, pulmonares e bacteremias (GELLATLY; HANCOCK, 2013; ALHAZMI, 2015).

Além dos fatores de virulência associados a patogênese das infecções por *P. aeruginosa*, outros fatores que contribuem para o estabelecimento dessas infecções deve-se a defesa comprometida dos hospedeiros, tais como neutropenia em queimaduras graves ou fibrose cística, assim como o uso de dispositivos invasivos, como cateteres urinários e central, respiradores e tubo endotraqueal, que facilitam a entrada da bactéria no organismo, desencadeando uma resposta neutrofílica intensa, resultado em danos significativos aos tecidos do hospedeiro (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Uma das principais formas de disseminação e contaminação por essa bactéria em ambiente hospitalar ocorre através de aparelhos de respiração e nebulização, cateteres, endoscópios e equipamentos de diálise (VALLET, 2003; ALHAZMI, 2015). Alguns estudos mostram que artigos pessoais de médicos e pessoal de enfermagem também podem ser considerados potenciais reservatórios e vetores de *P. aeruginosa* (TESS et al., 1993; MCNEIL et al., 2001).

Nos Estados Unidos, a *P. aeruginosa* está entre os patógenos hospitalares mais comuns e é o segundo mais frequentemente isolado em pacientes com pneumonia associado à ventilação mecânica. No Brasil, a infecção por *P. aeruginosa* em pacientes em UTI é frequentemente relada, ocupando o 5º lugar do ranking dos micro-organismos mais isolados. Já na região Norte do Brasil, apesar dos dados serem escassos quando comparado ao restante

dos estados brasileiros, demonstram que a *P. aeruginosa* é o segundo patógeno mais notificados como agentes etiológicos de IPCSL (ANVISA, 2015).

2.3 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA INFECÇÕES POR *Pseudomonas aeruginosa*

Apesar da grande variedade de antimicrobianos com atividade anti-*Pseudomonas*, as opções de tratamento de infecções por esse patógeno estão cada vez mais escassas, devido aos níveis crescentes de resistência antimicrobiana, fazendo com que isolados resistentes a todos os fármacos convencionais sejam cada vez mais comuns (NEVES et al., 2011; BLAIR et al., 2015; MICEK et al., 2015). Esse panorama é adicionalmente dificultado devido ao estado de crescimento da bactéria no paciente, o que inclui a capacidade do microrganismo em crescer como um biofilme, contribuindo com a resistência aos fármacos (BLAIR et al., 2015).

A seleção do antimicrobiano mais apropriado para o tratamento de infecções por bactérias, requer o conhecimento prévio sobre o sítio da infecção, as variabilidades biológicas inerentes aos pacientes, identificação prévia do micro-organismo, a determinação da suscetibilidade aos fármacos antimicrobianos e a segurança do fármaco. No entanto, o tempo dispensado para atingir todos esses requisitos pode ser fatal para pacientes criticamente enfermos, o que leva a necessidade do emprego imediato de tratamentos empírico (ANVISA, 2007; MS, 2012; BRAYKOV et al., 2014; CDDEP, 2015).

A escolha do tratamento empírico para infecções graves ou polimicrobianas é influenciada por vários fatores, tais como sítio de infecção, local de aquisição da infecção (comunitária ou hospitalar), idade do paciente, etc. Entretanto, a terapêutica inicial frequentemente consiste no uso de antimicrobianos de amplo espectro, ativos contra uma variedade de espécies microbianas, o que conseqüentemente, pode contribuir com a aquisição e disseminação de cepas resistentes (ANVISA, 2001, CDDEP, 2015).

Dentre os fármacos mais utilizados no tratamento empírico das infecções por *P. aeruginosa* e outros bacilos Gram-negativos, destacam-se os β -lactâmicos, que correspondem 60% das opções terapêuticas, pois são fármacos de amplo espectro, que apresentam grande eficácia e segurança e também ação farmacológica ajustável, ou seja, pode ser ampliada ou restaurada por manipulação química (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

2.3.1 Antimicrobianos β -lactâmicos

Diferentes classes de antimicrobianos β -lactâmicos desempenham atividade contra *P. aeruginosa*, tais como as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos. Além dos β -lactâmicos, outras classes de antibióticos também apresentam atividade anti-*Pseudomonas*, que diferem entre si pela estrutura química dos anéis secundários, diferenciando assim as suas características e espectro de ação, tais como os aminoglicosídeos, as fluorquinolonas, especialmente ciprofloxacino e levofloxacino, e as polimixinas, que apesar de ser muito tóxica, geralmente é utilizada como última opção terapêutica (ANVISA, 2001; SUÁREZ, 2009; CLSI, 2015).

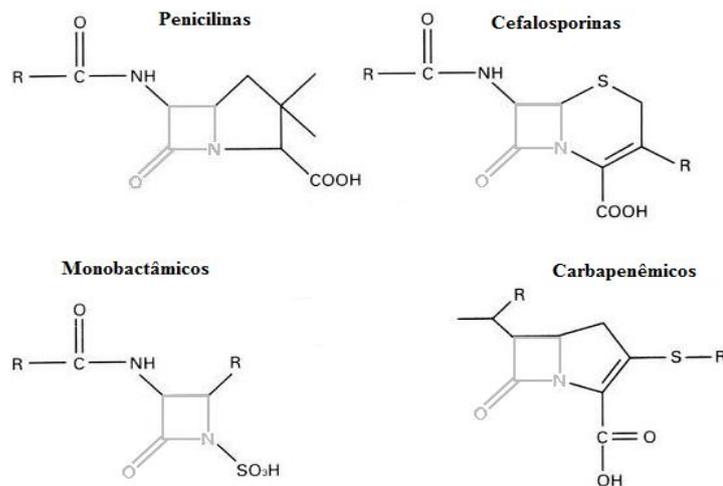


Figura 2 – Estrutura química dos β -lactâmicos.

Legenda: Em cinza, o núcleo estrutural (anel β -lactâmico). **R:** cadeia lateral. Os anéis secundários variam quimicamente, as penicilinas contêm o anel tiazolidínico, as cefalosporinas um anel diidrotiazina, os carbapenêmicos um anel pirrolínico e os monobactâmicos não apresentam anel secundário.

FONTE: adaptado de Williams et al. (1999).

A ação farmacológica dos β -lactâmicos é conferida pela capacidade em interferir na manutenção da parede celular bacteriana, através da inibição da síntese de peptidoglicano, que é um componente essencial para estruturar esse componente. Essa inibição ocorre pois os β -lactâmicos ligam-se e inibem as proteínas ligadoras de penicilinas (PBP, do inglês, *penicillin binding proteins*), estruturas presente em bactérias Gram-negativas, essenciais na etapa final da síntese da parede (QUEENAN; BUSH, 2007; MANIATI et al., 2007; SCHEFFER et al., 2010).

Todos os agentes antimicrobianos pertencentes à classe dos β -lactâmicos estão suscetíveis aos mesmos mecanismos de resistência antimicrobiana, que correspondem a hidrólise enzimática por β -lactamases, perda da permeabilidade da membrana bacteriana ao fármaco, aumento do efluxo do medicamento do interior celular para o meio extracelular e alteração do sítio de alvo dos fármacos (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

2.3.1.1 Penicilinas

As penicilinas, descobertas em 1928, por Fleming, são excelentes classe de antimicrobianos, pois são muito eficazes e apresentam baixa toxicidade, no entanto, o aumento de cepas resistentes a essa classe de fármacos tem limitado o seu uso (GIN et al., 2007).

As penicilinas anti-*Pseudomonas*, que são assim denominadas por apresentarem atividade contra *P. aeruginosa*, incluem a carbenicilina, a ticarcilina e piperacilina. A piperacilina é a mais potente, sendo eficazes contra vários bacilos Gram-negativos. O espectro antimicrobiano desse fármaco pode ser ampliado pela associação a inibidores de enzimas β -lactamases, os quais apesar de apresentam atividade antibacteriana mínima, podem inibir a hidrólise enzimática desses fármacos (GIN et al., 2007). Atualmente, são utilizados três inibidores de enzimas β -lactamases, o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (SAUVAGE et al., 2008; CLSI, 2015).

As penicilinas, assim como os demais β -lactâmicos, desenvolvem suas propriedades farmacológicas através da inibição da parede celular bacteriana, promovendo a lise celular das células bacterianas (QUEENAN; BUSH, 2007; MANIATI et al., 2007; SCHEFFER et al., 2010).

A piperacilina é um agente antimicrobiano pertencente à classe das penicilinas, que apresenta atividade de largo espectro, sendo ativo contra muitos micro-organismos aeróbios e anaeróbios, Gram-positivas e Gram-negativas. Em associação ao tazobactam, demonstra atividade contra *P. aeruginosa*, *Pneumococos*, *Streptococos*, *Enterococcus faecalis* (SAUVAGE et al., 2008; CLSI, 2015).

A adição de tazobactam nem sempre aumenta a suscetibilidade de *P. aeruginosa* e outros bacilos Gram-negativo que expressam β -lactamases AmpC codificadas nos

cromossomos (GIN, 2007). Entretanto, o tazobactam amplia a atividade de piperacilina contra a maioria das cepas produtoras de β -lactamase e tem o potencial de reduzir CIMs (concentração inibitória mínima) contra as bactérias que expressam ESBL (ENDIMIANI, 2010; CLSI, 2015).

Vários são os mecanismos de resistência apresentados por *P. aeruginosa* contra as penicilinas. A aquisição de resistência através da transferência de plasmídeos, tem sido a principal causa de inviabilidade da ação das penicilinas, pois esses elementos genéticos podem conferir atividade de enzimas β -lactamases. Além disso, *P. aeruginosa* também pode se tornar resistente às penicilinas devido a perda de porinas, diminuindo a permeabilidade do antibiótico através da membrana celular externa da bactéria, tornando-se incapaz de alcançar o alvo PBPs (SAUVAGE, 2008; DRAWZ; BONOMO, 2010).

2.3.1.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas são classificadas em primeira, segunda, terceira e quarta geração, de acordo com o padrão de suscetibilidade bacteriana e perfil de resistência à β -lactamases. As cefalosporinas que apresentam atividade farmacológica anti-*Pseudomonas* correspondem à terceira e quarta geração, que incluem os antimicrobianos ceftazidima e cefepima, respectivamente (SUÁREZ, 2009). O uso desses fármacos deve ser adotado com cautela, pois essas classes de antimicrobianos podem induzir a produção de β -lactamases pelos microorganismos, podendo induzir e disseminar resistência antimicrobiana (PICÃO; GALES, 2007).

Com a resistência a penicilinas mediadas por β -lactamases, as cefalosporinas de amplo espectro passaram a ser comumente utilizadas, o que favoreceu o surgimento de bactérias produtoras de ESBLs. Com isso, a resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração em *P. aeruginosa*, em geral, é atribuída à produção de β -lactamases cromossomais do tipo AmpC, que inativam as cefalosporinas de amplo espectro e não são inibidas pelos inibidores de β -lactamases (PICÃO; GALES, 2007; THOMSON, 2010).

A cefepima geralmente é a cefalosporina de escolha, por penetrar mais rapidamente na célula bacteriana e ser mais estável à hidrólise causada pela enzima AmpC, no entanto como é substrato para a maioria das ESBLs, os antimicrobianos carbapenêmicos têm se tornado a

opção terapêutica frente a presença dessas β -lactamases (PICÃO; GALES, 2007; THOMSON, 2010).

2.3.1.3 Monobactâmicos

Os Monobactâmicos diferenciam-se dos demais β -lactamâmicos, pois o seu anel estrutural não está fundido a um anel secundário. O aztreonam é o único agente antimicrobiano representante dessa classe, apresentando espectro de ação estreito, ativo apenas contra *P. aeruginosa* e outras *Enterobacteriaceae*, apresentando a sensibilidade variável (SUÁREZ, 2009; CLSI, 2015).

O aztreonam é geralmente resistente a ação das β -lactamases, exceto às ESBLs. Em infecções graves por *P. aeruginosa*, esses fármacos devem ser usados, preferencialmente, em sinergismo a outros antimicrobianos (ANVISA, 2001; PICÃO; GALES, 2007).

2.3.1.4 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são antimicrobianos sintéticos, cuja a estrutura apresenta um átomo de carbono externalizado no anel tiazolidinico, o qual confere o seu mecanismo de ação antimicrobiana (SUÁREZ, 2009). Esses fármacos são as principais opções terapêuticas no combate de infecções nosocomiais graves, principalmente para o tratamento de infecções por bactérias MDR produtoras de β -lactamases de espectro estendido (QUEENAN; BUSH, 2007; SCHEFFER et al., 2010; POTRON et al., 2015). O meropenem e o imipeném são dois importantes antibióticos dessa classe, pois apresentam um largo espectro de atividade bactericida (EL GARCH et al., 2011).

São considerados muito potentes pois apresentam ação de espectro ampliado, ativos contra bactérias Gram-positivas e negativas. Além disso, esses fármacos apresentam alta afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina, são estáveis à ação de muitas β -lactamases, tais como as ESBL e AmpC e são altamente permeáveis à membrana externa das bactérias, o que contribuem para o seu crescente uso terapêutico (GIN, 2007; OHARA et al., 2007;

CEZÁRIO et al., 2009). Entretanto, esse uso constante tem aumentado a quantidade de cepas resistentes a esse fármaco, pois favorecem a pressão seletiva, o que consequentemente viabiliza a persistência das bactérias mais resistentes (MANIATI et al., 2007; HONG et al., 2015).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* está relacionada principalmente à síntese de β -lactamases do tipo carbapenemases, que são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico desses fármacos (NORDMANN et al., 2009; JEON et al., 2015). Apesar da resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* estar relacionada principalmente com a produção de enzimas M β L, a resistência ao imipeném é mais comumente adquirida pela perda de porina, principalmente a *OprD*. O imipeném é resistente à hidrólise pela maioria das β -lactamases, mas não pela metalo- β -lactamases. O ertapném, outra classe de carbapenemo, não é efetivo contra *P. aeruginosa*, pois a maioria das cepas são resistentes (QUEENAN; BUSH, 2007; THOMSON, 2010; JEON et al., 2015).

Um levantamento sobre a distribuição geográfica de isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (CRPA, do inglês, *carbapenem-resistant P. aeruginosa*) demonstrou que na maior parte dos países, a proporção de CRPA variou de 10 a 50% (Figura 3) (HONG et al., 2015).

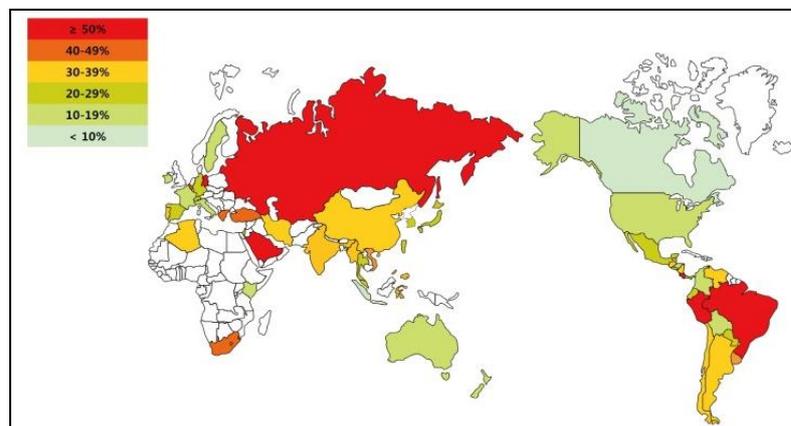


Figura 3 – Distribuição geográfica de isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (CRPA).

Legenda: As áreas em vermelho maiores taxas de resistência; em branco, indicam que não havia dados publicados disponíveis para essa região.

FONTE: Retirado de Hong et al. (2015)

Esse levantamento demonstrou que no Canadá e na República Dominicana foram relatados os menores índices de CRPA, correspondendo, respectivamente a 3,3% e 8%. Brasil, Peru, Costa Rica, Rússia, Grécia, Polônia, Irã e Arábia Saudita apresentaram taxas de

resistência que variam entre 50% a 75,3% para os carbapenêmicos. Rússia, Sudoeste da Ásia e América do Sul foram as áreas predominantes, com altas taxas de resistência antimicrobiana (HONG et al., 2015).

2.3.2 Outras opções terapêuticas

2.3.2.1 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos derivados dos *Streptomyces* spp. ou dos *Micromonospora*, geralmente são usados no tratamento de infecções graves causadas por bacilos gram negativos aeróbios. No entanto, como está associado a um alto grau de toxicidade, eles têm sido substituídos pelo uso de cefalosporina de terceira e quarta geração, fluoroquinolonas ou pelos carbapenêmicos (ROMANOWSKA et al., 2013).

A resistência de *P. aeruginosa* aos aminoglicosídeos é conferida por vários mecanismos, tais como a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME), de metilase do 16S rDNA, perda de porinas e a atividade de efluxo aumentada. As enzimas metilases do 16S modificam quimicamente a estrutura do antibiótico, antes que este se ligue ao seu alvo, através da metilação sítio-específica do RNA ribossômico 16S (YAMANE et al., 2007; ROMANOWSKA et al., 2013).

A expressão das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos é uma característica comum de *P. aeruginosa*. Essas enzimas agem alterando os sítios das moléculas dos aminoglicosídeos, através da acetilação, fosforilação ou adenilação. Alguns isolados apresentam as enzimas 6'-fosfotransferase e 3'-fosfotransferase, que modificam neomicina e kanamicina. Outras sintetizam a 3-acetiltransferase e 2-adeniltransferase, que por sua vez modificam os aminoglicosídeos gentamicina e a tobramicina. O gene *aac(6')* que codifica a enzima acetiltransferase 6' está frequentemente associado com os genes que codificam as enzimas ESBL e a Mβla (ROMANOWSKA et al., 2013; BLAIR et al., 2015).

2.3.2.2 Fluoroquinolonas

As quinolonas são excelentes opções terapêuticas no combate das infecções respiratórias e urinárias. Esses fármacos atuam inibindo a DNA girase (topoisomerase tipo II) das bactérias Gram-negativas, evitando assim que fita de DNA das bactérias se dividam em duas simples, evitando que haja uma replicação do material genético (BONOMO; SZABO, 2006; CLOECKAERT, 2013)

O principal mecanismo de resistência da *P. aeruginosa* às quinolonas ocorre devido a mutações nos genes que codificam a DNA girase, o que conseqüentemente reduz a afinidade desses fármacos pelo sítio alvo. Essa mutação geralmente envolve o gene *gyrA*, responsável por codificar a subunidade A dessa enzima, o que altera os aminoácidos situados na região amina terminal da proteína (BONOMO e SZABO, 2006; BLAIR et al., 2015).

2.3.2.3 Polimixinas

As polimixinas são antibióticos sintetizados por bactérias da espécie *Bacillus polymyxa*, constituídos por um grupo de peptídeos policatiônicos. Essa classe de fármaco compreende os agentes antimicrobianos colistinas e a polimixina B, que atuam na parede celular de bactérias Gram negativas, alterando a permeabilidade da membrana celular, o que resulta na morte celular (FERNÁNDEZ et al., 2010; LIM et al., 2010).

As polimixinas são o último recurso terapêutico para o combate de *Pseudomonas* multirresistentes, por apresentar grande atividade antimicrobiana contra esse patógeno (MILLER et al., 2011). Entretanto, no início dos anos 80, essas drogas deixaram de ser comercializados no Brasil devido a sua alta toxicidade (LEVIN et al., 1999).

Apesar do uso incomum desse antimicrobiano, já há relatos de cepas resistentes às polimixinas (BONOMO e SZABO, 2006; MILLER et al., 2011). Essa resistência é conferida pela expressão exacerbada da porina *OprH*, que devido a uma mutação ou pela adaptação da bactéria a um ambiente hostil (pobre em íon magnésio), bloqueia a passagem de polimixina pela membrana externa. Há indícios de que essa resistência seja conferida por modificações da membrana externa, tais como a ausência de 2-hidroxilaurato, presença de 4-

aminoarabinose e aumento de palmitato na fração lipídica da membrana (BONOMO e SZABO, 2006; MILLER et al., 2011; BLAIR et al., 2015).

2.4 MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

São vários os mecanismos que conferem resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*, que podem ser específicos para uma classe de fármaco em particular, tais como alteração de sítio alvo, perda de proteínas de membrana, ou mecanismo geral, afetando diferentes tipos de antibióticos (Figura 4) (BLAIR et al, 2015).

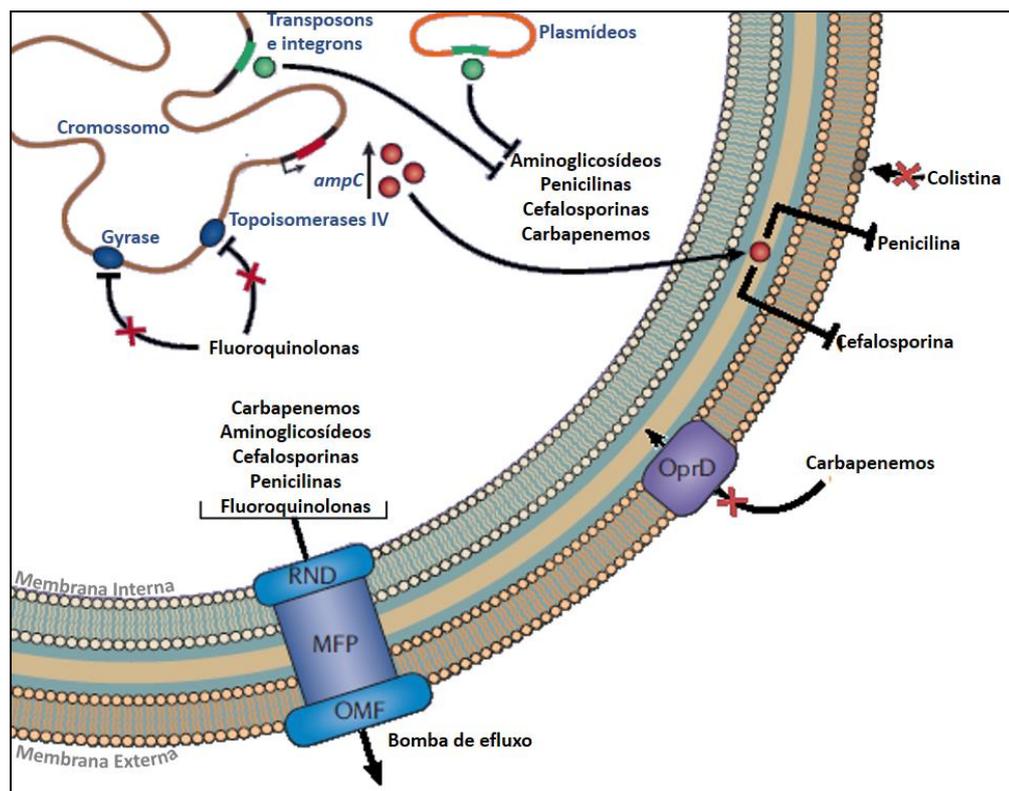


Figura 4 – Mecanismos de resistência antimicrobiana em cepas de *P. aeruginosa*.

Legenda: Figura esquemática demonstrando os mecanismos de resistência mais comuns em *P. aeruginosa*, que correspondem a superexpressão de bombas de efluxo, capaz de expulsar os antimicrobianos do interior da célula bacteriana; perda de proteína de membrana (p.ex. OprD), tornando a bactéria impermeável aos antimicrobianos; alteração do sítio alvo, tornando o antibiótico ineficaz; produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos, que são codificadas por genes presentes no cromossomo ou DNA plasmidial.

FONTE: Adaptado de Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/posters/pseudomonas/index.html>> Acesso em: 01 jul 2015.

Os mecanismos específicos incluem alteração do sítio alvo dos antimicrobianos, tais como alterações na topoisomerase IV e girase, que são alvo de fluoroquinolonas, ou no LPS que é alvo de colistina; perda de proteínas de membrana (porina OprD) tornando a membrana bacteriana impermeável aos carbapenêmicos ou modificação dos sistemas regulatórios como o AmpD, que suprime o gene que codifica indiretamente a β -lactamase AmpC (MANIATI et al., 2007; SCHEFFER et al., 2010; XAVIER et al., 2010; BLAIR et al., 2015).

Já os mecanismos gerais, incluem a super expressão de bombas de efluxo (Figura 4), que consiste em mecanismo natural presente em diversas bactérias, responsável por remover uma variedade de substâncias nocivas que penetram na membrana bacteriana, inclusive os antibióticos. É uma estrutura trimérica, constituída por proteína de membrana externa (OMFs, do inglês, *outer membrane channel-forming proteins*), uma proteína citoplasmática associada à membrana interna (RND, *resistance-nodulation-cell division*), que é um canal de saída situado na membrana externa e por fim, uma proteína de fusão, situado no periplasma (MFP, *membrane fusion protein*), que conecta a bomba à porina (LI; NIKAIDO, 2009; XAVIER et al., 2010; NEVES et al., 2011; BLAIR et al., 2015).

Alguns mecanismos de resistência antimicrobiana podem ser codificados a partir de genes contidos em plasmídeos, transposões e integrons, incluindo genes que codificam enzimas inativadoras de antimicrobianos, tais como as enzimas metalo- β -lactamase (M β Ls), que são ativas contra quase todos os β -lactâmicos e enzimas que inativam aminoglicosídeos (DENG et al., 2015; BLAIR et al., 2015).

2.4.1 Integrons e Cassetes Gênicos

A disseminação da resistência bacteriana deve-se principalmente à constante transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias de diferentes espécies, frequentemente mediadas por plasmídeos ou transposons associados a integrons e cassetes gênicos. A pressão seletiva exercida pelos antibióticos, que seleciona os isolados que adquirem resistência, também contribuem com o surgimento de cepas resistentes. Provavelmente, a pressão do ambiente se deve ao uso indiscriminado e incorreto dos antibióticos e descarte inadequado no ambiente (MAZEL, 2006; PARTRIDGE et al., 2009; NORDMANN, 2011; WRIGHT, 2011; DENG et al., 2015).

Os integrons consistem em elementos genéticos capazes de inserir e expressar diferentes genes de resistência. Esses elementos são basicamente constituídos de regiões conservadas 5' (5'-CS) e 3' (3'-CS). A região 5'-CS contém um gene que codifica enzima integrase (*intI*), da família da tirosina recombinase, dois promotores, sendo que o promotor P_{in} regula a expressão do gene *intI* e o P_c que regula a transcrição de genes cassetes quando inseridos no integron, e por fim, um sítio de recombinação denominado *attI*. A região 3'-CS é geralmente composta pelos genes *qacEΔ* e *sul1*, que codificam, respectivamente, resistência aos compostos de amônio quaternário e sulfonamidas e uma *orf5* de função desconhecida (Figura 5) (DENG et al., 2015).

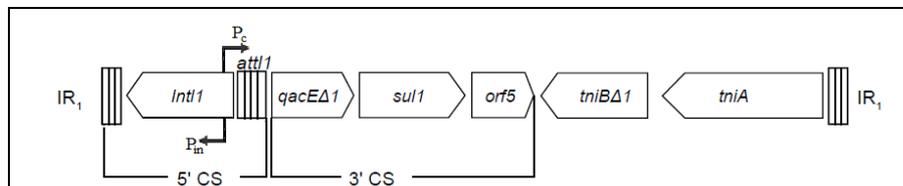


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura dos integrons.

Legenda: 5'CS, 3'C: Segmento 5' e 3' conservados; *IntI1*: gene *intI1*, codificador de integrase; P_{in} e P_c : promotores da expressão do gene *intI1* e do cassete gênico, sucessivamente; *attI*: sítio de recombinação; *qacEΔ*, *sul1* e *orf5*: genes que codificam, respectivamente, resistência aos compostos de amônio quaternário, resistência as sulfonamidas, proteína de função desconhecida.

FONTE: Adaptado de Mendes et al. (2006)

Os cassetes gênicos são elementos móveis, compostos por um simples quadro de leitura aberta (ORF, do inglês, *open reading frame*) e um sítio de recombinação, denominado sítio *attC* ou 59 elementos de base (59-be, do inglês, *base element*) (Figura 6) (DENG et al., 2015).

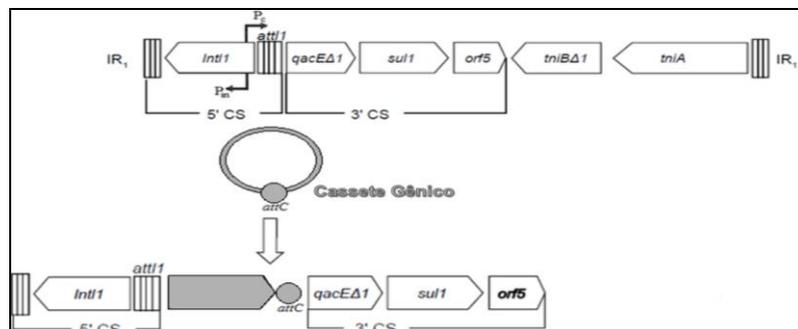


Figura 6 – Integração de genes cassetes por recombinação sítio-específica.

Legenda: Integrase codificada pelo gene *intI*, catalisa a recombinação entre o sítio *attI* do integron e o sítio *attC* do cassete gênico, resultando em inserção ou excisão. Setas horizontais indicam as orientações da expressão.

FONTE: Adaptado de Mendes et al. (2006).

O cassete gênico não contém promotor, portanto a sua expressão depende de um promotor presente no integron denominado P_c , localizado entre as regiões conservadas 5' e 3' (DENG et al., 2015). As sequências ATT, presentes nos sítios *attI1*, *attC* e sítios secundários, são necessários para a inserção e excisão dos cassetes nos integrons (MAZEL, 2006)

Os cassetes gênicos circulares são inseridos no integron por recombinação sítio-específico entre os sítios *attI1* e *attC*, um processo mediado pela integrase codificada pelo integron, tornando os cassetes gênicos funcionais, o que contribui para a aquisição e disseminação de genes de resistência (CHANDLER, 2006; MAZEL, 2006; DENG et al., 2015).

A classificação dos integrons em diferentes classes dependem basicamente da sequência de aminoácidos da enzima integrase. Na literatura são descritas, principalmente, quatro classes de integrons. Os integrons de classes 1, 2 e 3 foram primeiramente identificados associados a elementos móveis e o integron de classe 4 (*intI4*) e outros em integrons cromossomais (CHANDLER, 2006; XU et al., 2011a). Os genes *intI* são comumente empregados na identificação das diferentes classes de integrons (PARTRIDGE et al., 2009; XU et al., 2011a).

Os integrons de classe 1 geralmente estão associados a plasmídeos, no entanto também podem está presente em DNA genômico e transposons. Já os integrons de classe 2, são mais frequentemente carregados por transposons (XU et al., 2009, 2011a, 2011b).

2.4.2 Enzimas β -Lactamases

As β -lactamases são enzimas bacterianas capazes de inativar por hidrólise os antimicrobianos β -lactâmicos, principalmente as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (QUEENAN et al., 2007; JEON et al., 2015). São sintetizadas a partir de genes contidos em plasmídeos transferíveis, em cromossomos ou em transposons (DOLEJSKA et al., 2012; BLAKE et al., 2013).

Essas enzimas podem ser classificadas de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos e nucleotídeos, agrupando-as em Classes A (serinas penicilases), B (metalo- β -lactamases), C (cefalosporinases) e D (oxacilinas) (AMBLER, 1980). Ou podem ser

qualificadas segundo Bush e colaboradores (1995), que baseia-se na estrutura molecular das β -lactamases, classificando-as em grupos funcionais de 1 a 4. A classificação segundo os critérios de Ambler (1980) é a mais comumente empregada (JEON et al, 2015).

O mecanismo de resistência dessas enzimas é conferido pela capacidade de clivarem o anel β -lactâmico dos fármacos antes que se liguem ao sítio alvo (subunidades do ribossomo) na bactéria. Dessa forma, essas enzimas degradam a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, incluindo aqueles associados aos inibidores de β -lactamases, como tazobactam, clavulanato e sulbactam (GIN et al., 2007; SUÁREZ et al., 2009).

O mecanismo de hidrólise dos β -lactâmicos difere entre as enzimas, dentre as quais as metalo-enzimas (M β L) utilizam cátions divalentes, como o zinco para exercer sua ação (Figura 7). Já as enzimas designadas como não-metallo β -lactamases (não-M β L), independem da presença de zinco para hidrolisar tais fármacos (LEE et al., 2010; JEON et al., 2015).

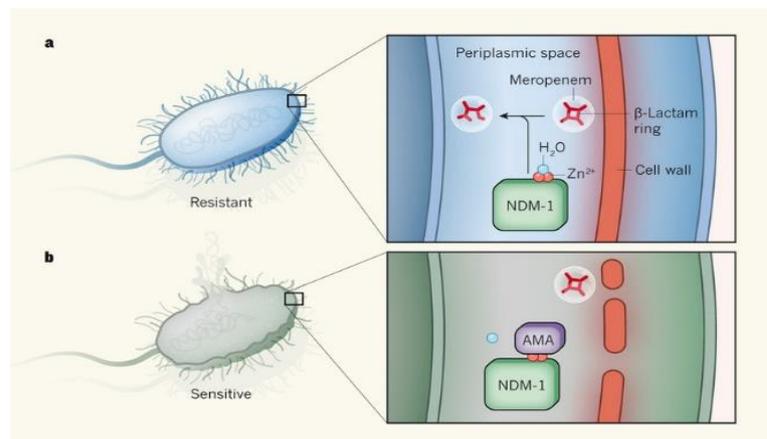


Figura 7 – Mecanismo de resistência aos β -Lactâmicos conferido por enzimas M β L.

Legenda: a) isolados resistentes e b) sensíveis aos β -Lactâmicos.

FONTE: adaptado de <<http://www.nature.com/nature/journal/v510/n7506/full/510477a.html>> Acesso em: 20 out 2015

As enzimas pertencentes ao grupo não-M β L corresponde as enzimas das classes A, C (AmpC) e D de Ambler, as quais inativam os fármacos β -lactâmicos através de um resíduo de serina cataliticamente ativo. Já as enzimas agrupadas na classe molecular B são metalo-enzimas (M β L), pois necessitam de zinco para a sua atividade catalítica (GU et al., 2007; OHARA et al., 2007; JEON et., al 2015).

As ESBL, pertencentes à classe A de Ambler e as M β Ls classificada no grupo B de Ambler, têm sido frequentemente associado a mecanismos múltiplos de resistência, por esse

motivo são alvos de vários estudos em relação a ação antimicrobiana (GU et al., 2007; OHARA et al., 2007; PICÃO et al., 2007; TÄNGDÉN et al., 2013).

A maioria das MβLs, exceto para as enzimas do tipo SPM, são codificados a partir de genes contidos em elementos móveis, como os cassetes gênicos, que são capturados e expressos por integrons, principalmente pelos integrons tipo 1. Essa condição facilita a disseminação de genes de resistência, pela transferência horizontal de genes entre diferentes espécies de bactérias e gêneros (GU et al., 2007; (PARTRIDGE et al., 2009; EDELSTEIN et al., 2013). Essa disseminação também tem sido frequentemente relacionada a transposons mediados por plasmídeos, principalmente para as ESBL (PICÃO et al., 2007; TÄNGDÉN et al., 2013).

As enzimas β-lactamases são de ocorrência mundial, mas a prevalência varia de acordo com os diferentes tipos de metalo-β-lactamases (WHO, 2012) (Figura 8).

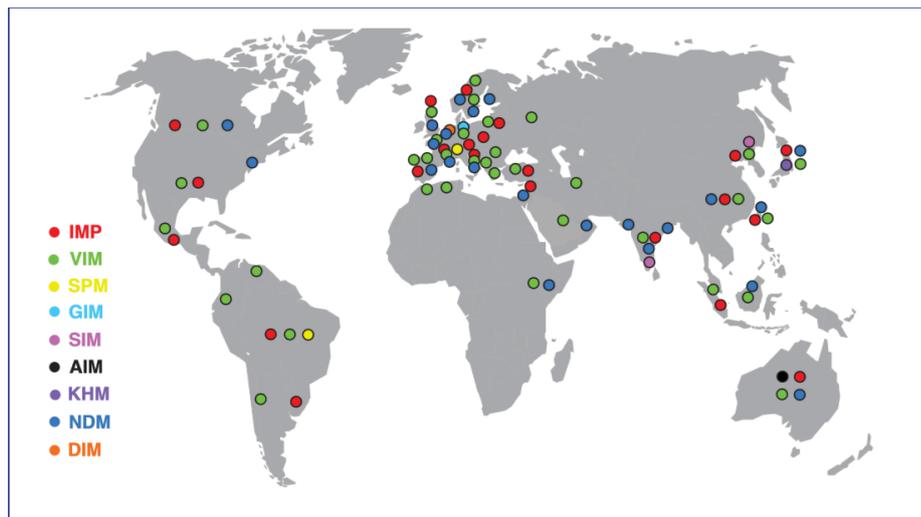


Figura 8 – Distribuição mundial de diferentes metalo-β-lactamases.

Legenda: IMP: enzimas tipo imipeném; VIM: Verona integron codificador de metalo-β-lactamase; SPM: São Paulo metalo-β-lactamase; GIM: Germano imipenemase; SIM: Seoul imipenemase; AIM Austrália imipenemase; KHM: Kyorin ciência da saúde metalo-β-lactamase; NDM: Nova Delhi metalo-β-lactamase; DIM: Dutch imipenemase.

FONTE: WHO (2012).

As MβL adquiridas mais frequentes, tais como as enzimas tipo IMP (*imipinem metalo-β-lactamase*) e VIM (*Verona metalo-β-lactamase codificada por integron*), foram detectadas pela primeira vez na década de 1990, no Japão e Itália, respectivamente (WATANABE et al., 1991; LAURETTI et al., 1999). Depois disso, muitos outros tipos de MβL adquiridas e suas variantes foram relatadas mundialmente, incluindo a SPM (*São Paulo metalo-β-lactamase*) (TOLEMAN et al., 2002), GIM (*Germano imipenemase*) (CASTANHEIRA et al., 2004), SIM

(*Seoul imipinemase*) (LEE et al., 2005), AIM (*Austrália imipinemase*) (YONG et al., 2007), KHM (*Kyorin health science metalo- β -lactamase*, indetificada na Universidade Kyorin, Ciências da Saúde) (SEKIGUCHI et al., 2008), NDM (*Nova Delhi metalo- β -lactamase*) (YONG et al., 2009), DIM (*Dutch imipenemase* ou *imipinemase “alemã”*) (POIREL, 2009), TMB (*Tripoli metalo- β -lactamase*) (EL SALABI et al., 2009), e enzimas FIM (*Florence Imipenemase*) (WACHINO et al., 2011; EL SALABI et al., 2012). Os isolados produtores de M β L começaram a ser descritos no Brasil em 2002 (GALES et al., 2003).

Desde a descoberta de IMP-1, que foi a primeira M β L identificada em isolados de *P. aeruginosa*, variantes têm sido relatadas mundialmente de forma constante, incluindo IMP-, VIM-, GIM-, NDM (HONG et al., 2015). Já a enzima a SPM, até 2010 havia sido descrita no Brasil e Suíça (TOLEMAN et al., 2002; EL SALABI, 2010).

Os isolados de *P. aeruginosa* produtores de ESBL e suas variantes também são frequentemente relatados, tais como PER (*Pseudomonas extended resistance*) (NORDMANN et al., 1993), TEM (*Temoniera extended spectrum beta-lactamase*) (MUGNIER et al., 1996); SHV (*Sulphydryl variable extended spectrum beta-lactamase*) (YAN et al., 2001), VEB (*Vietnamese extended spectrum beta-lactamase*) (GIRLICH et al., 2001; 2002). GES (*Guiana extended-spectrum β -lactamase*) (DUBOIS et al., 2002), BEL (*Belgium extended spectrum β -lactamase*) (POIREL et al., 2005).

As enzimas carbapenemases pertencem à família mais versátil de β -lactamases, capazes de hidrolisar os carbapenêmicos e muitos outros β -lactâmicos disponíveis, sendo a única exceção o monobactâmico aztreonam, por esse motivo são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de resistência da *P. aeruginosa* aos antibióticos carbapenêmicos. O surgimento e a propagação da resistência adquirida aos carbapenêmicos devido a carbapenemases é uma grande preocupação da saúde pública (QUEENAN; BUSH, 2007; LEE et al., 2010; SCHEFFER et al., 2010; MAMMERI et al., 2010; JEON et al., 2015).

As carbapenemases atualmente encontradas em *P. aeruginosa* pertencem à classe A de Ambler, tais como as enzimas GES e KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (JEON et al., 2015). Estas enzimas hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas de forma mais eficiente do que os carbapenêmicos e são inibidas pelos clavulanato, exceto para algumas enzimas tipo KPC, tais como KPC-2 (LEE et al., 2010; NORDMANN, 2011). Já as de classe B, incluem as enzimas tipo IMP, VIM, NDM, SPM, AIM e GIM, que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas são incapazes de clivar o aztreonam (MAMMERI et al., 2010; THOMSON et al., 2010). As de classe D, pertencentes a família OXA (*oxacilinases*)

raramente são reportadas em *P. aeruginosa*. Essas enzimas hidrolisam os carbapenêmicos fracamente e são parcialmente inibidas por clavulanato (THOMSON et al., 2010; MAMMERI et al., 2010; EL GARCH et al., 2011).

Dentre as oxacilinases, a OXA-198, apesar de rara ocorrência, é a que apresenta maior importância em relação a *P. aeruginosa* (QUEENAN, 2007; NORDMANN et al., 2009; EL GARCH et al., 2011). Apesar de haver relatos de resistência atribuída à presença de OXA em isolados de *P. aeruginosa*, por muito tempo a resistência mediada por essa enzima foi considerada secundária à enzima de classe A, e alguns subtipos foram consideradas como enzimas constitutivamente expressas por *P. aeruginosa*, inclusive indicada para o uso concomitante com outros marcadores moleculares para identificação definitiva de espécies de *P. aeruginosa* (EVANS; AMYES, 2014).

2.5 FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA EM *P. aeruginosa*

Devido ao crescimento de resistência antimicrobiana, definições harmonizadas nas quais são descritas e classificadas as bactérias resistentes a múltiplos fármacos tem sido propostas para que dados de vigilância epidemiológica possam ser recolhidas de forma fiável e comparadas entre serviços de saúde de diversos países. No sentido mais amplo, rotula-se de organismos multirresistentes (MDROs, do inglês, *multidrug-resistant organisms*) aqueles com resistência *in vitro* a mais de um agente antimicrobiano. No entanto, essa nomenclatura não delimita a quantidade e o tipo de antimicrobianos aos quais as cepas bacterianas apresentam resistência, fato que tem resultado em diversas propostas de classificação e definição (FALAGAS et al., 2006; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2008; MAGIORAKOS et al., 2012; GERMAN et al., 2016).

De acordo com o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, os isolados podem ser classificados como sensíveis, sensibilidade intermediária ou resistentes aos antimicrobianos testados. Outra designação utilizada refere-se aos isolados não suscetíveis (NS), que engloba os isolados com sensibilidade intermediária e resistentes aos antimicrobianos testados (MAGIORAKOS et al., 2012; GERMAN et al., 2016).

A resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* pode ser classificada como multirresistentes (MDR, do inglês, *multidrug-resistant*), quando não suscetíveis a pelo menos

um agente antimicrobiano em três classes dos seguintes fármacos: aminoglicosídeos, penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas e fluoroquinolonas; ou Pan-resistentes (PDR, do inglês, *pan-drug resistance*) quando não suscetíveis a todas as classes de fármacos utilizados para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*. Uma outra classificação, não muito reportada, são as cepas XDR (do inglês, *extremely drug resistant*) que referere-se à extrema resistência aos fármacos, ou seja, que não é suscetível a mais de um agente antimicrobiano, em quase todas as classes, mas que ainda apresenta suscetibilidade em duas categorias (MAGIORAKOS et al., 2012).

A rede RM divulgou os fenótipos e as taxas de sensibilidade de *P. aeruginosa* para os principais antibióticos utilizados para o tratamento dessas infecções no Brasil. Nesse levantamento observou-se que os isolados apresentaram maior resistência a gentamicina e levofloxacino, com 55% e 52%, respectivamente. Ainda se observou que o meropenem e o imipeném ainda são bastante eficazes para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, pois os isolados estudados apresentaram, respectivamente, 63% e 66% de sensibilidade. A piperaciclina associada ao Tazobactam foi o antibiótico mais eficaz dentre os estudados, onde os isolados apresentaram 72% de sensibilidade a esse fármaco (ANVISA, 2007).

Na década de 60, *P. aeruginosa* apresentava-se resistente a quase todos os antibióticos disponíveis, sendo sensíveis apenas às polimixinas. Com advento de novas opções terapêuticas, foi possível o tratamento eficaz dessa infecção, onde essa bactéria apresentou sensibilidade a alguns aminoglicosídeos, tais como a gentamicina, a amicacina, o tobramicina e a metilmicina, às carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, a algumas cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima) e de quarta geração, aos carbapenemas, ao aztreonam e às fluoroquinolonas (ciprofloxacino) (NEVES et al., 2011). No entanto, nos últimos anos, a ação desses antibióticos no tratamento das infecções por *P. aeruginosa* tem se tornado ineficazes, tendo em vista a grande facilidade dessa bactéria em adquirir resistência antimicrobiana, seja por mecanismos intrínsecos ou adquiridos, tais como por mutação, conjugação, transposição ou indução (BLAIR et al., 2015; POTRON et al., 2015).

A SENTRY, um programa de vigilância sobre resistência antimicrobiana, realizou um levantamento sobre a frequência de patógenos multirresistentes em infecções urinária de pacientes hospitalizados na América Latina, no período de 1997 a 2000. Nesse contexto, *P. aeruginosa* foi o terceiro micro-organismo mais isolado, sendo 8% mais prevalente no período correspondente a 1997 e 1999, e 6,2% em 2000. Esse levantamento ainda demonstrou que os antibióticos com menor atividade antimicrobiana contra a *P. aeruginosa* foram as

fluoroquinolonas, sendo apenas 45% dos isolados sensíveis a esse antibiótico. As opções terapêuticas mais eficazes foram a piperacilina/tazobactam e o meropenem, onde os isolados apresentaram respectivamente, 81,8% e 81,1% de sensibilidade (GALES et al., 2002). Dentro desse contexto, o último levantamento referente ao principal perfil brasileiro de resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* refere-se à resistência aos carbapenêmicos (ANVISA, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Em estudos preliminares foram isoladas *P. aeruginosa* multirresistentes em amostras provenientes de efluentes brutos e tratados do Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto (MAGALHÃES, 2013). A presença dessas bactérias nos efluentes foi sugestiva de que a fonte dessa dispersão era de origem hospitalar e mais especificamente das UTIs, tendo em vista que *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que causa infecções em pacientes imunossuprimidos. Esse panorama é ainda mais facilitado quando o paciente está exposto a fatores de risco que aumentam as possibilidades de adquirir infecções hospitalares, como o uso dispositivos invasivos, procedimentos cirúrgicos e permanência por longos períodos, geralmente maiores que 25 dias, características comuns em pacientes de UTI. Sendo assim, surgiu a hipótese de que havia cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes causando infecções hospitalares em pacientes internados em UTI.

Além disso, as infecções hospitalares são consideradas um problema de saúde pública, pois inviabilizam as opções terapêuticas, aumentam os custos hospitalares e podem conduzir a sepse ou morte. Nas UTIs brasileiras essas infecções são responsáveis por 9% a 58% dos óbitos (GUIMARÃES et al., 2011; MARRA et al., 2011). Essas infecções trazem grandes impactos econômicos, sendo responsáveis por 40% dos gastos em UTIs, pois aumentam o tempo de internação dos pacientes, elevando os gastos com tratamentos e assistência médica (GUIMARÃES et al., 2011; MARRA et al., 2011). Vários estudos realizados no Brasil indicam a presença de cepas de *P. aeruginosa* MDR em ambiente hospitalar, no entanto, na região norte, em especial no Amazonas, esses dados são incompletos ou escassos, o que tornam as opções e condutas terapêuticas inadequadas (GALES et al, 2003; FONSECA et al., 2005; SADER et al., 2005; MARTINS et al., 2007; SCHEFFER et al, 2010a; 2010b; XAVIER et al., 2010; NEVES et al., 2011; DE ARAÚJO JÁCOME et al., 2012).

Portanto, detectar isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes, assim como identificar os fenótipos de resistência, bem como os mecanismos moleculares pelos quais se tornam resistentes é uma emergência pública, tendo em vista que essas bactérias tornam as opções terapêuticas atuais ineficazes, aumentando o índice de morbi-mortalidade assim como os custos com os cuidados à saúde.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a resistência antimicrobiana em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) em Manaus.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de amostras de pacientes, profissionais de saúde e estrutura hospitalar de Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) de diferentes hospitais.
- Verificar a ocorrência de multirresistência (MDR) e panresistência (PDR) entre os isolados estudados.
- Determinar a presença de grupos clonais entre os isolados MDR e PDR.
- Identificar integrons de classe 1, 2 e 3 nas cepas de *P. aeruginosa*.
- Identificar os cassetes gênicos presentes nos integrons de classe 1.
- Detectar os genes que codificam β -lactamases.
- Categorizar os fenótipos de resistência (MDR e PDR) em relação a presença de integrons, cassetes gênicos e produção de β -lactamases.

5. METODOLOGIA

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Universidade Federal do Amazonas (CEP-UFAM) sob o número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 42212815.3.0000.5020 (identificador do projeto), de 04 de março de 2015.

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

As cepas de *P. aeruginosa* foram isoladas a partir de diferentes amostras obtidas de pacientes, de profissionais e estrutura UTI de três hospitais situados na cidade de Manaus: Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto (HPS28), Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM) e Hospital e Pronto Socorro João Lúcio Pereira Machado (HPSJL) (Figura 9).

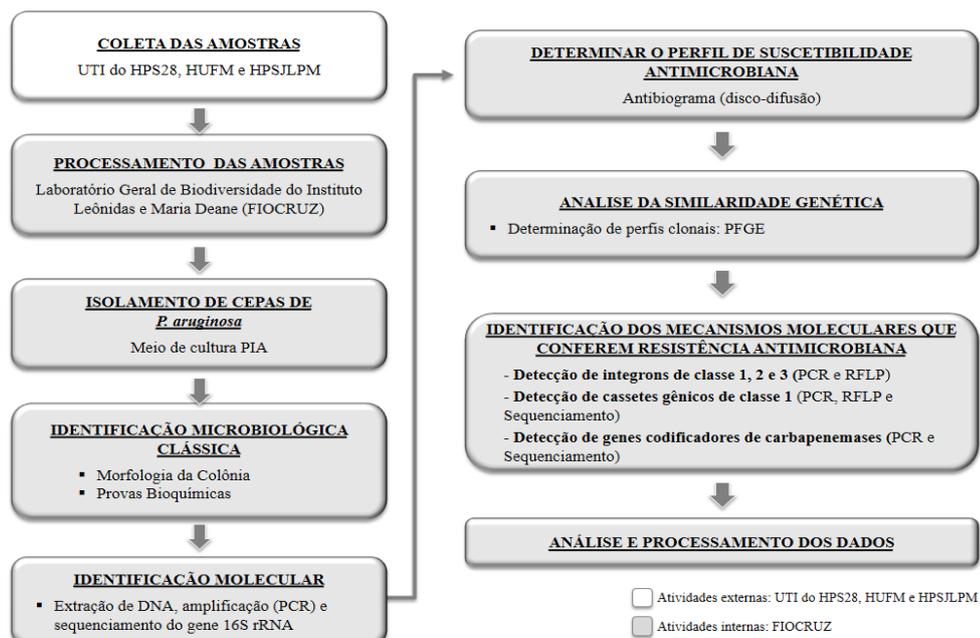


Figura 9 – Fluxograma das atividades realizadas.

Legenda: em branco, etapas realizadas nos hospitais HPS28, HUFM e HPSJL, em cinza, no Laboratório Geral de Biodiversidade do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ-Amazonia.

As amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório Geral de Biodiversidade do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Amazônia), situado na Rua Teresina, nº476, bairro Adrianópolis, Manaus, que foram processadas e analisadas para isolar, identificar (fenotípica e genotipicamente) cepas de *P. aeruginosa*, assim como determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana, presença de grupos clonais e detectar genes que codificam mecanismos de resistência aos isolados estudados

5.3 AMOSTRAGEM

O número de indivíduos na amostra (n amostral) foi definido por técnica de amostragem aleatória simples, com margem de erro menor igual a 5%, confiabilidade de 95% e proporção de contaminação de 0,8 (BOLFARINE; BUSSAB, 2005). O software Winpepi foi utilizado para o cálculo amostral.

O cálculo do n foi realizado utilizando dados obtidos de diferentes fontes. As informações referentes aos pacientes internados em UTI foram acessadas pelo Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), gerido pelo Ministério da Saúde, e disponibilizado pelo TABNET DATASUS (Departamento de informática do SUS). Este sistema viabilizou calcular a média de pacientes internados em UTI durante o período de 12 meses (agosto de 2013 a julho 2014) para todos os hospitais a serem analisados.

O n de profissionais intensivistas e de leitos de UTI foram obtidos a partir do CNESNet (Cadastro Nacional de Estabelecimento de Saúde), fornecidos pelo DATASUS, que disponibiliza informações sobre os estabelecimentos de saúde, tais como a quantidade e a qualificação dos profissionais, o número de leitos, o tipo de atendimento prestado, a estrutura física, os equipamentos existentes e em uso, etc.

Os dados quantitativos foram inseridos no programa estatístico Winpepi, que definiu o n amostral de pacientes e profissionais intensivistas. A coleta de amostras da estrutura hospitalar foi realizada de forma aleatória, priorizando-se os leitos dos pacientes estudados, bem como pisos, portas, pias e outras estruturas relevantes para análise.

5.4 COLETA, ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

A coleta de amostras foi realizada em pacientes, profissionais e estrutura da UTI dos hospitais HPS28, HPSJL e HUFM, que posteriormente foram encaminhadas para processamento e análise na FIOCRUZ-Amazônia (Figura 10).

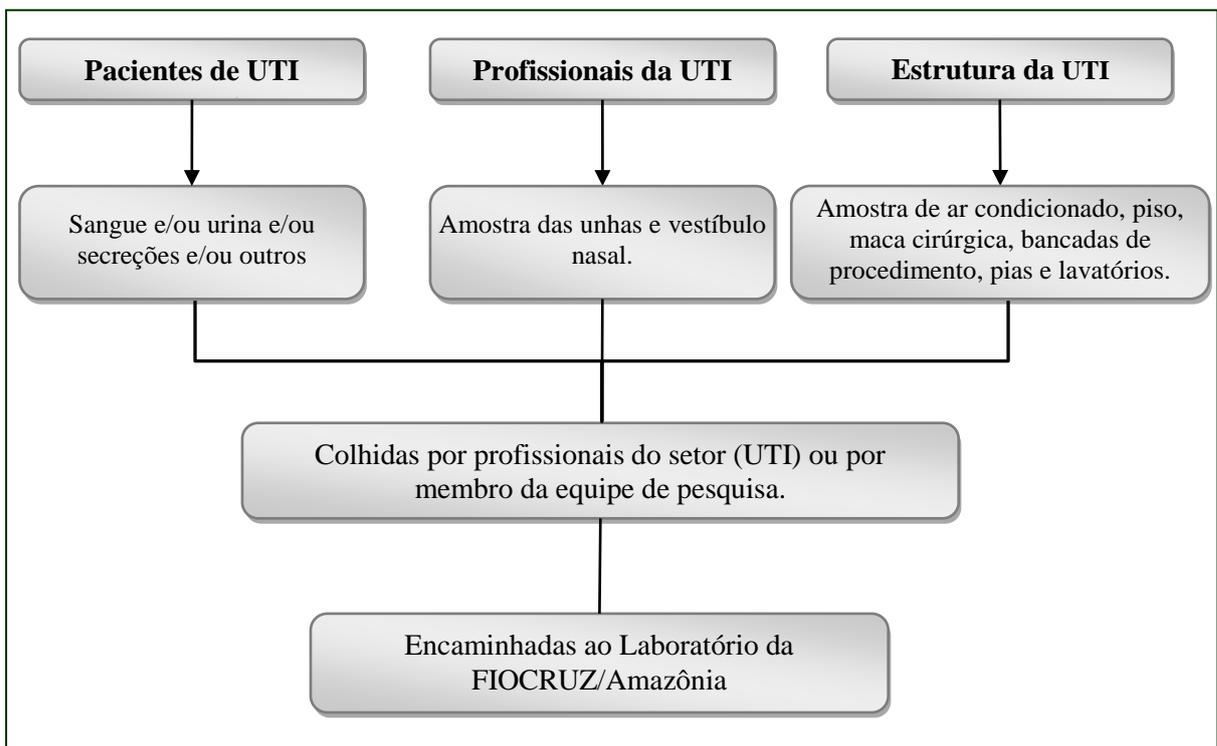


Figura 10 – Fluxograma das coletas e transporte de amostras.

Legenda: As amostras coletadas de pacientes, profissionais e de estrutura das UTIs dos hospitais HPS28, HPSJL e HUFM, foram encaminhadas e processadas na FIOCRUZ/Amazônia.

A coleta de amostras de pacientes e profissionais das UTIs foi previamente autorizada, pelo próprio sujeito da pesquisa ou responsável, sendo formalizada utilizando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os procedimentos de coleta foram realizados de acordo com as recomendações e legislações locais, pelos próprios profissionais do setor (UTI) e, por vezes, por membros da equipe de pesquisa legalmente habilitados, que sempre estavam acompanhados/supervisionados por profissionais do setor.

As diferentes amostras obtidas de pacientes foram coletadas de acordo com os fatores de risco para aquisição de infecções, tais como o uso de dispositivos invasivos (cateteres

centrais ou venosos, respiradores, traqueostomia, entre outros). Sendo assim, os tipos de amostras corresponderam ao sangue venoso, urina, *swab* de axila e/ou secreções (cânulas de secreção respiratória, traqueostomia, abscessos e feridas).

Além das coletas em pacientes, também foram coletadas amostras das unhas e do vestíbulo nasal dos profissionais que atuam na UTI, bem como amostras da estrutura hospitalar da UTI, tendo em vista que estes profissionais podem ser colonizados por bactérias distintas, que não pertencem a microbiota normal, bem como a disseminação dessas bactérias em ambiente hospitalar.

5.5. AMOSTRAS CONTROLES

Os controles positivos (cepas bacterianas) e negativos que foram utilizados no trabalho estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Controles positivos e negativo utilizados no trabalho.

CONTROLE	FINALIDADE	EXPERIMENTO
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (ATCC27853)	Identificação fenotípica e antibiograma Padrão positivo para o gene <i>16s rDNA</i> Padrão negativo para genes de resistência	Microbiologia clássica PCR e Sequenciamento
<i>P. aeruginosa</i> <i>Bla_{VIM+}</i> (CCBH18485) ^a	Padrão positivo para genes <i>intI1</i> e <i>Bla_{VIM+}</i>	PCR e Sequenciamento
<i>P. aeruginosa</i> <i>Bla_{KPC+}</i> (CCBH17378) ^a	Padrão positivo para genes <i>intI1</i> e <i>Bla_{KPC+}</i>	PCR e Sequenciamento
<i>P. aeruginosa</i> <i>Bla_{SPM+}</i> (CCBH17832) ^a	Padrão positivo para genes <i>intI1</i> e <i>Bla_{SPM+}</i>	PCR e Sequenciamento
<i>P. aeruginosa</i> <i>Bla_{GES+}</i> ^b	Padrão positivo para genes <i>intI1</i> e <i>Bla_{GES+}</i>	PCR e Sequenciamento
Água destilada	Padrão negativo	PCR

Legenda: ^aCepas padrões fornecidas pela FIOCRUZ-Rio de Janeiro, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar – CCBH.; ^bCepa padrão fornecida pelo Laboratório de Análises Clínicas Reunidos, localizado em Manaus.

5.6 TÉCNICAS EMPREGADAS

5.6.1 Metodologia Microbiológica Clássica

Métodos microbiológicos clássicos foram realizados para isolar, identificar fenotipicamente e armazenar cepas de *P. aeruginosa*. As etapas correspondentes consistiram em semear alíquotas das amostras em meio de cultura específico (Ágar para Isolamento de Pseudomonas - PIA) para possibilitar o crescimento típico das cepas, viabilizando armazenamento e testes subsequentes (Figura 11).

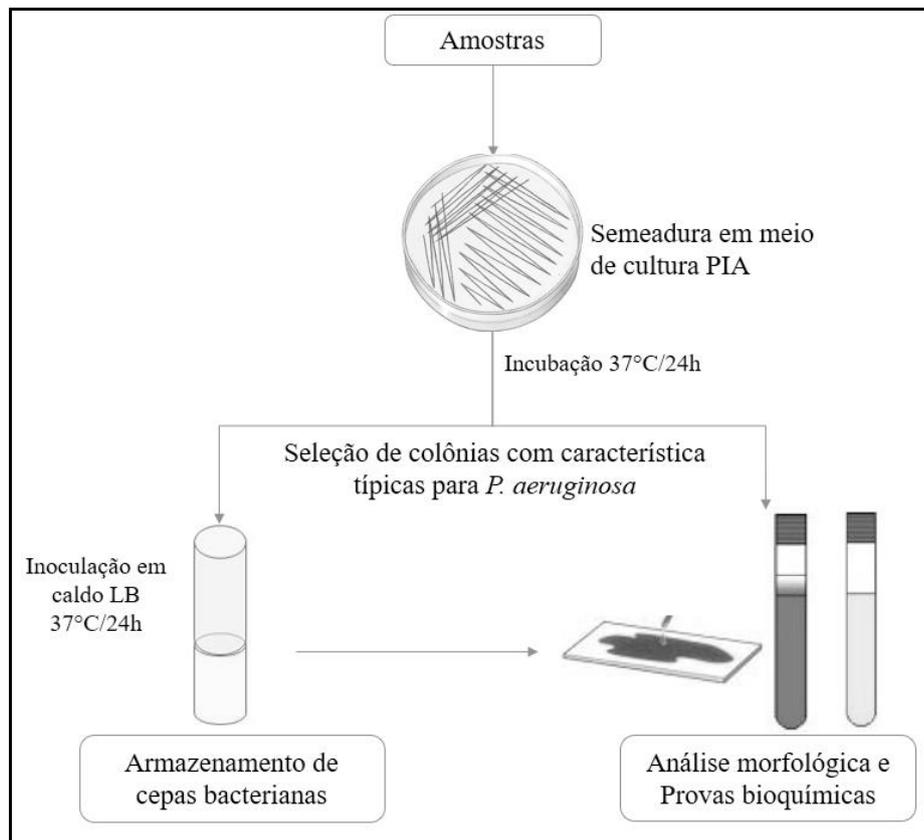


Figura 11 – Fluxograma dos métodos microbiológicos clássicos empregados.

Legenda: PIA (Ágar para Isolamento de Pseudomonas); LB (Caldo Luria Bertani Miller)

5.6.1.1 Isolamento das cepas de *P. aeruginosa*

As amostras foram devidamente processadas para possibilitar o isolamento de cepas de *P. aeruginosa*, que foi realizado através da técnica de semeadura qualitativa previamente descrita (ANVISA, 2004, 2013b) a fim de se obter colônias isoladas. Após inoculação, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, as colônias com crescimento característico de *P. aeruginosa* (Figura 12), tais como a presença de colônias azul-esverdeada conferida pela piocianina ou verde-amarelo fluorescente sobre UV (pioverdina) e odor característico de frutas, foram transferidas para meios de cultura enriquecidos, o caldo LB Miller (Caldo Luria Bertani Miller) para possibilitar o armazenamento e utilização de cepas para testes subsequentes.

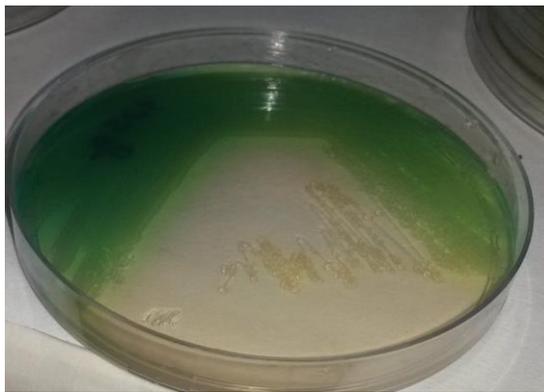


Figura 12 – Colônias de *P. aeruginosa* com crescimento característico

As colônias bacterianas foram analisadas quanto as características morfo-tintórias pela técnica de coloração de Gram, possibilitando visualizar bacilos avermelhados. Ainda foram avaliados as características bioquímicas da *P. aeruginosa*, tais como a produção de enzima citocromo-oxidase, motilidade, o crescimento bacteriano em caldo simples a 42°C e em meio de cultura MacConkey, a determinação da oxidação positiva e fermentação da glicose negativa (O/F Glicose), β -hemólise em Ágar Sangue, descarboxilação da lisina negativo, difusão de pigmento verde-amarelo fluorescente em meio de cultura (produção de pioverdina) quando exposto à luz ultravioleta (UV), e difusão de pigmento azul não fluorescente em meio de cultura (Figura 13a-d).

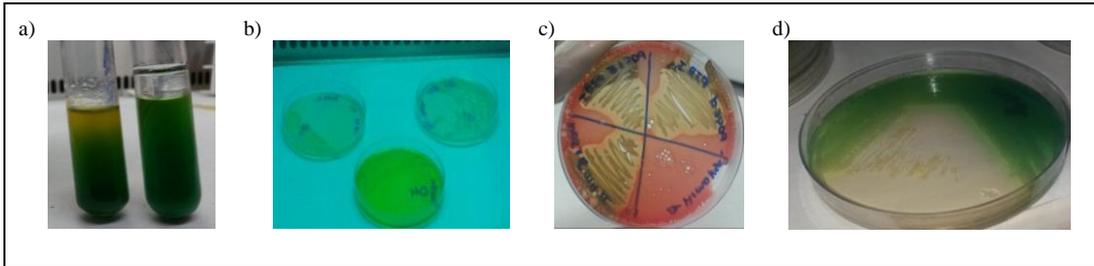


Figura 13 – Testes bioquímicos para identificação de *P. aeruginosa*.

Legenda: **a)** Teste O/F Glicose: tubo com reação amarela representando oxidação da glicose e tubo com reação inalterada (verde) contendo óleo mineral representando a ausência de fermentação; **b)** difusão de pigmento verde-amarelo fluorescente em meio de cultura (produção de pioverdina) quando exposto à UV; **c)** β -hemólise em ágar sangue; **d)** difusão de pigmento azul não fluorescente em meio de cultura.

5.6.1.2 Armazenamento das cepas bacterianas

As colônias com 24 horas de crescimento foram transferidas para caldo LB Miller, acrescidos de 15% de glicerol, que então foram estocadas a -80°C e para meio definitivo (protease, NaCl, extrato de carne e ágar bacteriológico) acrescido de óleo mineral, e foram estocadas a temperatura ambiente no Laboratório de Microbiologia do Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz de Manaus-AM. As colônias das culturas microbiológicas foram aliqüotadas e estocadas para possibilitar os experimentos subsequentes (Figura 14).



Figura 14 – Estoque de cepas de *P. aeruginosa* em meio definitivo

5.6.2 Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA) - Antibiograma

Avaliou-se o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (Antibiograma) das cepas de *P.aeruginosa* isoladas, executado através da técnica de disco-difusão. A técnica seguiu as

normas do Instituto Laboratorial de Normas Clínica (CLSI), que consistiu na utilização de discos impregnados de antimicrobianos sob colônias inoculadas em meio de cultura, para então ser analisada a suscetibilidade bacteriana (CLSI, 2015).

Os discos utilizados foram obtidos comercialmente (Laborclin) no quantitativo de 13, compostos pelos seguintes fármacos antimicrobianos: - Aminoglicosídeos (30µg/Amicacina, 10µg/Gentamicina e 30µg/Tobramicina); - Penicilinas antipseudomonas (10µg/Piperacilina associado ao Tazobactam); - Cefalosporinas de terceira geração (30µg/Ceftazidima); - Cefalosporinas de quarta geração (30µg/Cefepima); - Carbapenêmicos (10µg/Imipinim, 10µg/Meropenem); - Monobactâmicos (30µg/Aztreonam); - Fluoroquinolonas de segunda geração (10µg/Norfloxacino e 5µg/Ciprofloxacino); - Fluoroquinolonas de terceira geração (5µg/Levofloxacino) e grupo das Polimixinas (300un/Polimixina B).

Para realização desse teste, inicialmente foi feita uma suspensão bacteriana, transferindo-se colônias de *P. aeruginosa* para tubo contendo caldo LB, e então incubados a 37°C durante 18h a 24h para alcançar a concentração de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL, verificada através da turvação do tubo 0,5 da escala nefelométrica de McFarland. Posteriormente, uma alçada da suspensão foi transferida para placas de petri contendo meio Agar Mueller Hinton (AMH) e, com o auxílio de uma pinça estéril, foram adicionados discos impregnados com antibióticos, que então foram incubados por 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 16 a 18h. Decorrido esse período, foram analisados os diâmetros formados ao redor dos discos, e então interpretados utilizando tabela padrão para classificar o nível de suscetibilidade aos antibióticos testados, como sensibilidade (S), sensibilidade intermediária (I) ou resistência (R) (Figura 15). A designação “não suscetíveis” foi utilizada para englobar isolados com resistência e suscetibilidade intermediária.



Figura 15 – Placas de petri contendo inóculos bacterianos e halos de inibição dos discos de antibióticos.

A determinação da suscetibilidade possibilitou classificar os isolados como não multirresistentes (n-MDR), MDR ou PDR. Foram considerados isolados MDR, aqueles que não foram suscetíveis a pelo menos três das seguintes classes de antimicrobianos: aminoglicosídeos, penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas e fluoroquinolonas. A classificação PDR foi atribuída aos isolados que não foram suscetíveis a todas as classes de antimicrobianos listados para MDR, bem como aos monobactâmicos e polimixina B. Os fenótipos que não se encaixaram nas classificações MDR e PDR foram definidos como não-multirresistente (n-MDR).

5.6.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através do método de Otsuki (1997) com algumas modificações. Inicialmente, o procedimento para extração de DNA, consistiu na transferência de culturas contendo *P. aeruginosa* para tubos contendo caldo LB, que então foram incubadas a 37°C por 24h para crescimento bacteriano. Em seguida, uma alíquota foi transferida para um microtubo contendo água MilliQ autoclavada e ressuspensa em homogeneizador (tipo vórtex – Daigger Vortex Genie 2). A suspensão foi centrifugada em mini centrífuga (miniSpin-Eppendorf) a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C. Então o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em H₂O ultrapura. A suspensão foi fervida a 100°C por 10 minutos em banho seco, e depois submetida à temperatura de -4°C para realização do choque térmico. Novamente foi realizada centrifugação por mais 10 minutos, e então o sobrenadante foi transferido para um novo tubo para iniciar o processo de purificação do DNA com etanol a 70%. O *pellet* foi ressuspensado em Tris-EDTA (TE) e congelado a -20°C em freezer.

5.6.4 Amplificação de DNA

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em para amplificação do gene *16s rRNA* para identificação genotípica de cepas de *P. aeruginosa* e detecção de genes

relacionados à resistência antimicrobiana (integrons, cassetes gênicos e metalo- β -lactamase) (Tabela 2).

Tabela 2 - Pares de iniciadores (*forward* e *reverse*) de interesse para a detecção de genes 16S rRNA e codificadores de integrases, cassetes gênicos e de metalo- β -lactamases.

Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Gene alvo	pb	T _M (°C)	Ref.
PA-SS-F PA-SS-R	GGG GGA TCT TCG GAC CTCA TCC TTA GAG TGC CCA CCCG	<i>16s rRNA</i>	956	59	a
Int1-F Int1-R	GGT TCG TGC CTT CAT CCG TTT GCT TCG TGA TGC CTG CTT GTT	<i>int11</i>	698	62	b
Int2-F Int2-R	GCT ACC CTC TGT TAT CTC TCG CGT TAT ACG GGT GGT TGC AGA	<i>int12</i>	393	63	b
Int3-F Int3-R	GGA GGT TCA GAC GTT GCT TTC CCA GTG CAT GAG GCA GAT ACA	<i>Int13</i>	290	59,8	b
hep35 hep36	TGC GGG TYA ARG ATB TKG ATT T CAR CAC ATG CGT RTA RAT	<i>int11, 2 e 3</i>	491	55,0	c
5'CS-F 3'CS-R	GCT CAC GCA ACT GGT CCA GAA GCA ACA CCG ACA GGG ATG GAT	<i>cassetes gênicos</i>	Var	61,7	b
hep58 hep59	TCA TGG CTT GTT ATG ACT GT GTA GGG CTT ATT ATG CAC GC	<i>cassetes gênicos</i>	Var	55,0	d
IMP-P1 IMP-P2	CGA GAA GCT TGA AGA AGG TGT T CGG ACT TTG GCC AAG CTT CTA	<i>bla_{IMP-2,-3,- 13,-19,-20,-24}</i>	512	58,0	e
IMP-P3 IMP-P4	GAA GTT AAC GGG TGG GGC GTT CCT TTA ACC GCC TGC TCT AAT G	<i>bla_{IMP-1,-3,- 4,-6,-10}</i>	578	60	e
IMP-P5 IMP-P6	GAC AGT ACG GST GGA ATA GAG CCT TTA ACA GCC TGC TCC CA	<i>bla_{IMP-12,- 14,-18}</i>	407	58,0	e
IMP-P7 IMP-P8	GTA GCA TTA CTG CCG CAG GA GTA AGC TTC AAG AGC GAC GCA	<i>bla_{IMP-11,- 16,-21,-22}</i>	643	59,4	e
IMP-P9 IMP-P10	CCT AAA CAC GGC TTG GTG GTT GCC AAA CCA CTA CGT TAT CTG G	<i>bla_{IMP-5,-7,- 9,-15}</i>	349	58,4	e
VIM-P1 VIM-P2	GTT ATT GGT CTA TTT GAC CGC G CTA CTC AAC GAC TGA GCG ATT T	<i>bla_{VIM-2,-3,- 6,-8,-9,-10,- 11,-18}</i>	781	61,4	e
VIM-P3 VIM-P4	GGT CTA CAT GAC CGC GTC TGT CTA CTC GGC GAC TGA GCG ATT	<i>bla_{VIM-1,-4,- 5,-14}</i>	775	52,0	e
VIM-P5 VIM-P6	CGA TGG YGT TTG GTC GCA TAT GAA TGC GCA GCA CCA GGA TA	<i>bla_{VIM-7,- 12,-13}</i>	390	49,1	e
SPM-F SPM-R	GAG AGC CCT GCT TGG ATT CAT CAG TCT CAT TTC GCC AAC GG	<i>Blas_{SPM-1}</i>	811	57,3	e
GES-F GES-R	GCG CTT CAT TCA CGC ACT ATT A CTA TTT GTC CGT GCT CAG GAT G	<i>Blas_{GES-2}</i>	862	58,8	b
KPC-F KPC-R	GTA TCG CCG TCT AGT TCT GCT G GTT GAC GCC CAA TCC CTC GA	<i>Blas_{KPC-2}</i>	864	51,2	b
OXA23-F OXA23-R	AAG CAT GAT GAG CGC AAA G AAA AGG CCC ATT TAT CTC AAA	<i>Blas_{OXA-23- like}</i>	1066	49,1	f
OXA24-F OXA24-R	GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT	<i>Blas_{OXA-24- like}</i>	-	63,0	f
OXA48-F OXA48-R	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC	<i>Blas_{OXA-48- like}</i>	744	50,1	f
OXA50-F OXA50-R	AAT CCG GCG CTC ATC CAT C GGT CGG CGA CTG AGG CGG	<i>Blas_{OXA-50- like}</i>	869	58,0	f
OXA55-F OXA55-R	CAT CTA CCT TTA AAA TTC CC AGC TGT TCC TGC TTG AGC AC	<i>Blas_{OXA-55- like}</i>	-	59,4	f
OXA58-F OXA58-R	TTA TCA OXA TCC AAT CGG C TAA CCT CAA ACT TCT AAT TC	<i>Blas_{OXA-58- like}</i>	934	58,4	f
OXA60-F OXA60-R	AAA GGA GTT GTC TCA TGC TGT CTC G AAC CTA CAG GCG CGC GTC TCA CGG TG	<i>Blas_{OXA-60- like}</i>	-	61,4	f
OXA69-F OXA69-R	CTA ATA ATT GAT CTA CTC AAG CCA GTG GAT GGA TGG ATA GAT TAT C	<i>Blas_{OXA-69- like}</i>	975	52,0	f

Legenda: ^aSpilker et al. (2004); ^bClímaco (2011); ^cWhite et al. (2001); ^dWhite et al. 2000; ^eClímaco et al. (2013); ^fQueenan e Bush (2007); **F= forward**; **R= reverse**; **Var= variável**; **Y= C ou T**; **R= A ou G**; **B= T, C ou G**; **K= T ou G**; **pb:** tamanho dos genes em pares de bases; **T_M:** temperatura de anelamento dos iniciadores; **Ref.:** referência bibliográfica.

Os iniciadores utilizados foram selecionados baseados na literatura (Tabela 2), bem como analisados quanto a localização de pareamento dos iniciadores, presença de *self* e hetero *dimer*, entre outros, assim como a padronização de condições ideais para reação, sendo, portanto, considerados viáveis para pesquisa proposta.

As amplificações dos genes alvo foram realizadas com o conjunto de reagentes Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Thermo), em volumes de reação de 25 a 30 μ L, ajustada para as concentrações finais: 2 mM de MgCl₂, 1x de tampão para PCR, 2,5 μ M de DNTPs, 0,2 μ M de cada para de iniciadores (Tabela 2), 1U de taq polimerase, 10ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems by Thermo).

Para a detecção do gene *16S rRNA* a desnaturação inicial foi de 3 minutos a 95°C, 25 ciclos foram completados, cada um consistindo em 20 segundos a 94°C para desnaturação inicial, 45 segundos a 59°C para o pareamento dos iniciadores, 40 segundos a 72°C e a extensão final por 1 minuto a 72°C (SPILKER et al., 2010).

Para a amplificação dos genes codificadores de integrases, β -lactamases e a região do cassete gênico, a desnaturação inicial foi de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos foram realizados, cada um composto das etapas de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, 1 minuto para pareamento dos iniciadores, extensão a 72°C. A temperatura de pareamento variou de acordo com o par de iniciadores (Tabela 2). O tempo de extensão também variou conforme o par de iniciadores: 1 minuto para os iniciadores dos genes codificadores de integrases e β -lactamases; 7 minutos para os iniciadores 5'CS/3'CS e 4 min para os iniciadores HEP58/59, ambos para amplificação do cassete gênico.

Para visualização das amplificações, 5 μ L do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose, em que a concentração variou conforme o tamanho do produto de PCR, utilizando concentrações de 1,0%, 1,5% e 2,0%, para, respectivamente, amplificações de maiores que 800pb, 500 e 800bp e menores que 500bp. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, o que possibilitou visualizar e fotodocumentar as amplificações sob luz ultravioleta, utilizando o fotodocumetador Quantum Vilber (Fisher biotec, Austrália).

5.6.5 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento gênico foi realizado para determinar as sequências dos genes *16S rRNA*, dos genes codificadores de β -lactamases dos cassetes gênicos. Para isso, os amplicons foram purificados com o conjunto de reagentes PCR QIAquick® (Qiagen). O produto purificado foi submetido a reação de sequenciamento utilizando o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems by Thermo), segundo a reação: 0,5 μ L do Mix (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix), 2 μ L de tampão (BigDye® Terminator v3.1 5x Sequencing Buffer), 1 μ L de iniciador (5mM), 50ng de produto de PCR e H₂O MiliQ ultrapura q.s.p, totalizando 10 μ L o volume final da reação de sequenciamento.

A ciclagem foi realizada utilizando o seguinte programa: 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação de sequenciamento, o produto foi submetido a purificação, realizado por precipitação com Etanol/EDTA/Acetato de Sódio conforme descrito no protocolo do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As amostras foram enviadas secas em placas de 96 seladas e protegidas da luz para o Analizador Genético Automático de DNA, modelo 3500xL Genetic Analyzer for Resequencing & Fragment Analysis (Applied Biosystems by Thermo).

As sequências obtidas foram processadas para remoção de sequências de baixa qualidade utilizando-se *pipeline* PHRED/CAP3. As sequências foram comparadas com outras depositadas nos principais bancos de sequência nucleotídica usando-se a ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool - nucleotide*) disponível no site do NCBI (“*National Center for Biotechnology Information*”: <http://www.ncbi.gov/BLAST>).

5.6.6 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*), possibilitou analisar a similaridade genética entre os isolados bacterianos, para então detectar e definir grupos clonais entre os isolados, possibilitando verificar se há uma disseminação clonal da espécie assim como determinar as fontes de infecção hospitalar. Para realização da técnica, meios de cultura

contendo as cepas bacterianas de interesse foram enviadas para Plataforma Tecnológica de Análise de Fragmentos de Eletroforese da Fundação Oswaldo Cruz, sede do Rio de Janeiro, sob responsabilidade da Dra. Ana Carolina Paulo Vicente.

Os perfis migratórios dos fragmentos de DNA dos isolados foram analisados utilizando o software Vision-Capt (Vilber Lourmat), que possibilitou determinar a quantidade e tamanho dos fragmentos gerados. A similaridade genética dos isolados MDR/PDR foram determinadas pelo índice de similaridade de Dice e o dendograma foi construído de acordo com o método UPGMA (*Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando o programa NTSYSpc (*Numerical Taxonomy System*) versão 2.2 (Exeter Software, Estados Unidos da América). Isolados com índices superiores a 85% de similaridade foram determinados como pertencentes ao mesmo grupo clonal.

5.6.7 Análise de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)

A RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), foi utilizada para confirmar a classe dos integrons (classe 1, 2 e 3) e tipificar os cassetes gênicos. Para isso, os amplicons obtidos com os iniciadores HEP-35/36 utilizados para amplificar os genes codificadores de integrases *intI1*, *intI2* e *intI3*, e os amplicons obtidas com os iniciadores 5'CS-F e 3'CS-R, específicos para a região do integron de classe 1, onde estão contidos os cassetes gênicos, foram submetidos à reação de digestão enzimática utilizando a enzima de restrição *HinfI* (New England Biolabs).

A reação consistiu em 0,1µL de enzima de restrição *HinfI*, 5µL de amplicon de PCR, 2 µL de tampão 10x para enzima. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, 5µL do produto foi aplicado em gel de agarose, corado com 0.5 µg/mL de brometo de etídio e submetido a eletroforese a 100V por tempo suficiente até se obter uma separação ideal dos fragmentos de restrição, avaliado a cada 30 minutos sob excitação por luz UV.

De acordo com a quantidade de fragmentos de restrição e seus respectivos tamanhos obtidos, as classes (1, 2 ou 3) dos integrons foram determinadas conforme critérios pré-estabelecidos (WHITE et al, 2001) (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantidade e tamanho dos fragmentos obtidos após digestão enzimática dos amplicons gerados utilizando iniciadores degenerados HEP-35/36.

Genes	Quantidade de fragmentos	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>intI1</i>	1	491
<i>intI2</i>	2	191, 300
<i>intI3</i>	2	119, 372

O perfil de restrição gerado da digestão enzimática dos amplicons obtidos com os iniciadores 5'CS-F e 3'CS-R, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os perfis migratórios dos fragmentos de DNA dos isolados foram analisados utilizando o software Vision-Capt (Vilber Lourmat), que possibilitou determinar a quantidade e tamanho dos fragmentos gerados. Posteriormente, os dados numéricos foram inseridos no programa NTSYSpc versão 2.2 (Exeter Software, Estados Unidos da América), no qual o dendograma foi construído de acordo com o método UPGMA.

Os amplicons que geraram o mesmo perfil de restrição foram considerados idênticos e, portanto, regiões contendo os mesmos tipos de cassetes gênicos. Posteriormente, um ou dois amplicons, representantes de cada perfil de restrição, foram submetidos ao sequenciamento, para melhor análise e determinação do tipo de cassete gênico.

5.6.8 Análise Estatística

O suporte estatístico foi realizado pelo Msc. Antonio Alcirley da Silva Balieiro, do núcleo de Apoio à Projetos de Pesquisa, localizado na FIOCRUZ-Amazonia. As metodologias estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R versão 3.0.2. Os testes foram relevantes estatisticamente ao atingir nível significância de 5%. Para as variáveis categóricas foram utilizadas tabelas e gráficos contendo as frequências e as porcentagens. Para as variáveis numéricas foram elaborados gráficos e tabelas contendo as medidas de tendência central e de variabilidade (BOLFARINE; BUSSAB, 2005). A presença e ausência dos integrons foram correlacionados aos diversos fenótipos de resistência apresentados pelos isolados bacterianos (n-MDR, MDR, PDR) através do teste Exato de Fischer, para comparar

duas variantes com duas possibilidades cada. O *Odds Ratio (OR)*, que determina a chance de um evento acontecer, assim como o cálculo do intervalo de confiança (IC), que indica o quão confiável foi o valor calculado, também foram realizados. Foram considerados valores estatisticamente significantes aqueles em que os P valores apresentaram-se menores que 0,05 (PAGANO; GAUVREAU, 2004; AGRESTI; FINLAY, 2012).

6. RESULTADOS

6.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram realizadas coletas de amostras de 130 pacientes e 39 profissionais de saúde da UTI dos hospitais HPS28, HPSJL e HUFM durante o período de 3 meses, entre maio a agosto de 2015, conforme a amostragem (n amostral) proposta (Tabela 4).

Tabela 4 – n amostral de pacientes e profissionais de Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) de três hospitais de Manaus/AM.

Instituição	Pacientes Internados em UTI	Profissionais Intensivistas
Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto	65	30
Hospital Universitário Francisca Mendes	25	4
Hospital e PS Dr. João Lúcio Pereira Machado	40	5
Total Parcial	130	39
TOTAL 169 (n)		

Fonte: Adaptada de Ministério da Saúde – Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS).

Com a finalidade de abranger diferentes fontes de infecções, cada grupo estudado foi submetido a coleta de espécimes clínicos distintos, destes 398 (58,8%), foram obtidas de pacientes internados em UTI, 78 (11,5%) de profissionais de saúde e 201 (29,7%) de estrutura hospitalar, totalizando 677 amostras (Tabela 5).

Tabela 5 – Quantidade de amostras coletadas de acordo com os grupos e hospitais estudados.

Grupos	Hospitais			Total
	HPS28	HPSJLM	HUFM	
Pacientes	201	133	64	398
Profissionais Intensivistas	60	10	8	78
Estrutura hospitalar	88	61	52	201
Total	349	204	124	677 amostras coletadas

Legenda: HPS28: Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto; HPSJL: Hospital e PS Dr. João Lúcio Pereira Machado; HUFM: Hospital Universitário Francisca Mendes.

Dos 398 espécimes clínicos coletados de pacientes, 116 (29,1%) corresponderam a amostras de sangue, 55 (13,8%) de urina de cateter vesical, 88 (22,1%) de cânulas de secreção respiratória, 127 (31,9%) de *swab* de axila, 1 (0,3%) de abscesso, 10 (2,5%) de secreção de traqueostomia e 1 (0,3%) de secreção de ferida (Tabela 6).

Tabela 6 – Amostras coletadas de pacientes de UTI de acordo com os hospitais estudados.

Amostras	HOSPITAIS			TOTAL
	HPS28	HPSJL	HUFM	
Sangue	57	34	25	116
Urina	25	20	10	55
Cânula	52	34	2	88
Amostras de axila	62	40	25	127
Abscesso	1	0	0	1
Traqueostomia	3	5	2	10
Secreção de ferida	1	0	0	1
TOTAL	201	133	64	398

Legenda: HPS28: Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto; HPSJL: Hospital e PS Dr. João Lúcio Pereira Machado; HUFM: Hospital Universitário Francisca Mendes.

Dentre as amostras coletadas de profissionais de saúde, 39 foram obtidas de *swab* do vestíbulo nasal e 39 de *swab* de unhas (Tabela 7). Completando a amostragem, 201 (29,7%) amostras distintas foram obtidas das estruturas das UTIs (Tabela 8).

Tabela 7 – Amostras coletadas de profissionais de UTI de acordo com os hospitais estudados.

Amostras	HOSPITAIS			TOTAL
	HPS28	HPSJL	HUFM	
<i>Swab</i> de vestíbulo nasal	30	5	4	39
<i>Swab</i> de Unha	30	5	4	39
Total	60	10	8	78

Legenda: HPS28: Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto; HPSJL: Hospital e PS Dr. João Lúcio Pereira Machado; HUFM: Hospital Universitário Francisca Mendes.

Tabela 8 – Amostras coletadas de estruturas das UTIs de acordo com os hospitais estudados.

Amostras	HOSPITAIS			TOTAL
	HPS28	HPSJL	HUFM	
Amostras de leito	65	40	25	130
Torneira	1	5	4	10
Porta	4	5	7	16
Colchão	2	0	1	3
Prontuário	0	1	0	1
Teclado do computador	1	2	1	4
Chão/piso	2	4	6	12
Foco cirúrgico	4	0	0	4
Placa aberta	2	2	3	7
Maca	4	0	0	4
Maquina/equipamentos	3	0	0	3
Pia	0	2	2	4
Outros	0	0	3	3
TOTAL	88	61	52	201

Legenda: HPS28: Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto; HPSJL: Hospital e PS Dr. João Lúcio Pereira Machado; HUFM: Hospital Universitário Francisca Mendes.

6.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Por meio de técnicas microbiológicas clássicas foram isoladas e identificadas fenotipicamente 83 cepas de *P. aeruginosa*. Dessas, 31 (37,4%) foram obtidos do HPS28, 24 (28,9%) isoladas no HPSJL e 28 (33,7%) do HUFM (Gráfico 1).

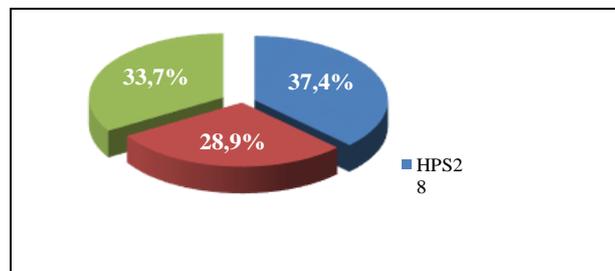


Gráfico 1 - Percentual de cepas de *P. aeruginosa* isoladas por hospital.

Legenda: HPS28: Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto; HPSJL: Hospital e PS Dr. João Lúcio Pereira Machado; HUFM: Hospital Universitário Francisca Mendes.

As cepas de *P. aeruginosa* isoladas a partir de amostras de pacientes totalizaram 57 (68,7%), das quais 5 (8,8%) foram isoladas de amostras de sangue, 4 (7,0%) de urina de cateter vesical, 30 (52,6%) de cânulas de aspiração de secreção, 11 (19,3%) de *swab* de axila e 7 (12,3%) de secreção de traqueostomia (Gráfico 2).

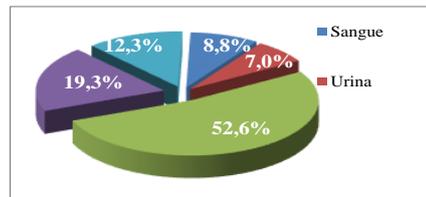


Gráfico 2 - Percentual de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de acordo com as amostras clínicas colhidas de pacientes.

Duas (2,4%) amostras de profissionais intensivistas foram fontes de isolamento, sendo uma cepa obtida de vestíbulo nasal e outra de amostra das unhas. A partir da estrutura hospitalar foram isoladas 24 (28,9%) *P. aeruginosa*, obtidas de diferentes fontes (Gráfico 3).

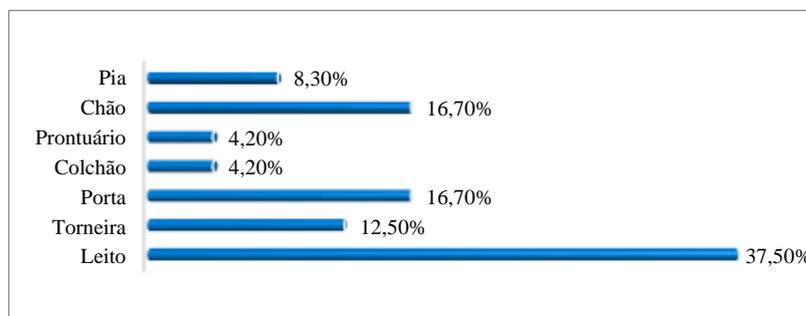


Gráfico 3 – Percentual de cepas de *P. aeruginosa* isoladas a partir da estrutura hospitalar da UTI, de acordo com a fonte de isolamento.

Em relação ao panorama de isolamento de *P. aeruginosa* nos três hospitais estudados, observa-se que os isolados do HPS28 foram obtidos principalmente de pacientes, os quais encontravam-se predominantemente em amostras de secreção respiratória colhidas de cânulas (48,4%), seguida de amostras de axila (19,4%). As cepas isoladas do HPSJL também foram mais comuns em amostras de cânulas de secreção (54,2%), seguida de amostra de leito de UTI (12,5%). Já no HUFM, a fonte mais comum de isolamento foi sangue (17,9%), seguido de secreções de traqueostomia (14,3%) (Gráfico 4).

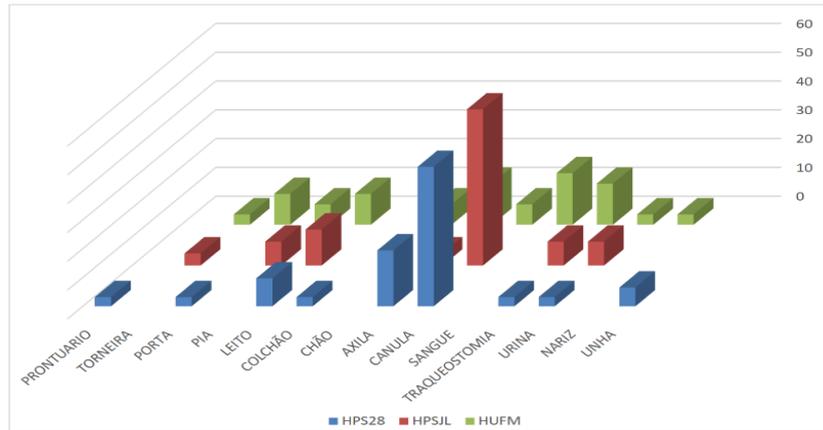


Gráfico 4 – Panorama de isolamento de *P. aeruginosa* de acordo com os hospitais estudados e tipos de amostras coletadas.

Legenda: HPS28: Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto; HPSJL: Hospital e PS Dr. João Lúcio Pereira Machado; HUFM: Hospital Universitário Francisca Mendes.

6.3 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

As 83 cepas identificadas fenotipicamente como *P. aeruginosa* apresentaram ampliações de 956pb previstas para os iniciadores PA-SS *forward e reverse*, referente ao gene *16sRNA* (Figura 19).

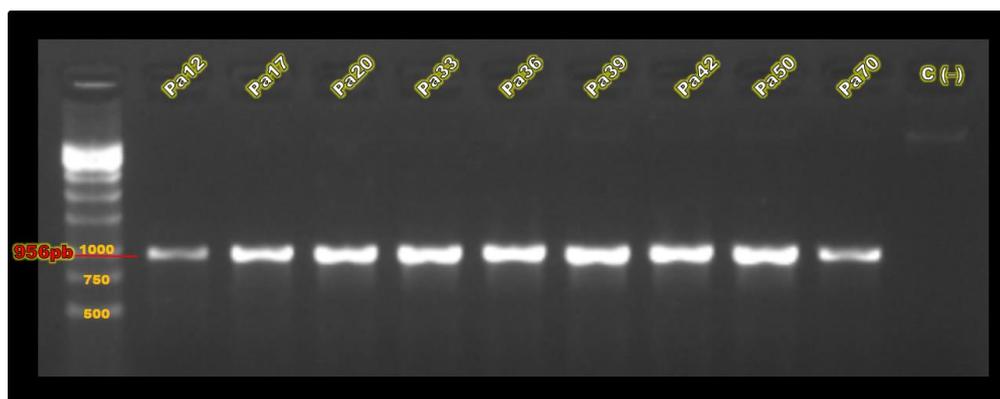


Figura 16 – Amplicons de 956pb correspondentes ao gene 16s rRNA.

Legenda: Gel de agarose a 1% demonstrando ampliações geradas com os iniciadores PA-SS (*forward e reverse*) referente ao gene 16s rRNA. Isolados Pa12, Pa17, Pa20, Pa33, Pa36, Pa42, Pa50 e Pa70 representando as ampliações para esse gene; C(-): Controle negativo; Marcador de 1kb da invitrogen.

Os produtos obtidos foram sequenciados e então comparados com as sequências disponíveis no banco de dados da NCBI, “GenBank”. Os isolados apresentaram 99% de similaridade com as sequências previamente depositadas.

6.4 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Das 83 cepas de *P. aeruginosa* submetidas ao TSA, 11 (13,3%) apresentaram perfil de MDR e um (1,2%) isolado de PDR. Os demais isolados (71/83=85,5%) foram classificados como n-MDR (Gráfico 5).

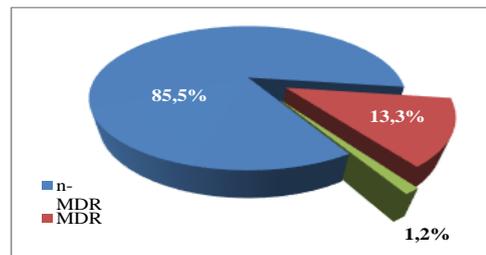


Gráfico 5 - Percentual de fenótipos de suscetibilidade antimicrobiana em cepas de *P. aeruginosa*.

Legenda: n-MDR: não multirresistente; MDR: multirresistente e PDR: panresistente.

Os antimicrobianos aos quais os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram menor sensibilidade foram aztreonam (75,9%), imipeném (77,1%), cefepime (80,7%) e meropeném (86,7%). Em contrapartida, os antimicrobianos que se apresentaram mais efetivo *in vitro* contra os isolados foram, respectivamente, amicacina (98,8%), polimixina B (96,4%), gentamicina (95,2%), levofloxacina (92,8%), ciprofloxacina e piperacilina associado ao tazobactam (91,6%), norfloxacina, ceftazidima e tobramicina (90,4%) (Gráfico 6).

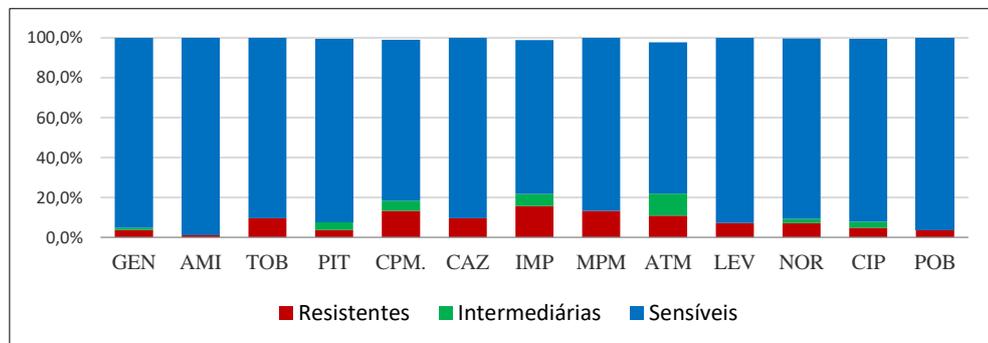


Gráfico 6 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados de *P. aeruginosa*.

Legenda: Aminoglicosídeos (GEN: Gentamicina; AMI: Amicacina; TOB: Tobramicina); Penicilinas (PIT: Piperacilina/tazobactam); Cefalosporinas (CPM: Cefepime; CAZ: Ceftazidima); Carbapenêmicos (IMP: Imipeném; MPM: Meropeném); Monobactâmicos (ATM: Aztreonam); Fluoroquinolonas (NOR: Norfloxacina; LEV: Levofloxacina; CIP: Ciprofloxacina); Polimixinas (POB: Polimixina B).

O panorama de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de acordo com os hospitais estudados, demonstra que cepas de *P. aeruginosa* menos sensíveis foram isoladas a partir do HPS28, as quais foram predominantemente resistentes ao aztreonam e cefepime. Os hospitais HPSJL e HUFM, apresentaram maiores taxas de suscetibilidade quando comparadas aos isolados HPS28. Apesar disso, a ocorrência de resistência nos isolados do HPSJL foi atribuída principalmente ao aztreonam e cefepime, e para HUFM a resistência mais comum foi contra o imipeném (Gráfico 7).

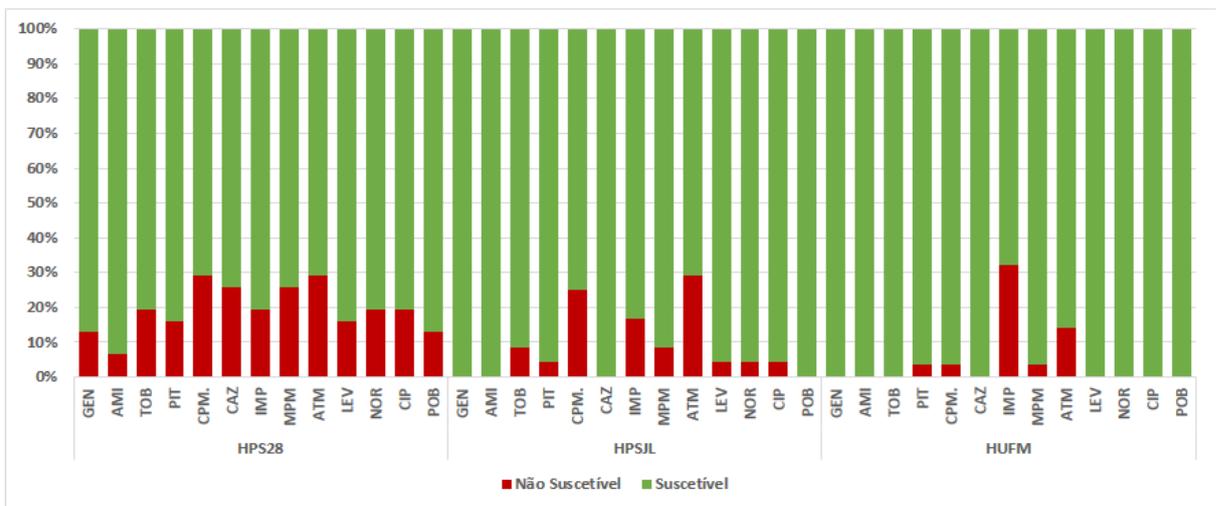


Gráfico 7 – Panorama de suscetibilidade antimicrobiana de *P. aeruginosa* de acordo com os hospitais estudados.

Legenda: Aminoglicosídeos (GEN: Gentamicina; AMI: Amicacina; TOB: Tobramicina); Penicilinas (PIT: Piperacilina/tazobactam); Cefalosporinas (CPM: Cefepime; CAZ: Ceftazidima); Carbapenêmicos (IMP: Imipeném; MPM: Meropeném); Monobactâmicos (ATM: Aztreonam); Fluoroquinolonas (NOR: Norfloxacina; LEV: Levofloxacina; CIP: Ciprofloxacina); Polimixinas (POB: Polimixina B); HPS28: Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto; HPSJL: Hospital e Pronto Socorro João Lúcio; HUFM: Hospital Universitário Francisca Mendes.

O padrão de resistência dos isolados com fenótipos MDR e PDR foram atribuídos principalmente a classe dos β -lactâmicos, destacando-se os antimicrobianos cefepime e meropenem (Tabela 9).

Tabela 9 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados MDR e PDR

CEPAS	AMINOGLICOSÍDEOS			β-LACTÂMICOS						FLUOROQUINOLONAS			POL.
				PEN.	CEFALOSPORIN.		CARBAPENÊM.		MONO.				
	GEN	AMI	TOB	PIT	CPM	CAZ	IMP	MPM	ATM	LEV	NOR	CIP	POB
Pa12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa20	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa33	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa36	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa39	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa42	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa50	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa70	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa101	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa107	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pa110	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Legenda: Isolados MDR: Pa12, Pa17, Pa20, Pa33, Pa39, Pa42, Pa50, Pa70, Pa101, Pa107, Pa110; Isolado PDR: Pa36; **GEN:** Gentamicina; **AMI:** Amicacina; **TOB:** Tobramicina; **ATM:** Aztreonam; **IMP:** Imipeném; **CPM:** Cefepime; **MPM:** Meropenem; **CAZ:** Ceftazidima; **NOR:** Norfloxacin; **LEV:** Levofloxacin; **CIP:** Ciprofloxacina; **PIT:** Piperacilina/tazobactam; **POB:** Polimixina B; ■: Sensível ao antimicrobiano testado; ■: Sensibilidade intermediária ao antimicrobiano; ■: Resistente ao antimicrobiano testado.

6.5 DETECÇÃO DE GRUPOS CLONAIIS

De 12 *P. aeruginosa* com fenótipos MDR/PDR, 11 foram analisadas quanto a similaridade genética pela técnica PFGE. A partir dos perfis de PFGE gerados da migração dos fragmentos de DNA digeridos, foi construído um dendograma, que possibilitou encontrar dois grupos clonais, nomeados A e B, contendo, respectivamente, quatro (Pa17, Pa33, Pa36 e Pa39) e três (Pa20, Pa50 e Pa70) isolados (Figura 17).

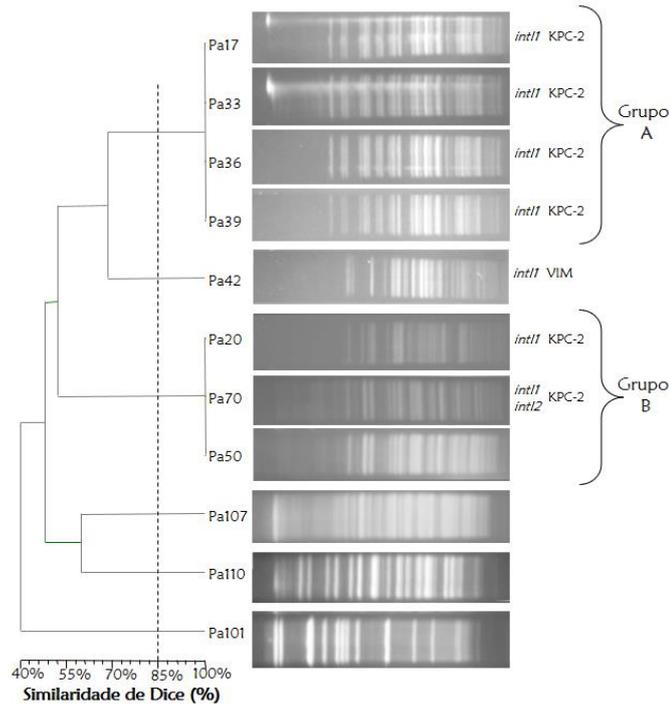


Figura 17 - Dendrograma de similaridade genética dos perfis de PFGE apresentado pelos isolados de *P. aeruginosa* MDR/PDR.

Legenda: Grupo clonal A, constituído dos isolados Pa17, Pa33, Pa36 e Pa39; Grupo clonal B: Pa20, Pa50 e Pa70. Os isolados Pa42, Pa101, Pa107 e Pa110 não apresentam relação. A linha pontilhada demonstra o ponto de corte (85%) para a definição de grupos clonais

Os isolados Pa42, Pa101, Pa107 e Pa110 foram distintos entre si. Um isolado (Pa12) teve o DNA degradado, o que inviabilizou a análise e classificação quanto aos grupos clonais.

Os isolados classificados no grupo clonal A apresentaram o mesmo perfil genético para integrons e β -lactamases. Já os isolados pertencentes ao grupo B apresentaram-se distintos (Tabela 10).

Tabela 10 – Perfil genético para integrons e genes codificadores de β -lactamases e fonte de isolamento dos grupos clonais.

Grupo Clonal	Cepas	Integrons		β -lactamases			Fonte de isolamento	Nº da coleta	Hospital
		<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{OXA}</i>			
A	Pa17	■	■	■	■	■	Colchão (EH03c)	1º	HPS28
	Pa33	■	■	■	■	■	Cânula paciente		
	Pa36	■	■	■	■	■	Cânula paciente		
	Pa39	■	■	■	■	■	Urina paciente (Pa70b)	4º	HPSJL

Legenda: A= Grupo Clonal A; B= Grupo Clonal B; ■ = positivo para o gene; □ = negativo para o gene.

Tabela 10 – Perfil genético para integrons e genes codificadores de β -lactamases e fonte de isolamento dos grupos clonais (*continuação*).

Grupo Clonal	Cepas	Integrons		β -lactamases			Fonte de isolamento	Nº da coleta	Hospital
		<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	<i>blaKPC</i>	<i>blaVIM</i>	<i>blaOXA</i>			
B	Pa20	■	■	■	■	■	Cânula paciente	2º	HPS28
	Pa50	■	■	■	■	■	Cânula paciente	4º	HPSJL
	Pa70	■	■	■	■	■	Axila paciente	6º	HUFM

Legenda: A= Grupo Clonal A; B= Grupo Clonal B; ■ = positivo para o gene; ■ = negativo para o gene.

As cepas classificadas em grupos clonais foram isoladas de diferentes fontes e hospitais. Os isolados do Grupo A foram obtidos dos hospitais HPS28 e HPSJL. Um isolado pertencente a esse grupo (Pa17) foi obtido de estrutura hospitalar (colchão situado em área destinada aos profissionais de saúde), e dois (Pa33 e Pa36) a partir de amostras de cânulas de aspiração de secreção respiratória de dois pacientes diferentes. O isolado Pa39, também pertencente ao grupo A, isolado do HPSJL, foi obtido de amostra de urina de paciente (Tabela 10).

Os isolados pertencentes ao grupo B foram obtidos em diferentes dias de coleta, de diferentes hospitais. Duas cepas, Pa20 e Pa50, foram isolados de cânulas de pacientes dos hospitais HPS28 e HPSJL, respectivamente. Já a cepa Pa70, por sua vez, foi isolada a partir de *swab* de axila de um paciente do HUFM.

6.6 DETECÇÃO DE INTEGRONS DE CLASSE 1, 2 E 3

Dos 83 isolados de *P. aeruginosa*, 32 (38,6%) apresentaram ampliações correspondentes ao gene *intI1* (698pb), portanto, integrons de classe 1. Dos 12 isolados com fenótipo de múltipla resistência aos fármacos, nove (75%) apresentaram ampliações correspondentes ao gene *intI1* (698pb). Entretanto, 23 (32,4%) isolados classificados fenotipicamente com n-MDR também apresentaram ampliações correspondentes (Figura 18). Três (9,4%) isolados *intI1* positivos também foram positivos para *intI2* (395pb), portanto, integrons de classe 2 (Figura 19).

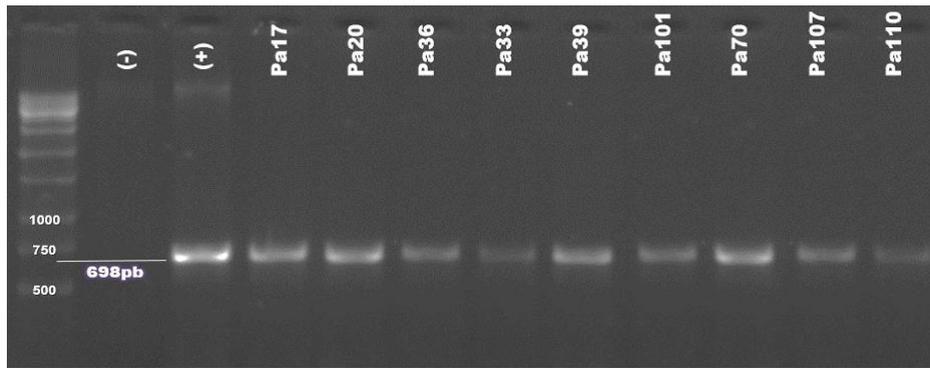


Figura 18 – Amplicons de 698pb correspondentes ao gene *intI1*.

Legenda: Gel de agarose a 1% demonstrando amplicons de 698pb obtidos com os iniciadores IntI1 (*forward* e *reverse*), para amplificação do gene *intI1*. Isolados Pa17, Pa20, Pa36, Pa33, Pa39, Pa101, Pa70, Pa107 e Pa110 representando as amplificações para *intI1*; Marcador de 1kb (invitrogen); (-): Controle Negativo e (+): positivo para o gene *intI1*.

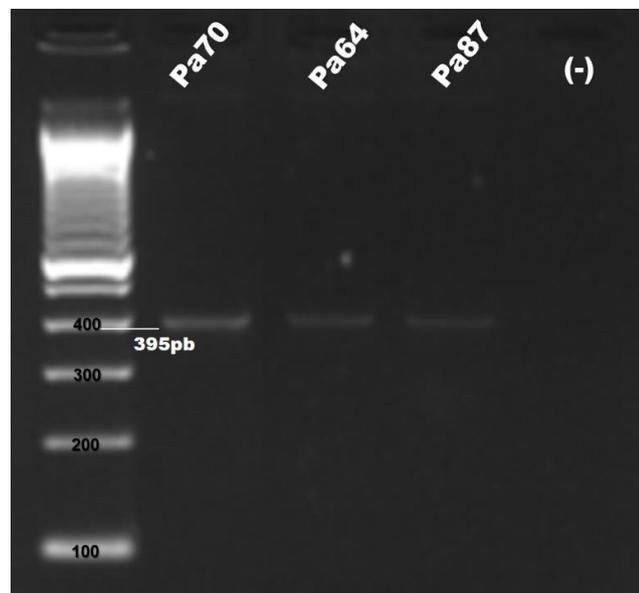


Figura 19 - Amplicons de 395pb correspondentes ao *intI2*.

Legenda: Gel de agarose a 2%, demonstrando amplicons obtidos com o par de iniciadores INTI2 (*forward* e *reverse*), para amplificação do gene *intI2*. Pa70, Pa64 e Pa87: isolados positivos para *intI2*; Marcador de 100pb (invitrogen); (-): Controle Negativo.

Os iniciadores degenerados (HEP-35/36), que hibridizam com regiões comuns entre integrons de classe 1, 2 e 3, foram utilizados confirmar a presença desses elementos. Dos 32 isolados positivos para integrons, 19 (59,4%) apresentaram amplificações utilizando os iniciadores HEP35/36 (491pb) (Figura 20).

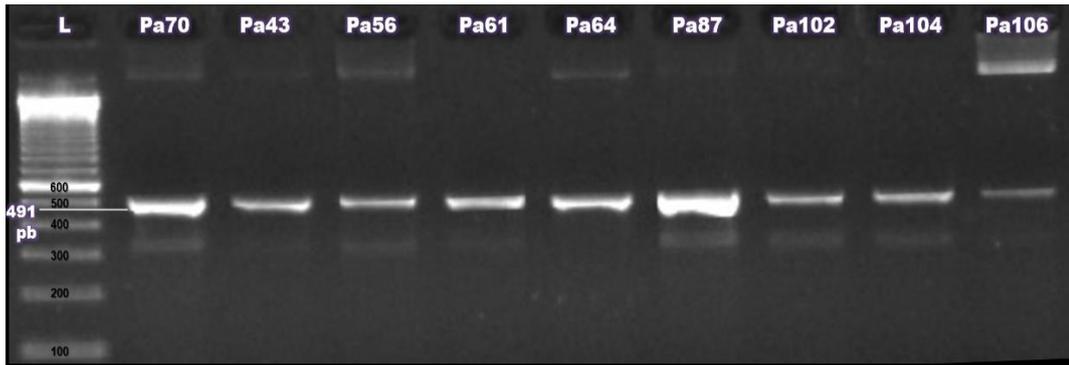


Figura 20 – Amplicons de 491 pb correspondentes aos genes *intI1*, 2 e/ou 3.

Legenda: Gel de agarose a 1% demonstrando amplicons gerados com os iniciadores degenerados HEP-35/36. **L:** Marcador de 100pb da invitrogen.; Isolados Pa70, Pa43, Pa56, Pa61, Pa64, Pa87, Pa102, Pa104 e Pa106 representando as ampliações para esses genes.

Posteriormente, os amplicons gerados utilizando os iniciadores HEP-35/36, foram submetidos a técnica de RFLP, demonstrando que os isolados que continham apenas o integron de classe 1 não apresentaram digestão por enzima de restrição *HinfI*. Já os isolados que albergavam tanto os integron de classe 1 como os de classe 2, foram digeridos e apresentaram os fragmentos correspondentes (Tabela 3), ou seja, três fragmentos, sendo um fragmento de 491 pb, portanto representando o integron de classe 1, e dois de 300 e 191pb, correspondendo a digestão do integron 2 (Figura 21).

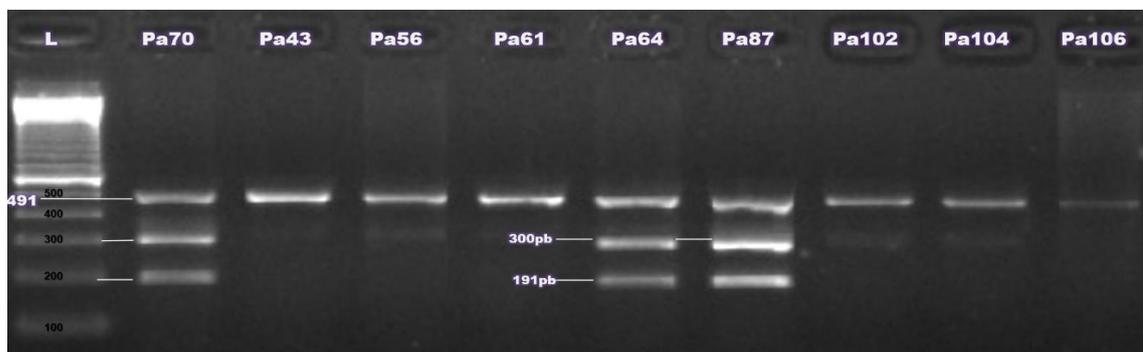


Figura 21 – Perfil de restrição (RFLP) dos amplicons correspondentes aos genes *intI1* e 2.

Legenda: Gel de agarose a 2,0% demonstrando o perfil de restrição dos amplicons obtidos com os iniciadores HEP-35/36, digeridos por enzima *HinfI*. Amplicons referente ao gene *intI1* não apresentaram sítio de restrição para enzima *HinfI*, portanto não foram digeridos. Já os amplicons de *intI2* contêm sítios de restrição, gerando dois fragmentos de 300 e 191pb.

A presença dos integrons de classe 1, 2 e 3 foram associadas ao fenótipo MDR e PDR. De acordo com o *Odds ratio* (razão de chances) calculado para a comparação entre cepas MDR/PDR e n-MDR em relação a presença de integrons, a possibilidade de encontrar o fenótipo MDR em *P. aeruginosa* é cerca de 6,3 vezes maior para os isolados que contêm integron de classe 1 do que para os que não contêm. Já em relação ao integron de classe 2,

como os isolados apresentaram baixa frequência desse elemento, a correção estatística não foi significativa (Tabela 11).

Tabela 11 – Correlação entre a presença ou ausência de integrons com os fenótipos n-MDR, MDR e PDR.

Classe dos integrons	Resultado	MDR/PDR	n-MDR	P	OR	IC
1	+	9	23	0.0101	6,3	1.5470 a
	-	3	48			25.3387
2	+	1	2	-----	-----	0.2618 a
	-	11	69			37.5800

Legenda: Em **negrito**, valor estatístico significativo ($P < 0,05$); IC= Intervalo de Confiança de 95%; P= nível de confiança; OR= *Odds ratio* (teste Exato de Fischer, calculado a partir de “MedCalc easy-to-use statistical software”. Disponível em: https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)

De acordo com o nível de confiança ($P < 0,05$), a relação entre a presença de integron de classe 1 e o fenótipo MDR/PDR é estatisticamente significativa. Foi analisada, também, a relação da presença de integrons de classe 1 com o perfil de suscetibilidade antimicrobiana em isolados de *P. aeruginosa* (Tabela 12).

Tabela 12 - Correlação entre a presença/ausência de integrons de classe 1 com o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *P. aeruginosa*.

Agente Antimicrobiano	Total dos isolados (n=83)		Isolados com <i>intI1</i> (n=32)		Isolados sem <i>intI1</i> (n=51)		P valor
	S	NS	S	NS	S	NS	
GEN	79	4	29	3	50	1	0.163
AMI	82	1	30	2	51	0	0.173
TOB	75	8	26	6	49	2	0.042
PIT	76	7	26	6	50	1	0.027
CPM	67	16	23	9	44	7	0.111
CAZ	75	8	26	6	49	2	0.042
IMP	64	19	23	9	41	10	0.042
MPM	72	11	23	9	49	2	0.005
ATM	63	20	23	9	40	11	0.497
LEV	77	6	26	6	51	0	0.029
NOR	75	8	25	7	51	0	0.021
CIP	76	7	26	6	50	1	0.027
POB	80	3	28	4	51	0	0.064

Legenda: Em **negrito**, os resultados com valor de P (nível de confiança) significativos ($P < 0,05$); Teste Exato de Fischer, calculado a partir de “MedCalc easy-to-use statistical software”. Disponível em: https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php; **S:** Suscetível; **NS:** Não suscetível; **Aminoglicosídeos** (GEN: Gentamicina; AMI: Amicacina; **TOB:** Tobramicina); **Penicilinas** (PIT: Piperacilina/tazobactam); **Cefalosporinas** (CPM: Cefepime; **CAZ** : Ceftazidima); **Carbapenêmicos** (**IMP:** Imipeném; **MPM:** Meropeném); **Monobactâmicos** (ATM: Aztreonam); **Fluoroquinolonas** (**NOR:** Norfloxacin; **LEV:** Levofloxacin; **CIP:** Ciprofloxacina); **Polimixina** (**POB:** Polimixina B).

Analisando o cálculo do nível de confiança (valor de $P < 0,05$) na tabela 12, constata-se que existe significância estatística entre a presença de integron de classe 1 nos isolados de *P. aeruginosa* e a não suscetibilidade (resistente ou suscetibilidade intermediária) aos antimicrobianos tobramicina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, imipeném, meropeném, levofloxacino, norfloxacino e ciprofloxacino. Portanto, praticamente todas as classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e as fluoroquinolonas) apresentaram correlação estatística entre a presença de integrons e a não suscetibilidade antimicrobiana, excetuando-se apenas os monobactâmicos e as polimixinas.

Por ter poucos isolados contendo integrons de classe 2 e nenhum contendo integron de classe 3, a relação da presença desse elemento com a resistência antimicrobiana não foram avaliadas estatisticamente.

6.7 ANÁLISE DOS CASSETES GÊNICOS

Os isolados positivos para o gene *intI1*, portanto integrons de classe 1, foram submetidos à pesquisa de cassetes gênicos, utilizando os iniciadores HEP-58/59 e 5'CS-F/3'CS-R (Tabela 2). Dos 32 isolados positivos para o gene *intI1*, 27 (84,4%) apresentaram de um a dois amplicons, que variaram entre 500pb a 2,0kb (Figura 22).

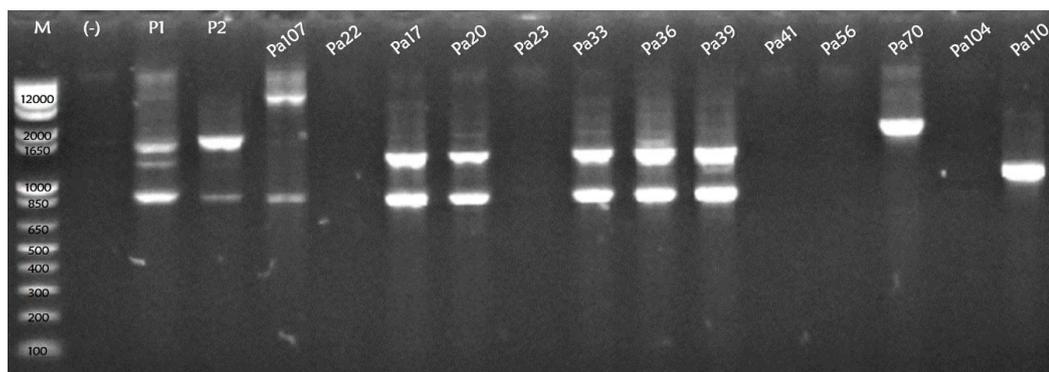


Figura 22 - Amplicons correspondentes a região cassette de integrons de classe 1.

Legenda: Gel de agarose a 1% demonstrando amplicons gerados com o par de iniciadores HEP-58/59 (*forward* e *reverse*) utilizados para amplificação da região cassette de integron de classe 1. Marcador de 1kb plus da invitrogen; (-): Controle Negativo (Pa01); P1 e P2: Controle positivo; B: branco. Isoados Pa107, Pa17, Pa20, Pa33, Pa36, Pa70 e Pa110 representando alguns padrões de amplificação para esse(s) gene(s).

Os amplicons gerados utilizando os iniciadores 5'CS-F e 3'CS-R, foram submetidos à técnica de RFLP utilizando enzima de restrição *HinfI*. De acordo com o perfil de restrição dos fragmentos, foram estimadas a variabilidade dos integrons de classe 1, classificando-os em diferentes grupos. Foram classificados no grupo I, os isolados que geraram amplicons de 500pb sem sítios de restrição para as enzimas *HinfI*, ou seja, que não foram digeridos (dados não mostrados). Os demais isolados ($n=19$) apresentam sítio de restrição, gerando oito padrões de perfis de restrições distintos, classificados de II a IX (Figura 23).

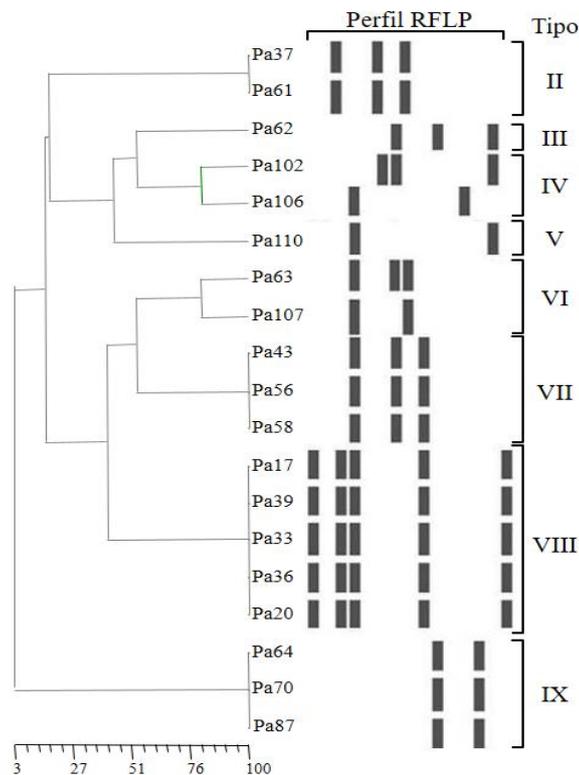


Figura 23 – Dendrograma demonstrando 8 perfis das regiões cassetes dos integrons de classe 1.

Legenda: A digestão enzimática (*HinfI*) dos amplicons obtidos com os iniciadores 5'CS-F e 3'CS-R, geraram 9 perfis distintos de RFLP (I a XI), demonstrando a variabilidade dos cassetes gênicos presentes em integrons de classe 1

Foram selecionados de um a dois amplicons representantes de cada perfil de RFLP, para serem melhor estudados por sequenciamento gênico, com o objetivo de identificar o cassete gênico. Os resultados dos sequenciamentos de DNA em associação com o perfil de restrição, revelaram que a maioria dos integrons de classe 1 estavam vazios ou continham genes que codificavam resistência aos aminoglicosídeos ou ao trimetropim (Tabela 13).

Tabela 13 – Cassetes Gênicos: grupo de RFLP, tipo de cassete gênico e fenótipo de resistência dos isolados *intI1* positivos.

Grupo RFLP	Tamanho do amplicon (Kbp)	Cassetes Gênicos	Isolados bacterianos	Fenótipo de Resistência
II	1,8	<i>dhfrA1</i>	Pa37 Pa61	n-MDR n-MDR
III	1,2	<i>aadA2/qacEdelta1</i>	Pa62	n-MDR
IV	1,2	<i>aadA6/orfD</i>	Pa102 Pa106	n-MDR n-MDR
V	1,2	<i>aadA2/qacEdelta1</i>	Pa110	MDR
VI	1,8	<i>dfrA15/qacEdelta1</i> <i>dfrA15/dhfrA1</i>	Pa63 Pa107	n-MDR MDR
VII	1,2	<i>aadA6</i>	Pa43 Pa56 Pa58	n-MDR n-MDR n-MDR
VIII	1,2 e 1,6	<i>aadA6/dfrA12</i>	Pa17	MDR
			Pa20	MDR
			Pa33	MDR
			Pa36	PDR
			Pa39	MDR
IX	2,0	<i>dfrA12/aadA2</i> <i>dfrA12/aadA2</i> <i>dfrA12/aadA28</i>	Pa64 Pa70 Pa87	n-MDR MDR n-MDR

Legenda: Grupo RFLP (II a IX): Tipos de perfis de RFLP, demonstrando a variabilidade dos cassetes gênicos presentes em integrons de classe 1; Tamanho do amplicon (Kbp) digerido por enzima de restrição (*HinfI*); **n-MDR:** não multirresistente; **MDR:** multirresistente; **PDR:** panresistente.

O alinhamento local contra bancos de dados de nucleotídeos das sequências dos amplicons de 500 bp não digeridos (classificados no grupo I) não revelou semelhança com qualquer gene ou parte de genes, um resultado aceitável porque não necessariamente o cassete gênico vai estar complexado com o íntegron. Dos isolados que cotinham cassetes gênicos, 43,8% (14/32) carregavam genes que codificavam enzima aminoglicosídeo adeniltransferase (*aad*), que confere resistência aos aminoglicosídeos (estreptomicina e espectinomicina). Seguido de 40,6% (13/32), que codificam para diidrofolato redutase (*dfr*), que por sua vez, confere resistência ao trimetropim.

6.8 DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE β -LACTAMASES

As cepas com fenótipos MDR e PDR foram submetidas à pesquisa de genes codificadores das serinas carbapenemases KPC, GES e OXA e das metalo- β -lactamases, VIM, IMP e SPM utilizando iniciadores específicos (Tabela 2). Das 12 cepas MDR/PDR, 8 (66,7%) apresentaram amplicons correspondentes ao gene *bla_{KPC-2}* (Figura 24).

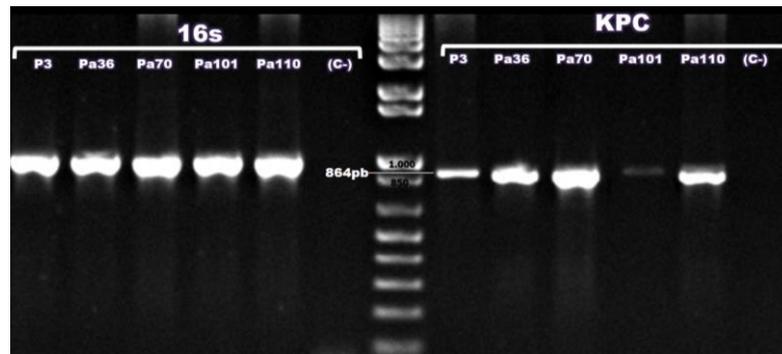


Figura 24 – Amplicons correspondentes aos genes 16s rRNA (956pb) e *bla_{KPC-2}* (864pb).

Legenda: Gel de agarose a 1% demonstrando amplicons gerados com os iniciadores PA-SS(F/R) para o gene 16s, utilizado como controle de amplificação para as amostras; e amplicons gerados com os iniciadores KPC-2 para o gene *bla_{KPC-2}*; Marcador de 1kb plus da invitrogen; = P3: controle positivo para os genes 16s e *bla_{KPC-2}*. Isolados Pa36, Pa70, Pa101 e Pa110, representando o padrão de amplificação para o gene *bla_{KPC-2}*.

Um (8,3%) isolado apresentou amplificação de 781pb utilizando os iniciadores VIM-P1/P2, correspondente aos genes *bla_{VIM-2,-3,-6,-8,-9,-10,-11,-18}* (Figura 25).

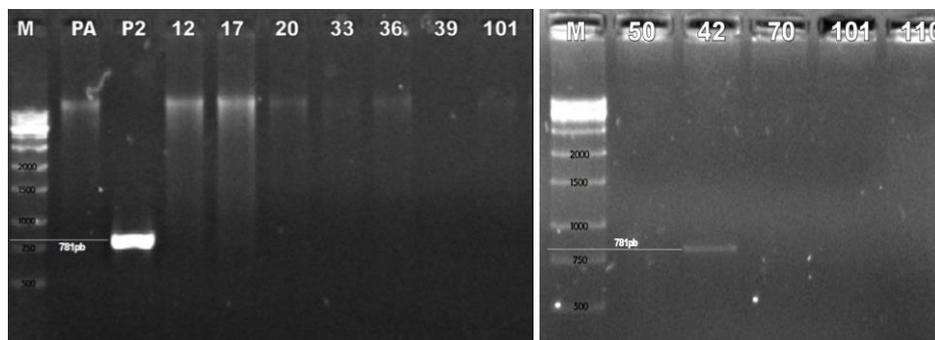


Figura 25 – Amplicons de 781pb correspondentes ao gene *bla_{VIM-2,-3,-6,-8,-9,-10,-11,-18}*.

Legenda: Geis de agarose a 1% demonstrando ampliações geradas com os iniciadores VIM-P1/P2 para o gene *bla_{VIM-2,-3,-6,-8,-9,-10,-11,-18}*. Marcador de 1kb da invitrogen; **Pa01**: controle negativo e **P2**, controle positivo para o gene *bla_{VIM-2,-3,-6,-8,-9,-10,-11,-18}*. Isolado Pa42, positivo para VIM.

Todos os 12 isolados com fenótipo MDR/PDR apresentaram ampliações de 869pb correspondente ao gene *bla_{OXA-50}* (Figura 26).

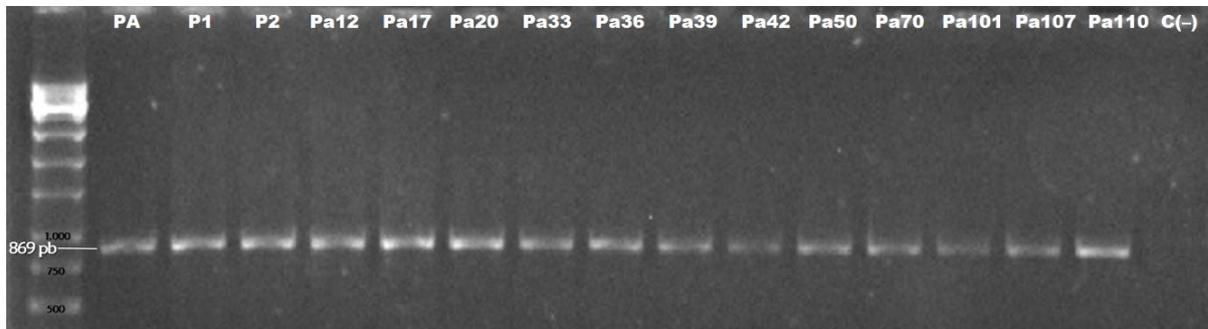


Figura 26 – Amplicons de 869 correspondentes ao gene *bla_{OXA-50}*.

Legenda: Gel de agarose a 1% demonstrando amplificações geradas a partir dos iniciadores OXA-50 (F/R) para o gene *bla_{OXA-50}*; Marcador de 1kb da invitrogen; PA, P1 e P2= cepas padrões de *P. aeruginosa*. Pa12, Pa17, Pa20, Pa33, Pa36, Pa39, Pa42, Pa50, Pa70, Pa101, Pa107, Pa110: isolados MDR/PDR positivos para *bla_{OXA-50}*.

Os amplicons gerados a partir do par de iniciadores KPC-2, VIM (P1/P2) e OXA-50, utilizados para detectar, respectivamente, os genes *bla_{KPC-2}*, *bla_{VIM-2,-3,-6,-8,-9,-10,-11,-18}* e *bla_{OXA-50}*, foram submetidos ao sequenciamento de DNA e comparadas às sequências depositadas no banco de dados do NCBI (Tabela 14).

Tabela 14 – Análise e comparação das sequências com o banco de dados do NCBI.

Cepas	Genes	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Gaps	Acession
Pa36	KPC-2	1335	1335	100%	0.0	740/740 (100%)	0/740 (0%)	NG049253.1
Pa70	KPC-2	886	886	100%	0.0	494/497 (99%)	0/497 (0%)	NG049253.1
Pa101	KPC-2	746	746	100%	0.0	417/419 (99%)	1/419 (0%)	KU665642.1
Pa110	KPC-2	917	917	100%	0.0	511/514 (99%)	0/514 (0%)	HQ246157.1
Pa29	VIM	852	852	100%	0.0	474/475 (99%)	0/475 (0%)	LT222321.1
Pa12	OXA-50	509	509	100%	1,00E-140	284/285 (99%)	0/285 (0%)	NG049773.1
Pa33	OXA-50	105	105	98%	4,00E-20	58/58 (100%)	0/58 (0%)	NG050612.1
Pa36	OXA-50	95.1	95.1	100	6,00E-17	52/52 (100%)	0/52 (0%)	NG050612.1
Pa39	OXA-50	724	724	100%	0.0	410/415 (99%)	2/415 (0%)	NG049777.1
Pa50	OXA-50	499	499	100	2,00E-137	279/281 (99%)	0/281 (0%)	NG049773.1
Pa70	OXA-50	625	625	99	3,00E-175	363/369 (98%)	4/369 (1%)	NG049773.1

Legenda: “Max Score” (pontuação máxima) e “Total Score” (Contagem Total) valores iguais indicam que apenas um único alinhamento está presente; “Query Coverage” (“Cobertura da Pergunta ou Questão”): Porcentagem de nucleotídeos alinhados à sequência disponível no banco de dados; “E value” (valor E ou valor esperado): número de alinhamentos que se espera achar por acaso dada a qualidade do alinhamento e do tamanho do banco de dados; **Ident** (identidade máxima): porcentagem de identidade entre a consulta e a sequência disponível no banco de dados num alinhamento de nucleotídeos-para-nucleotídeos; “Gaps” (intervalos): um “Gap” (-) é inserido quando há bases extras, ou seja, se a consulta tiver uma base extra, um intervalo (-) é inserido na sequência de referência a esta posição; **Accession** (acesso): Número de acesso da sequência referência no banco de dados da NCBI.

6.9 ANÁLISE DOS ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MDR/PDR

P. aeruginosa MDR e PDR estudadas apresentaram fenótipos e genótipos distintos quanto aos antimicrobianos testados, demonstrando a versatilidade dessas bactérias quanto aos diferentes mecanismos de resistência (Tabela 15).

Tais isolados foram mais frequentes nos hospitais HPS28 (66,7%) e HPSJ (25%). No HUFM foi detectado apenas um (8,3%) isolado.

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana desses isolados, apesar de distintos, observou-se que os fenótipos de resistência mais prevalentes foram contra os fármacos β -lactâmicos, principalmente as cefalosporinas e carbapenêmicos.

Clones de *P. aeruginosa* MDR e PDR foram detectados a partir de diferentes hospitais e amostras. No qual os isolados do Grupo A foram obtidos dos hospitais HPS28 e HPSJL, e do grupo clonal B, foram detectado nos três hospitais estudados.

O isolado Pa17, classificado no grupo clonal A, foi isolado a partir de amostras do colchão situado em área destinada aos profissionais de saúde. Isolados do mesmo grupo clonal foram encontrados em amostras de urina e cânula de secreção respiratória de pacientes de diferentes hospitais.

Os isolados classificados no grupo clonal A demonstraram o mesmo perfil genético para integrons e β -lactamases, já os isolados do grupo B não foram parelhos a tais características.

Os integrons de classe 1, bem como os genes *bla_{KPC-2}* foram fatores genéticos frequentes nos nos isolados MDR/PDR estudados, principalmente naqueles classificados no grupo clonal A.

Frente ao pressuposto, os isolados MDR e PDR demonstraram correlação entre a fenotipo de resistência e presença de fatores genéticos que codificam tais mecanismos, bem como demonstraram que clones estão se disseminando entre diferentes locais e pacientes de UTI de diferentes hospitais de Manaus/AM.

Tabela 15 – Características gerais dos isolados de *P. aeruginosa* com fenótipos MDR e PDR

GRUPO CLONAL	CEPAS	FONTE DE ISOLAMENTO	HOSPITAL	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA												INTEGRONS		B-LACTAMASES			
				AMINOGLICOSÍDEOS			β-LACTÂMICOS					FLUOROQUINOLONAS			POL.	intI1	intI2	bla _{KPC}	bla _{VIM}	bla _{OXA}	
				GEN	AMI	TOB	PEN.	CEFALOSPORIN.	CARBAPENÊMICOS	MONO.	LEV	NOR	CIP	POB							
							PIT	CPM	CAZ	IMP					MPM	ATM					
A	Pa17	Colchão (EH03c)	HPS28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Pa33	Cânula paciente (P045c)	HPS28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Pa36	Cânula paciente (P047c)	HPS28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Pa39	Urina paciente (Pa70b)	HPSJL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
B	Pa20	Cânula paciente (P046c)	HPS28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Pa50	Cânula paciente (P072c)	HPSJL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Pa70	Axila paciente (P025d)	HUFM	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
DG	Pa12	Urina paciente (Pa38b)	HPS28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
NR	Pa42	Leito paciente (Pa47e)	HPS28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Pa101	Cânula paciente (P103c)	HPSJL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Pa107	Axila paciente (P030d)	HPS28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Pa110	Axila paciente (P038d)	HPS28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Legenda: A: Grupo clonal A; B: Grupo Clonal B; DG: Degradado; NR: Não relacionado em grupos clonais; **Isolados MDR:** Pa12, Pa17, Pa20, Pa33, Pa39, Pa42, Pa50, Pa70, Pa101, Pa107, Pa110; **Isolado PDR:** Pa36; **GEN:** Gentamicina; **AMI:** Amicacina; **TOB:** Tobramicina; **ATM:** Aztreonam; **IMP:** Imipeném; **CPM:** Cefepime; **MPM:** Meropenem; **CAZ:** Ceftazidima; **NOR:** Norfloxacin; **LEV:** Levofloxacin; **CIP:** Ciprofloxacina; **PIT:** Piperacilina/tazobactam; **POB:** Polimixina B; ■: Sensível ao antimicrobiano testado ou ausente para o gene testado; ■: Sensibilidade intermediária ao antimicrobiano; ■: Resistente ao antimicrobiano testado; ■: Positivo para o gene testado.

7. DISCUSSÃO

Todo trabalho que se propõe isolar micro-organismos invariavelmente passa pela etapa de identificação. Por décadas a identificação recorreu a métodos que se baseiam em cultivo necessariamente, seja em meios específicos para induzir determinado fenótipo, sejam meios seletivos para determinados gêneros, entre outros. O uso de métodos morfotintoriais e bioquímicos completam a aborgagem bacteriológica já bem estabelecida.

Entretanto, depois dos trabalhos de Woese (1987) usando marcadores moleculares, em especial buscando a similaridade do gene 16S rRNA entre diferentes espécies, novos paradigmas se apresentaram para a microbiologia. Durante duas ou três décadas houve uma migração em massa para o campo da microbiologia molecular, como se essa pudesse solucionar ou minimizar os problemas e dificuldades encontradas pela metodologia até então denominada clássica.

De fato, por um bom tempo foi possível “identificar” com certa facilidade, usando sequências parciais do gene 16S rRNA, isolados microbianos, mas a facilidade de acesso às ferramentas moleculares somado ao avanço da tecnologia que permite gerar em um único dia dados que antes levavam anos têm por consequência o aumento exponencial no depósito de sequências, boa parte com qualidade duvidosa. Por conseguinte, atualmente, mesmo tendo a sequência completa do gene 16S rRNA, a identificação definitiva de micro-organismos ainda é hipotética.

Para *P. aeruginosa* a abordagem molecular tem buscado analisar a similaridade de sequências a partir de outros genes, além do 16S rRNA, tais como *atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *recA* e *rpoD* (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1998; HILARIO et al., 2004; TAYEB et al., 2005, 2008). Apesar de diferentes genes serem utilizados, o gene 16S rRNA é considerado padrão ouro para classificação bacteriana (SANSCHAGRIN; YERGEAU, 2014; YANG et al., 2016). O que pode ser justificado pelo fato de que na maioria dos casos (> 90%) em que o sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizado, forneceu a identificação do gênero e em 65 a 83% em que foi aplicado pode-se identificar a nível de espécie. Relata-se ainda uma baixa frequência (1 a 14%) em que os isolados não foram identificados através do uso desse marcador (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1998; HILARIO et al., 2004; TAYEB et al., 2005, 2008). No presente estudo, todas as cepas de *P. aeruginosa* submetidas a amplificação do gene 16s utilizando iniciadores anteriormente descrito (SPILKER et al., 2004), apresentaram

amplicons com tamanho esperado (Figura 16). Suas sequências, demonstraram 99% de identidade para *P. aeruginosa* quando comparadas às sequências depositadas no banco de dados do GenBank (NCBI) (Anexo 1).

O trato respiratório foi o principal sítio de isolamento de *P. aeruginosa* nesse estudo (Gráficos 2 e 4). Resultado semelhante foi relatado por Nóbrega et al. (2013). Scheffer et al. (2010) reportou o trato urinário como o principal sítio de isolamento dessa espécie. A presença de *P. aeruginosa* nesses sítios provavelmente está relacionado ao fato de que os pacientes são rotineiramente manipulados com procedimentos invasivos, tais como os cateteres, sondas, intubação traqueal, frequente necessidade de ventilação mecânica, aspirações e uso de sedação contínua. A essas últimas condições são atribuídas a redução dos movimentos ciliares da árvore respiratória, o que conseqüentemente aumenta o tempo de ventilação mecânica e de permanência na unidade. Tais fatores de risco aumentam a probabilidade de adquirir infecções hospitalares (NÓBREGA et al., 2013).

As cepas de *P. aeruginosa* foram predominantemente isoladas do HPS28, principalmente a partir de amostras de cânula de secreção respiratória e axilas de pacientes. O HPSJL também demonstrou alta taxa de cepas isoladas a partir dessas fontes. Assim como o HUFM, que além das cânulas, também foram obtidas de amostras de sangue (Gráfico 4). Acredita-se que a presença de isolados em amostras de sangue, obtidas do HUFM, ocorreu, pois, as coletas de sangue nesse hospital foram realizadas exclusivamente a partir de cateter venoso, diferentemente dos demais, os quais foram colhidas principalmente por punção venosa. O que reforça que esses isolados são comumente encontrados em infecções de corrente sanguínea associado a cateter venoso central.

O isolamento de cepas de *P. aeruginosa* a partir de amostras coletadas das estruturas das UTIs (Gráfico 3), demonstra que essas bactérias estão disseminadas nesse ambiente hospitalar, pois foram obtidas de diferentes locais, tais como pias e torneiras destinadas à higienização das mãos dos profissionais, portas que dão acesso a UTI, prontuário médico, bem como a partir de amostras de colchão situado em local destinado aos profissionais da UTI. Entretanto, com exceção desse isolado obtido do colchão (que pertencia ao grupo clonal A, ou seja, era um dos clones multirresistentes que estavam se disseminando intra e interhospitalar), a maioria das cepas isoladas a partir da estrutura hospitalar, bem como de profissionais, apresentaram-se sensíveis aos antimicrobianos testados (Anexo 3).

Em concordância com este estudo, alguns autores relataram que artigos pessoais de médicos e pessoal de enfermagem também podem ser considerados potenciais reservatórios e

vetores de *P. aeruginosa* (TESS et al., 1993; MCNEIL et al., 2001). Moolenaar e colaboradores (2000) também descreveram um foco de *P. aeruginosa* ligado a unhas artificiais, e McNeil et al. (2001) relataram uma colonização crônica dessa bactéria em uma enfermeira. Cepas de *P. aeruginosa* isoladas a partir de estrutura hospitalar e de superfície corpórea de profissionais de saúde, evidenciam que estes são potenciais reservatórios de bactérias que causam infecções hospitalares graves (NÓBREGA et al., 2013).

A pesquisa do gene *bla_{OXA-50}* foi inicialmente proposta para analisar mecanismos de resistência antimicrobiana, assim como as demais β -lactamases. Entretanto, devido ao fato das cepas de *P. aeruginosa* que foram pesquisadas para esse gene terem demonstrado-se positivas, considerou-se inviável analisar tais mecanismos (Figura 26). Além disso, na literatura, o gene *bla_{OXA-50}* é descrito como um gene que é naturalmente codificado no genoma de *P. aeruginosa*. Portanto, por ser um gene expresso constitutivamente no genoma de *P. aeruginosa*, muitos autores têm indicado usá-lo concomitante com outros marcadores genéticos para identificação taxonômica dessas espécies bacterianas (NAAS; NORDMANN et al., 1999; GIRLICH et al., 2004). Além disso, o gene *bla_{OXA-50}* não apresenta relevância fenotípica de resistência antimicrobiana, pois é capaz de induz pequenas alterações apenas quando expresso a partir de um plasmídeo de múltiplas cópias, o que poderá reduzir a suscetibilidade a ampicilina, a ticarcilina, ao moxalactam e ao meropenem em *P. aeruginosa* (STOVER et al., 2000; GIRLICH et al., 2004; KONG et al., 2005).

Portanto, a associação de resultados fenotípicos com a amplificação e sequenciamento dos genes 16sRNA e OXA-50, viabilizaram resultados mais fidedignos referentes à identificação dos isolados estudados.

Na literatura são encontrados diferentes critérios para classificar as bactérias quanto aos fenótipos de multirresistência (MDR) e panresistência (PDR) a antimicrobianos (FALAGAS et al, 2006; PATERSON, 2006; COHEN et al, 2008; HIDRON et al, 2008; MACGOWAN, 2008). Apesar dos esforços internacionais atuais para unificar e padronizar a classificação, até o momento, tal objetivo ainda não foi atingido, tendo em vista as diversas definições e as distintas opções terapêuticas disponíveis (MAGIORAKOS et al, 2012). Assim, a ausência de definições específicas para MDR e PDR em protocolos de estudos clínicos dá origem a dados que são difíceis de comparar. Entretanto, utilizando critérios atuais foram detectadas 11 cepas MDR e uma PDR (Gráfico 5 e Tabela 9) (MAGIORAKOS et al., 2012; GERMAN et al., 2016).

Apesar de ser inviável comparar os diferentes fenótipos de resistência, pôde-se comparar as taxas de suscetibilidade aos antimicrobianos testados com os de outros autores. Nesse estudo, observou-se que os isolados apresentaram maior suscetibilidade aos aminoglicosídeos, principalmente a amicacina (Gráfico 6). O mesmo perfil de sensibilidade foi demonstrado na região-centro oeste do Brasil e no estado de Pernambuco pela rede RM (ANVISA, 2009), que monitorou o perfil de sensibilidade de agentes prioritários de infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes internados em UTI, durante o período de julho de 2006 a junho 2008. Apesar da concordância dos resultados, o padrão brasileiro de sensibilidade para *P. aeruginosa* registrado para o mesmo período, demonstrou que a piperacilina associada ao tazobactam era o medicamento mais efetivo para o tratamento de infecções por essa bactéria (ANVISA, 2009).

A suscetibilidade de *P. aeruginosa* a penicilina combinada a inibidores de β -lactamases, tal como a piperaciclina/tazobactam, é frequentemente reportada na literatura (SCHEFFER et al., 2010). Coerente com tais estudos, a maioria dos isolados foi suscetível a essa mesma associação de fármacos. Entretanto, Yayan et al. (2015) afirma que o uso corriqueiro dessa associação, principalmente no tratamento de infecções graves, tem contribuído para o aumento da resistência a esses antimicrobianos, tornando o tratamento controverso (TAM et al, 2008).

A polimixina B também demonstrou bastante efetividade *in vitro* nesse estudo. Resultados similares foram apresentados por Yayan et al. (2015), que ao longo de 10 anos relataram que isolados bacterianos foram, na sua grande maioria, sensíveis ou raramente resistentes a essa classe de antimicrobiano. Scheffer et al. (2010) corroboram com esses achados, pois em seus estudos relataram que todos os isolados de *P. aeruginosa* testados para esse fármaco foram suscetíveis. Entretanto, casos esporádicos de cepas de *P. aeruginosa* resistentes as polimixinas têm sido descritas (LAUPLAND et al., 2005), inclusive nesse estudo três isolados demonstraram resistência à polimixina B. A resistência as polimixinas tem sido atribuída a modificações da membrana externa, devido a expressão exacerbada da porina *OprH*, ausência de 2-hidroxilaurato, presença de 4-aminoarabinose ou aumento de palmitato na fração lipídica da membrana, tornando-as impermeáveis ou aumentando a capacidade de expulsar agentes tóxicos a do meio intracelular (BONOMO e SZABO, 2006; MILLER et al., 2011; BLAIR et al., 2015).

Os agentes antimicrobianos gentamicina e fluoroquinolona apresentaram grande atividade contra *P. aeruginosa*, com altas taxas de sensibilidade (95% e 92%,

respectivamente). Tal panorama é discrepante quanto ao perfil brasileiro, já que no período de 2006 a 2008, foram os principais antimicrobianos associados aos isolados com fenótipos de resistência, apresentando em média, apenas 47% de sensibilidade a esses antimicrobianos (ANVISA, 2009).

O panorama brasileiro de resistência as fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos, que ocorreu no período de 2006 a 2008, pode ser justificado pelo fato de que esses fármacos, por apresentarem amplo espectro de ação, foram extensivamente prescritos como terapia empírica para o tratamento de infecções na comunidade e hospitalares causadas por bactérias multirresistentes (PEREIRA et al. 2007). Corroborando com esse panorama, até 2006 o ciprofloxacino, era considerado, entre as quinolonas, o agente antimicrobiano mais consumido em todo mundo. Sendo assim, o alto consumo desses fármacos, bem como erros em seu emprego na terapêutica, foram considerados fatores responsáveis pelo desenvolvimento de resistência bacteriana a esta classe de antibióticos (BIEDENBACH et al., 2006; CHENIA et al., 2006; BIEDENBACH et al., 2006; PEREIRA et al. 2007). Entretanto, numa tentativa de manter a eficácia desses fármacos, tem sido elaborada diretrizes de prescrição, que recomenda estas classes como agentes de segunda linha que devem ser usados apenas quando os antibióticos de espectro estreito não forem eficazes (HERMANN, 2007; FALAGAS et al., 2008; REDGRAVE et al., 2014).

Em contrapartida, os antimicrobianos menos efetivos contra *P. aeruginosa* foram, respectivamente, aztreonam, imipeném e cefepime. O perfil nacional em relação ao fármaco menos efetivo contra *P. aeruginosa* foi concordante para cefalosporina de quarta geração, que também demonstrou alta taxa de resistência ao cefepime. No entanto, não são concordantes com os demais, sendo atribuída menor efetividade aos fármacos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas (ANVISA, 2009). Scheffer et al. (2010) também demonstrou que os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram pouca efetividade sob o aztreonam e cefepime.

Os carbapenêmicos imipeném e meropeném, estão entre os fármacos que mais apresentaram resistência nesse estudo. Tais resultados são concordantes com os estudos de Nóbrega et al. (2013), que ao longo de quatro anos relatou a persistência da resistência a essa classe de fármacos. Assim como os dados publicados pela ANVISA (2014 a,b; 2015), que relata a *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos como um dos agentes mais frequentemente notificados como agente etiológico de IPCSL relacionada a CVC. Scheffer et al. (2010), também demonstrou que os isolados apresentaram menor suscetibilidade a esses antimicrobianos. Evidências indicam que o aumento de cepas produtoras de metalo- β -

lactamases, capazes de hidrolisar esta classe de antibióticos, esteja associada ao aumento de resistência a esses fármacos (SHEIKH et al., 2014).

A discrepância entre o perfil de resistência detectado neste estudo em relação ao panorama nacional, pode ser justificado, além dos fatores já descritos, também devido as baixas notificações de resistência enviadas pelos hospitais da região Norte, e também devido ao fato de não terem dados atualizados para esse panorama, tendo em vista que a Rede RM só tem mantido atualizado dados percentuais de resistência de um único perfil, para apenas um sítio, tal como o percentual de infecções de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos imipeném e meropeném (ANVISA 2009; 2015).

Os resultados da tipagem por PFGE permite constatar que grupos clonais estão se dispersando em ambiente intra e interhospitalar, tendo em vista que isolados dos mesmos grupos foram detectados nos três hospitais estudados e, ainda a partir de diferentes pacientes, profissionais e de estrutura. Também observou-se que os isolados pertencentes aos grupos clonais albergam principalmente o gene *bla_{KPC-2}*, o qual codifica uma metalo- β -lactamase que codifica resistência a praticamente todos os antimicrobianos β -lacâmicos, o qual é mais frequentemente encontrado em *K. pneumoniae* e enterobactérias, reforçando a capacidade de transferência de genes de resistência intra e interespecies (Tabelas 10 e 15 e Figura 17).

Apesar da evidência de disseminação de clones intra e interhospitalar, como o período de isolamento foi curto (3 meses) e em diferente hospitais, não se pode concluir se a presença desses dois grupos clonais é constante.

A frequência de isolados contendo genes codificadores de integrase nesse estudo foi 38,6% (32/83) positivos para integrons de classe 1, e 3,6% (3/83) integrons de classe 2 (Figura 18e Figura 19 e Anexo 4). Odumosu et al. (2013) detectou 31 (5,4%) isolados positivos para integrons de classe 1. Enquanto Shahcheraghi et al. (2010) relata uma alta prevalência (100%) de integrons detectados em seu estudo. Xu et al (2009), em um estudo realizado na China, relatou a frequência de 45,8%. Hsiao et al. (2014) detectou 41,4% no sul de Taiwan. No Brasil, são relatadas frequências equivalentes de integrons de classe 1, como observado nos estudos realizados em 2005, por Fonseca et al., que detectou integrons de classe 1 em 41,5% das cepas isoladas em hospitais da cidade de São Luís do Maranhão.

Assim como neste estudo, Xu et al. (2009) relatou uma baixa frequência de integrons de classe 2 nos isolados de *P. aeruginosa* estudados (19,5% e 3,6%, respectivamente) (Figura 19). Já em relação ao integrons de classe 3, em nenhum desses estudos foram detectados *P.*

aeruginosa contendo o gene *intI3* (FONSECA et al., 2005; XU et al., 2009; SHAHCHERAGHI et al., 2010; HSIAO et al., 2014). Os íntegrans de classes 1 e 2 são os mais comuns, enquanto os de classe 3 são raros e não parecem ser portadores significativos de genes de resistência antimicrobiana, pelo menos, não são conhecidos (FLUIT; SCHMITZ, 2004; DENG et al., 2015).

A análise dos integrons por RFLP possibilitou confirmar e classificar 59,4% (19/32) dos isolados positivos para integrons (Figuras 20 e 21). Resultados similares foram apresentados por Odumosu et al. (2013), que utilizando a mesma técnica detectaram que 57% dos isolados de *P. aeruginosa* eram integrase positivo. Em contraste, Farshad et al. (2008), que também empregaram a técnica de RFLP, verificaram uma baixa distribuição de integrons entre os isolados, em que apenas 16,7% foram positivos para integrons, e desses 6,3% dos isolados foram positivos para integrons de classe 1 e 10,4% para classe 2.

A presença de integrons de classe 1 nos isolados de *P. aeruginosa* apresenta correlação estatística significativa com praticamente todas as classes de antimicrobianos testados – aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina e tobramicina), penicilinas (piperacilina/tazobactam), cefalosporinas (ceftazidima), carbapenêmicos (imipeném e meropeném) e às fluoroquinolonas (norfloxacin, levofloxacin e ciprofloxacina) – exceto aos monobactâmicos e às polimixinas (Tabelas 11 e 12). Dados similares foram encontrados por Chen et al. (2009), que além de ter encontrado a mesma correlação, também demonstrou associação significativa entre a presença de integrons de classe 1 e resistência ao aztreonam (monobactamo).

A suscetibilidade dos isolados a piperacilina-tazobactam foram discordantes, pois ao contrário do que foi detectado no atual estudo, Chen et al. (2009) não encontraram correlação estatística significativa entre tal antimicrobiano e a presença de integrons de classe 1. A discrepância entre os resultados pode ser atribuída a vários fatores, entre eles cita-se o fato de que isolados produtores de *ampC*, não são eficazmente inibidos por tazobactam, resultando em variações nas taxas de resistência e de suscetibilidade (GIN, 2007; VOETS et al., 2013).

A β -lactamase *ampC*, codificada cromossomicamente ou por plasmídeos, é normalmente produzida em níveis baixos na ausência de β -lactâmicos, mas na presença de indutores, pode aumentar a expressão de 100 a 1000 vezes, o que resulta em uma hiperprodução constitutiva de *ampC*, conseqüentemente torna o isolado resistente aos β -lactâmicos (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002; VOETS et al., 2013), principalmente as

penicilinas e cefalosporinas antipseudomonas, tendo em vista que as alterações na *ampC* é considerada a principal causa de resistência a essas classes de fármacos (GIN, 2007; BERRAZEG et al., 2015).

Um estudo realizado na China (GU et al., 2007), demonstrou que a associação entre os integrons e à resistência antimicrobiana foi muito mais relevante quando comparada a outros estudos, apresentando correlação significativa com praticamente todos os antimicrobianos testados, inclusive a associação piperacilina-tazobactam (MARTINEZ-FREIJO et al., 1998; KOELEMAN et al., 2001). Gu et al. (2007) também demonstrou associação dos integrons de classe 1 com a resistência aos aminoglicosídeos gentamicina e tobramicina. No presente estudo, somente a resistência à tobramicina associada a presença de integrons de classe 1 foi estatisticamente significativa. Em contraste, nos estudos de Chen et al. (2009), todas os aminoglicosídeos foram estatisticamente correlacionados à presença desses elementos.

A produção de enzima aciltransferase 6', codificado a partir do gene *aac(6')*, comumente presente em integrons, pode ser o mecanismo pelo qual esses isolados apresentaram resistência aos aminoglicosídeos, tendo em vista que essas enzimas modificam e inativam essa classe de fármacos. A discrepância quanto ao tipo de agente antimicrobiano que foram resistentes pode ser justificada pelo fato de que existem diferentes subfamílias dessa enzima, na qual a expressão da subfamília I confere resistência a tobramicina e amicacina, já a subfamília II, torna o isolado resistente a gentamicina (ROMAN DUBOIS et al., 2002; OWSKA et al., 2013).

Apesar da concordância entre os estudos, atribuir unicamente aos integrons de classe 1 a razão para os fenótipos de resistência apresentado pelos isolados estudados seria inviável, pois são necessários experimentos adicionais, tais como o sequenciamento dos integrons, o que iria possibilitar analisar os genes contidos nesses elementos, bem como detectar e analisar os demais mecanismos de resistência, como a superexpressão de bombas de efluxo, perda de porina, alteração do sítio alvo, enzimas inativadoras de antimicrobianos, etc.

Os iniciadores 5'CS e 3'CS e *hep58* e *hep59* foram utilizados para estudo dos cassetes gênicos, tendo como alvo a região variável dos integrons de classe 1, os quais podem ou não conter esses elementos móveis associados aos integrons. Dos isolados *intI1* positivos ($n=32$), 27 (87,1%) apresentaram ampliações utilizando os iniciadores 5'CS e 3'CS. Já com os iniciadores *hep58* e *hep59*, 18 (58,1%) isolados apresentaram ampliações (Figura 22).

O fato de que alguns isolados positivos para *intI1* não apresentaram amplificações utilizando iniciadores *hep58* e *hep59*, pode ser justificada pela ausência de um segmento na extremidade 3' do íntegron ou polimorfismo na região de pareamento do iniciador reverso. Para minimizar este problema e aumentar as possibilidades de amplificação para essa região foram utilizados os iniciadores 5'CS-F e 3'CS-R, tendo em vista que se ancoram em regiões do íntegron de classe 1 em que polimorfismos de sequências são pouco frequentes (WHITE et al., 2001; JONES et al., 2005; CLÍMACO, 2011). Mesmo usando essa estratégia, alguns isolados positivos para *intI1* não apresentaram amplificações, provavelmente pelos mesmos motivos já discutidos para o par HEP58/59. Além disso, uma alta porcentagem de isolados sem regiões cassetes foram observadas, o que indica que apesar desses elementos estarem presentes em isolados com fenótipo de multirresistência antimicrobiana, não necessariamente indicam que são determinantes para a expressão desse fenótipo (Anexo 4).

Os amplicons gerados para região do cassete gênico variaram em relação ao tamanho (500bp a 1,8Kbp) e quantidade (um único amplicon ou dois amplicons por reação) (Figuras 22 e 23, Tabela 13 e Anexo 4). Em contraste, Odumosu et al. (2013), demonstraram que todos os isolados *intI1* positivos (n=31) produziram amplicons utilizando os mesmos iniciadores previamente descritos (WHITE et al., 2001), sendo que 23 (74%) isolados produziram um único amplicon de aproximadamente 1,6 Kbp, enquanto que os 8 isolados restantes forneceram um único amplicon de 1,2 Kbp. O sequenciamento desses amplicons revelou homologia completa com os genes *aadA6-ofrD* e *aadA13*, respectivamente (ODUMOSU et al., 2013).

No presente estudo, foi detectado o arranjo *aadA6-ofrD*, no entanto, a partir da sequência do amplicon de 1,2kb (Tabela 13). Essa variação no tamanho das amplificações e a identificação de diferentes genes cassetes utilizando os mesmos iniciadores hep-58/59, têm sido relatada em diferentes estudos (WHITE et al., 2001; CHEN et al., 2009; XIA et al., 2010; JINGYUAN et al., 2011; ODUMOSU et al., 2013; SUNG et al., 2014; CUI et al., 2014), o que pode ser justificado pelo fato que alguns integrons estão vazios, ou seja, não carregam cassetes gênicos, e outros podem abrigar um único ou vários desses elementos genéticos (DENG et al., 2015).

Em conjunto, do ponto de vista genético, o que esses dados demonstram é uma alta dinâmica de composição de estruturas gênicas. Obviamente, o processo de inserção excisão

de íntegrans e genes que compõem o cassete gênico é passível de erros que acabam sendo tolerados principalmente se a pressão seletiva sobre essas variantes for pequena.

Em concordância com estudos anteriores, as reações de sequenciamento referente à região variável dos integrons de classe 1 demonstraram a prevalência de genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos e ao trimetropim. Nesse estudo, os principais cassetes gênicos detectados pertenciam à família *aad* (*aadA6* e *aadA2*) e *dfr* (*dfrA12*, *dfrA1* e *dfrA15*) que conferem resistência aos aminoglicosídeos (estreptomicina e espectinomicina) e ao trimetropim, respectivamente, achados coincidentes com dados da literatura (Tabela 13) (LIM et al., 2009; PARTRIDGE et al., 2009; SOW et al., 2010; KOR et al., 2013; HSIAO et al., 2014; SHARMA et al., 2015; TOVAL et al., 2015).

Em contraste com os estudos de Toval et al. (2015), que demonstrou que os cassetes gênicos mais prevalentes entre os isolados de *P. aeruginosa* eram o *aacA4*, seguido de *aadA6* e *orfD*, no presente estudo o gene cassete mais detectado foi o *aadA6*, seguido de *dfrA12* e *aadA2*. A primeira detecção do gene *aadA6* ocorreu a partir de um isolado de *P. aeruginosa* (NASS et al., 1999). Desde então, tal gene tem sido reportado de forma recorrente nos cassetes gênicos dos integrons de classe 1, principalmente nas famílias das *Enterobacteriaceae*, e mais comumente na *E. coli* (ZHAO et al., 2001; ROE et al., 2003; TOVAL et al., 2015).

Em concordância com estudos anteriores, além do gene *aadA6*, também foi detectado um gene que codifica uma ORF de função desconhecida (*OrfD*) (TOVAL et al., 2015). Assim como em estudos anteriores os arranjos *dfrA12-aadA2* também foram detectados nesse estudo (XU et al., 2009; LIM et al., 2009; KOR et al., 2013; HSIAO et al., 2014). A literatura reporta integrons de classe 1 contendo o gene cassete *dfrA15* sozinho ou em associação com outros genes, principalmente nas combinações *dfrA5-dfrA15* ou *dfrA15-aadA1* (SOW et al., 2010). No presente estudo, verificou-se a presença da combinação *dfrA15-dhfrA1* e *dfrA15/qacEdelta1*.

Os aminoglicosídeos estreptomicina e espectinomicina foram largamente utilizados na década de 1940, e por muitos anos foi o esteio no tratamento de infecções graves decorrentes de bacilos Gram-negativos aeróbios (WAKSMAN et al., 1944; HERMANN et al., 2007). Contudo, devido a sua grave toxicidade, o emprego desse fármaco tornou-se infrequente, sendo usado esporadicamente em esquemas alternativos contra tuberculose (REEVES et al., 2013; WENDLANDT et al., 2014).

Apesar dos aminoglicosídeos serem eventualmente empregados, os genes que codificam resistência a estes fármacos continuam prevalecendo entre os isolados (YU et al., 2003; PARTRIDGE et al., 2009; WENDLANDT et al., 2014). Fato que pode ser constatado pela frequência em que os genes da família *aad*, que conferem resistência a esses antimicrobianos, são reportados (NAAS et al., 1999; WHITE et al., 2000; WHITE et al., 2001; CHEN et al., 2009; XIA et al., 2010; JINGYUAN et al., 2011; ODUMOSU et al., 2013; SUNG et al., 2014; CUI et al., 2014)

A literatura afirma que os integrons, além da capacidade de excisar e inserir os genes de resistência, também demonstram uma forma de memória genética, que pode ser reativada devido a a exposição a antibióticos que deixaram de ser empregados. Tal reativação faz com que cassetes que são encontrados mais próximos da extremidade 3' do integron, sejam reposicionados pela integrase, mais perto do promotor localizado na região 5', para que assim eles possam ser expressos mais eficientemente (YU et al., 2003; PARTRIDGE et al., 2009; WENDLANDT et al., 2014).

A presença dos cassetes que transportam os genes *dfr*, o qual codifica resistência ao trimetoprim, pode ser justificada pelo fato desse antimicrobiano ser rotineiramente empregado no tratamento de infecções do trato urinário, o que contribui para a sua elevada prevalência (YU et al., 2003; PARTRIDGE et al., 2009; WENDLANDT et al., 2014).

Dentre os antimicrobianos β -lactâmicos, os carbapenêmicos tem o maior espectro de ação para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, por esse motivo o surgimento e propagação de carbapenemases tornou-se um grande problema de saúde pública. Foram pesquisados nos isolados com fenótipos MDR/PDR genes codificadores das enzimas dos principais grupos das metalo- β -lactamases (VIM, IMP e SPM) e as serinos-carbapenemases (KPC-2, GES-2 e OXA). Nesse estudo foram detectados isolados MDR/PDR produtores de *bla*_{KPC-2} (75%), *bla*_{VIM} (8,3%) e *bla*_{OXA-50} (100%) (Tabela 14 eTabela 15 e Figura 24Figura 25Figura 26).

As enzimas *bla*_{KPC-2}, como o próprio nome diz (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) são mais frequentemente isoladas em amostras de *K. pneumoniae*, sendo comumente relatadas nas Américas do Norte e do Sul (CASTANHEIRA, 2008). Entretanto, estas enzimas também têm sido descritas em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (VILLEGAS et al., 2007; KITCHEL et al., 2009; ROBLEDO et al. 2010). Nos últimos anos têm sido relatados surtos de bactérias produtoras de KPC no Brasil. Em 2010, o surto foi atribuído a *Klebsiella pneuminae* KPC-2 positiva, que incluiu o

Distrito Federal e 11 estados situados nas regiões Sul (Santa Catarina), Sudeste (Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), Nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco e Alagoas) e na região Norte (Amazonas) (PEREIRA et al., 2013).

Um outro estudo, realizado entre 2009 e 2011, fez um levantamento sobre a epidemiologia molecular e antecedentes genéticos do gene *bla_{KPC-2}* em espécies de *Enterobacteriaceae* (não *K. Pneumoniae*), que por sua vez envolveu nove estados brasileiros, situados nas regiões Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro), Centro-Oeste (Distrito Federal e Goiás) e Nordeste (Pernambuco, Alagoas, Ceará e Bahia), e evidenciou uma disseminação da KPC-2 em nove espécies de enterobactérias, incluindo espécies que não foram previamente descritos como *Pantoea agglomerans* e *Providencia stuartii* (TAVARES et al., 2015).

Nesse estudo, oito (66,7%) isolados de *P. aeruginosa* com fenótipo MDR/PDR foram positivas para o gene *bla_{KPC-2}* (Tabela 15 e Figuras 24 e 26). Entretanto, no Brasil, ainda existem poucos relatos da presença de KPC em *Pseudomonas* e até mesmo em outras espécies de *Enterobacteriaceae*. O primeiro relato de KPC-2 em outras bactérias, foi realizado por Zavascki e colaboradores (2009), que demonstrou a presença do KPC-2 em duas amostras de *E. cloacae* no Rio Grande do Sul. Em 2010, em um hospital no Rio de Janeiro, foram isolados cinco clones de *E. coli* produtoras de KPC-2 (CARVALHO-ASSEF et al., 2010). Um caso de sepsse por *S. marcescens* produtora de KPC foi descrita em 2010 (DEL PELOSO, 2010). Isolados de *C. freundii*, *S. marcescens* e *E. cloacae*, obtidos de amostras no Rio de Janeiro e em São Paulo, também foram positivas para essa enzima (ANDRADE et al., 2011). E em 2012, foram isoladas *K. oxytoca* positivas para KPC-2, em Recife (ALMEIDA et al., 2013).

Em 2012, foi divulgado o primeiro relato de *P. aeruginosa* produtora de KPC no Brasil, tais isolados foram obtidos a partir de secreção traqueal de dois pacientes distintos em uma UTI de um hospital terciário localizado em Recife/Pernambuco (DE ARAÚJO JÁCOME et al., 2012). No mesmo ano também foi descrita *Pseudomonas putida* produtora de KPC (ALMEIDA et al. 2012; DE ARAÚJO JÁCOME et al., 2012).

O gene *bla_{KPC}* pode ser encontrado em elementos móveis, tal como transposons que geralmente estão inseridos em plasmídeos, o que explica a sua dispersão não só entre as espécies de *Klebsiella*, mas entre outros gêneros (COLE et al., 2009; DRAWZ; BONOMO, 2010; CUZON et al., 2010). Muitos trabalhos têm relatado que o gene *bla_{KPC}* é carregado pelo transposon da família Tn3 de 10kb, denominado de Tn4401 inserido em plasmídeos de 40 Kbp (NAAS et al., 2008; DRAWZ; BONOMO, 2010; CUZON et al., 2010; PEREIRA et al.,

2013). No Brasil, a disseminação de *bla*_{KPC-2} está ocorrendo devido à dispersão de plasmídeos carreadores de transposon Tn4401 isoforma “b”, principalmente, a disseminação do complexo clonal 11, composto por plasmídeos com tipos de sequências (STs) similares, identificados como ST11, ST437 e ST340 (PEREIRA et al., 2013; TAVARES et al., 2015).

Isolados produtores de KPC geralmente apresentam resistências as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, e a inibição dessas enzimas por clavulanato é variável. Tais isolados podem apresentar coprodução de enzimas ESBL, bem como resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (TAVARES et al., 2015). Neste estudo três dos isolados KPC positivos foram resistentes aos aminoglicosídeos, e ainda um deles também apresentaram resistência à fluoroquinolonas (Tabela 15).

Devido a essa resistência, as polimixinas (colistina e polimixina B) e tigeciclina têm sido utilizadas para o tratamento das infecções por bactérias resistentes aos carbapenemas. As polimixinas apresentam alta toxicidade e a tigeciclina, ainda não tem teste de sensibilidade padronizado no CLSI e não é recomendada para infecções de corrente sanguínea (MONTEIRO et al., 2009). Apesar das polimixinas serem opção terapêutica para o tratamento de pacientes com resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, já foram reportados isolados de *K. pneumonia* produtoras de KPC-2 também resistentes a esses fármacos (PEREIRA et al., 2013). No presente estudo, um dos isolados de *P. aeruginosa* positivo para KPC-2 também apresentou resistência à polimixina B (Tabela 15).

Ainda, nesse estudo, foi detectado, a partir de um isolado, um gene codificador de carbapenemase do tipo VIM (Tabela 15 e Figura 25). Essa M β L foi identificada pela primeira vez na Itália a partir de um isolado de *P. aeruginosa* (LAURETTI et al., 1999; YANG et al., 1999). Até o momento foram identificadas mais de 40 variantes de VIM, as quais apresentam de 74,3 a 99,6% de similaridade entre suas sequências (CORNAGLIA et al., 2011; FRASSON et al., 2013; JACOBY, G.; BUSH, 2014; ZAMORANO et al., 2016). Entre as variantes VIM, a VIM-2 é a de ocorrência mundial e mais frequentemente encontrada na clínica (POIREL et al., 2000; LOLANS et al., 2005); YU et al., 2006; DULJASZ et al., 2009; CASTANHEIRA et al., 2009; RIZEK et al., 2014; PAUL et al., 2016). Com as sequências geradas nesse estudo, não foi possível determinar a subclasse VIM; a ORF completa do gene será sequenciada para a correta classificação. Os polimorfismos encontrados precisam ser testados por mais de uma metodologia molecular, tendo em vista que frequentemente mutações de uma única base que levam à substituição de aminoácidos podem conferir diferenças funcionais significativas (PAPAGIANNITSIS et al., 2015).

A presença de carbapemase do tipo VIM geralmente confere resistência ou suscetibilidade intermediária a pelo menos um carbapenemo (ZHAO et al. 2009). Nesse estudo, o isolado produtor de VIM foi resistente apenas ao meropenem e sensível ao imipeném. Estudos anteriores (TOLEMAN et al., 2007) relatam que os isolados produtores de carbapenemases permanecem suscetíveis à polimixina, no entanto, tanto nesse estudo, como nos de Paul et al. (2016) foram detectados isolados produtores de VIM resistentes à polimixina B. Entretanto, apesar dessa evidência, atribuir a resistência à polimixina B é inviável, tendo em vista os múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana existentes.

Em um estudo realizado no Instituto Central do Hospital das Clínicas (ICHC - FMUSP), 129 cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos imipiném e meropeném foram isoladas ao longo de 12 anos (1998 a 2012). Desses isolados, 50 (39%) continham genes codificadores de carbapenemases, como o *bla_{SPM}* identificado em 41 isolados (32%), seguido de 10 (7,8%) com *bla_{KPC}*, 5 (3,9%) com *bla_{VIM}* e 3 (2,3%) isolados com *bla_{GES-5}* (RIZEK et al., 2014). Em concordância com esses dados, no presente estudo verificou-se que, dos 12 isolados MDR, 8 apresentaram fenótipo de resistência ou suscetibilidade reduzida a pelo menos um dos dois carbapenêmicos testados (imipeném e meropeném), dessas 5 (62,5%) isolados continham genes codificadores de carbapenemases, os quais 4 (50%) isolados foram positivos para KPC-2 e 1 (12,5%) para VIM-2 (Tabela 15). Apesar da concordância entre os estudos, a resistência aos carbapenêmicos pode ser atribuída não apenas à presença de enzimas carbapemases, mas também a outros mecanismos de resistência, tais como alteração de proteínas da membrana externa, a superexpressão do sistema de efluxo ou até mesmo uma nova carbapemase ainda não identificada (LIU et al., 2013; AGHAZADEH et al., 2014).

O gene codificador de carbapemase VIM é geralmente encontrando em cassetes gênicos contidos na região variável de integron de classe 1, que podem ser carregados por plasmídeos, transposons ou contido em DNA cromossômico (POIREL et al., 2000, 2006; SANTOS et al., 2010; BELOTTI et al., 2015; PAUL et al., 2016). Nesse estudo, o isolado produtor de VIM apresentou amplificação correspondente ao integron de classe 1, entretanto, as amplificações referentes aos cassetes gênicos não foram obtidas.

Em conjunto, esses dados sugerem que pacientes de UTI expostos a diversos fatores de risco (procedimentos invasivos, permanência prolongada em ambiente hospitalar, etc), bem como a veiculação de organismos multirresistentes em ambiente hospitalar, tem contribuído para a aquisição de infecções nosocomiais por bactérias multirresistentes por esses pacientes, tal como infecções por *P. aeruginosa*, que apresenta uma grande diversidade de mecanismos de

resistência, conferidos pela alta capacidade desses micro-organismos em expressar resistência intrínseca ou até mesmo adquirirem genes transferíveis que codificam resistência. Tal panorama é ainda mais agravado devido ao emprego inadequado de antimicrobianos, culminando em pressão seletiva, a qual viabiliza bactérias resistentes. Sendo assim, a detecção dos mecanismos de resistência antimicrobiana, bem como a evidência dos perfis dos isolados presente em ambiente hospitalar é necessário para que sejam realizadas intervenções terapêuticas e processuais que reduzam ou até mesmo eliminem as infecções em ambiente hospitalar.

8. CONCLUSÃO

- Isolados de *P. aeruginosa* foram detectados em amostras de pacientes (68,7%), de profissionais (2,4%) e de estrutura (28,9%) de UTIs. Esses dados corroboram com o panorama epidemiológico mundial sobre a presença desses patógenos em ambiente hospitalar, e sugerem profissionais e estrutura hospitalar como potenciais reservatórios para agentes etiológicos de infecções nosocomiais.
- Foram detectados isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes (13,3%) e panresistentes (1,2%), evidenciando a problemática de disseminação de bactérias resistentes causadoras de graves infecções hospitalares.
- A disseminação de *P. aeruginosa* MDR/PDR esteve relacionada a dois grupos clonais, isolados de pacientes e de estruturas de hospitais distintos, indicando uma disseminação intra e interhospitalar.
- A presença de integrons de classe 1 (38,6%) foi o marcador genético de resistência comum a praticamente todas as classes de antimicrobianos testados, exceto aos monobactâmicos e as polimixinas.
- Os isolados produtores de integron de classe 2 não apresentaram correlação significativa com os perfis de resistência antimicrobiana.
- A maioria dos isolados positivos para integrons de classe 1 não carregavam cassetes gênicos ou apenas continham genes que codificam resistência a antimicrobianos pouco empregados no tratamento de infecções nosocomiais causadas por bactérias multirresistentes.
- A produção de OXA-50 por todas as cepas MDR/PDR contribuiu mais como um marcador filogenético adicional do que para a correlação com a resistência antimicrobiana.
- O gene *bla_{KPC-2}* foi encontrado principalmente nos isolados de *P. aeruginosa* MDR/PDR classificados em grupos clonais, evidenciando a capacidade de disseminação de genes de resistência intra e interespecíficos, bem como a correlação com resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, principalmente aos carbapenêmicos.
- O isolado Pa42, produtor de β -lactamase VIM apresentou correlação sugestiva de resistência não apenas aos β -lactâmicos, mas também às polimixinas.

Portanto, o isolamento de *P. aeruginosa* a partir dos hospitais estudados evidencia que esses patógenos, capazes de causar graves infecções nosocomiais, em especial, cepas MDR e PDR, estão se disseminando em ambiente hospitalar. Além disso, constata-se um arsenal de elementos genéticos como integrons, cassetes gênicos e genes codificadores de β -lactamases potencialmente capazes de conferir os fenótipos de resistência a esses isolados, o que justifica estudos futuros para avaliar se a estrutura genética descrita nesse estudo é autossuficiente ou se ainda existe a contribuição de outros mecanismos moleculares subjacentes à resistência antimicrobiana.

9. PERSPECTIVAS

Embora os isolados de *P. aeruginosa* estudados contenham elementos genéticos relacionados à resistência antimicrobiana, tais como integrons, cassetes gênicos e genes codificadores de β -lactamases, atribuir a esses elementos a resistência antimicrobiana pode ser um viés, tendo em vista que há também outros mecanismos que podem levar à resistência aos antimicrobianos, que não foram avaliadas neste estudo.

Sendo assim, pretende-se detectar outros mecanismos relacionados à resistência antimicrobiana, como superexpressão de bombas de efluxo e perda de porinas, para ampliar as correlações entre fenótipos e mecanismos moleculares de resistência.

A análise da estrutura genética dos integrons será realizada por sequenciamento, tendo em vista que a técnica de RFLP utilizadas neste estudo para confirmação desses elementos genéticos foi insuficiente.

Para um estudo mais detalhado dos cassetes gênicos e genes codificadores de β -lactamases detectados nesse estudo, um novo sequenciamento será realizado, o que possibilitará analisar mais detalhadamente os genes, ampliando as possibilidades de encontrar novas variantes ou até mesmo mutações nesses genes.

Observou-se que para uma correlação estatística significativa entre presença de genes codificadores β -lactamases e fenótipos de resistência, todas as cepas de *P. aeruginosa* isoladas nesse estudo deverão ser submetidas a pesquisa desses genes, e não apenas as MDR/PDR, como foi realizado.

Neste estudo havia sido considerado que apenas as MDR/PDR deveriam ser analisadas em relação a similaridade genética. Entretanto, como foi observado que isolados pertencentes ao mesmo grupo clonal demonstraram perfil de resistência distintos, serão analisadas todas as cepas de *P. aeruginosa* quanto ao perfil clonal, ampliando as possibilidades de evidenciar os grupos clonais presentes nos hospitais estudados.

Pretende-se com essas análises adicionais obter resultados mais detalhados referente aos fenótipos e mecanismos moleculares de resistência presente em *P. aeruginosa* isoladas nos hospitais de Manaus.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Unidade de Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Consenso sobre o uso racional de antimicrobianos. Brasília. 2001

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**. v.IV. 2004. 63p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf> Acessado dia 12 de dezembro de 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Investigação e Controle de bactérias multirresistentes. 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/reniss/manual%20_controle_bacterias.pdf. Acessado dia 02 de março de 2015

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). REDE NACIONAL DE MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA MICROBIANA EM SERVIÇOS DE SAÚDE - REDE RM. **Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM. Ano III – Edição nº 1, de 10 de julho de 2009**. Brasília: ANVISA, 10 jul. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm>. Acesso em: 12 fev. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Boletim Informativo. Segurança do Paciente e Qualidade Assistencial em Serviços de Saúde: Segurança do Paciente**. Brasília: ANVISA, jul. 2011a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f72c20804863a1d88cc88d2bd5b3ccf0/BOLETIM+I.PDF?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Boletim Informativo. Indicador Nacional das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde: Segurança do Paciente**. Brasília: ANVISA, jul. 2011b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1335a2004863a0b38cbf8d2bd5b3ccf0/BOLETIM+III.PDF?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde: Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2013a. v. 2

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final**. 2. ed. Brasília: ANVISA, 2013b. v. 4

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). REDE NACIONAL DE MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA MICROBIANA EM SERVIÇOS DE SAÚDE - REDE RM. **Resistência Microbiana em IPCSL relacionada a CVC em UTI (2012)**. Nota Técnica Ano IV nº 07 de Março de 2014a. Brasília: ANVISA, 15 mar. 2014. Disponível em: < <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/07-rede-nacional-de-monitoramento-da-resistencia-microbiana-em-servicos-de-saude-rede-rm-resistencia-microbiana-em-ipcs1-relacionada-a-cvc-em-uti-2012>>. Acesso em: 1 dez. 2015.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Boletim Informativo. Ano V nº 09 | Dezembro de 2014b. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM **Relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente, relacionadas ao uso de cateter venoso central, em unidades de terapia intensiva (2013)**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/272031/Boletim+Seguran%C3%A7a+do+Pacien+te+e+Qualidade+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde+n%C2%BA+09+de+dezembro+de+2014/9ae86439-0124-410c-b6a9-6c2b37988301>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 12 Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM**. Relatório de resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmado laboratorialmente associadas a cateter venoso central, em unidades de terapia intensiva (2014) Brasília: ANVISA, 13 dez 2015. Disponível em: < <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/12>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

AGHAZADEH, Mohammad et al. Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY (-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and burn patients. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 24, p. 187-192, 2014.

AGRESTI, Alan; FINLAY, Barbara. Métodos estatísticos para as ciências sociais. 4. ed. PORTO ALEGRE: PENSO, 2012. 664pg.

ALHAZMI, Alaa. *Pseudomonas aeruginosa*-Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. **International Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 44, 2015.

ALMEIDA, Anna CS et al. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2205-2206, 2012.

ALMEIDA, Anna CS et al. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 4077-4078, 2013.

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

ANDRADE, Leonardo Neves et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579-3583, 2011.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, jul.' 2001.

BELOTTI, P. T. et al. Description of an original integron encompassing *bla_{VIM-2}*, *qnrVC1* and genes encoding bacterial group II intron proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkv103, 2015.

BERRAZEG, M. et al. Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6248-6255, 2015.

BIEDENBACH, Douglas J. et al. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2004). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 54, n. 1, p. 13-21, 2006.

BLAIR, Jessica MA et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BLAKE, Katy L.; O'NEILL, Alex J. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 12-16, 2013.

BLONDEL-HILL. E.; HENRY, D.A; SPEERT, D.P. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 99th ed. Washington: ASM Press, 2007, cap.48, p.734-748.

BOLFARINE, H.; BUSSAB, W. D. O. **Elementos de amostragem**. 1. ed. SÃO PAULO: EDGARD BLUCHER, ABE, 2005. 269pg.

BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement 2, p. S49–S56, 1 set. 2006.

BRAYKOV, Nikolay P. et al. Assessment of empirical antibiotic therapy optimisation in six hospitals: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1220-1227, 2014.

BUSH, Karen; JACOBY, George A.; MEDEIROS, Antone A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

CARVALHO-ASSEF, Ana Paula D.'Alincourt et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 68, n. 3, p. 337-338, 2010.

CASTANHEIRA, Mariana et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla_{GIM-1}*, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4654-4661, 2004.

CASTANHEIRA, Mariana. Increasing prevalence of KPC-producers as an emerging resistance mechanism among carbapenem non-susceptible isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. In: **46th Annual Meeting**. Idsa, 2008

CASTANHEIRA, Mariana et al. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo- β -lactamase clones (VIM-2,-5,-6, and-11 and the newly characterized VIM-18). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1225-1227, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2014 National and State Healthcare-Associated Infections Progress Report. Published March, 2016. Available at www.cdc.gov/hai/progress-report/index.html.

CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS & POLICY (CDDEP). Centre for Reference Research on *Salmonella*, Institut. State of the World's Antibiotics. M100-S16, v. 26, n. 6, 2009. CDDEP: Washington, D.C, 2015.

CEZÁRIO, R. C. et al. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 5, p. 269–274, Maio 2009.

CHANDLER, M. Molecular biology: Singled out for integration. **Nature**, v. 440, n. 7088, p. 1121–1122, Abril 2006.

CHEN, Jianguo et al. Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 717-721, 2009.

CHENIA, Hafizah Y.; PILLAY, Balakrishna; PILLAY, Dorsamy. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 1274-1278, 2006.

CLÍMACO, Eduardo Carneiro. **Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter ssp.*** Riberão Preto: USP. 2011. Tese (Doutorado em Biociência aplicada à Farmácia); Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto/USP. 2011.

CLÍMACO, Eduardo Carneiro et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 127-133, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: CLSI; 2015

CLOECKAERT, Axel. ramR mutations affecting fluoroquinolone susceptibility in epidemic multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 213, 2013.

CNESNet-DATASUS. Cadastro Nacional de Sistema de Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto. Disponível em: http://cnes.datasus.gov.br/Exibe_Ficha_Estabelecimento.asp?VCo_Unidade=1302602013649. Acesso: 22 ago. 2014.

CNESNet-DATASUS. Cadastro Nacional de Sistema de Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Hospital Universitário Francisca Mendes. Disponível em: http://cnes.datasus.gov.br/Exibe_Ficha_Estabelecimento.asp?VCo_Unidade=1302602018403

CNESNet-DATASUS. Cadastro Nacional de Sistema de Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Hospital e Pronto Socorro Dr João Lúcio Pereira Machado. Disponível em: http://cnes.datasus.gov.br/Exibe_Ficha_Estabelecimento.asp?VCo_Unidade=1302602019574

COHEN, Adam L. et al. Recommendations for metrics for multidrug-resistant organisms in healthcare settings: SHEA/HICPAC Position paper. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 10, p. 901-913, 2008.

COLE, Justin M. et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 2, p. 322-326, 2009.

CORNAGLIA, Giuseppe; GIAMARELLOU, Helen; ROSSOLINI, Gian Maria. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 381-393, 2011.

CUI, Xianyan et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Shigella flexneri* serotype 2 variant in China. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 435-435, 2014.

CUZON, Gaëlle et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 9, p. 1349-56, 2010.

CUZON, Gaëlle et al. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene in Colombia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5350-5353, 2011.

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

DEL PELOSO, Pedro Fernandez; BARROS, Matheus Felipe Leal de; SANTOS, Fernanda Abreu dos. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 5, p. 365-367, 2010.

DENG, Yang et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 1, 2015.

DOLEJSKA, Monika et al. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance–nodulation–cell division/multidrug efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dks357, 2012.

DRAWZ, Sarah M.; BONOMO, Robert A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

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

DULJASZ, Wojciech et al. First organisms with acquired metallo- β -lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2221-2222, 2009.

EDELSTEIN, Mikhail V. et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 10, p. 867-876, 2013.

EL GARCH, Farid et al. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4828-4833, 2011.

EL SALABI, A. et al. Novel subclass of a group B1 metallo- β -lactamase, TMB-1, in clinical and non-clinical Gram-negative bacteria from Libya. In: **49th Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**. San Francisco, CA, USA. 2009.

EL SALABI, Allaaeddin et al. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 582-582, 2010.

EL SALABI, Allaaeddin et al. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2241-2245, 2012.

ENDIMIANI, Andrea et al. Enhancing resistance to cephalosporins in class C β -lactamases: impact of Gly214Glu in CMY-2. **Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1014-1023, 2010.

EVANS, Benjamin A.; AMYES, Sebastian GB. OXA β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 2, p. 241-263, 2014.

FALAGAS, M. E.; KOLETISI, P. K.; BLIZIOTIS, I. A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1619–1629, 1 dez. 2006.

FALAGAS, Matthew E.; KARAGEORGOPOULOS, Drosos E. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 7, p. 1121-1122, 2008a.

FALAGAS, Matthew E.; GRAMMATIKOS, Alexandros P.; MICHALOPOULOS, Argyris. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 6, n. 5, p. 593-600, 2008b.

FARSHAD, SHOHREH; JAPONI, A. Z. I. Z.; HOSSEINI, MARZIEH. Low distribution of integrons among multidrug resistant *E. coli* strains isolated from children with community-acquired urinary tract infections in Shiraz. **Iran. Pol j microbiol**, v. 57, n. 3, p. 193-198, 2008.

FERNÁNDEZ, Lucía et al. Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3372-3382, 2010.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F.-J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 4, p. 272–288, Abril 2004.

FONSECA, É. L. et al. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 303–309, 1 jun. 2005.

FRASSON, Ilaria et al. Rapid detection of bla VIM-1–37 and bla KPC1/2–12 alleles from clinical samples by multiplex PCR-based assays. **International journal of antimicrobial agents**, v. 42, n. 1, p. 68-71, 2013.

GALES, A. C. et al. Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 3, p. 289–299, nov. 2002.

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 699–702, 1 out. 2003.

GARRITY, George M.; BELL, Julia A.; LILBURN, Timothy G. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. **Springer, New York, Berlin, Heidelberg**, 2004.

GELLATLY, Shaan L.; HANCOCK, Robert EW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GERMAN, G. J. et al. Interim recommendations for the reporting of extensively drug resistant and pan-drug resistant isolates of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Stenotrophomonas maltophilia*. **Canada Communicable Disease Report**, v. 42, n. 4, p. 91, 2016.

GIN, Alfred et al. Piperacillin–tazobactam: a β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 5, n. 3, p. 365-383, 2007.

GIRLICH, Delphine et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 1, p. 175-182, 2001.

GIRLICH, D. et al. Nosocomial Spread of the Integron-Located veb-1—Like Cassette Encoding an Extended-Spectrum β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 603–611, 1 mar. 2002.

GIRLICH, Delphine; NAAS, Thierry; NORDMANN, Patrice. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2043-2048, 2004.

GU, B. et al. Prevalence and Characterization of Class I Integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolates from Patients in Nanjing, China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 241–243, 1 jan. 2007.

GUIMARÃES, Aline Caixeta et al. Mortality associated with nosocomial infection, occurring in a general hospital of Sumaré-SP, Brazil. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 64, n. 5, p. 864-869, 2011.

HERMANN, T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cellular and molecular life sciences*, v. 64, n. 14, p. 1841-1852, 2007.

HIDRON, Alicia I. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008.

HILARIO, Elena; BUCKLEY, Thomas R.; YOUNG, John M. Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of atpD, carA, recA and 16S rDNA. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 51-64, 2004.

HONG, Duck Jin et al. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection & chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 81-97, 2015.

HSIAO, Ke-Yu; LEE, Mei-Feng; PENG, Chien-Fang. Detection and characterization of class 1 integron-associated gene cassettes from *Pseudomonas aeruginosa* isolates in southern Taiwan. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 6, n. 2, p. 74-78, 2014.

JACOBY, G.; BUSH, K. β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. 2014. Disponível em: <http://www.lahey.org/Studies/>. Acessado dia 13 de janeiro de 2016.

JEANNOT, Katy et al. Clonal Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamase SHV-2a. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 2, p. 673-675, 2013.

JEON, Jeong Ho et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 9654-9692, 2015.

JINGYUAN, Z. H. U. et al. Multi-drug resistance and characteristic of integrons in *Shigella* spp. isolated from China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 24, n. 1, p. 56-61, 2011.

JONES, Louisa A. et al. The aadB gene cassette is associated with blaSHV genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 794-797, 2005.

KHALIFA, A. B. H. et al. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. **Annales De Biologie Clinique**, v. 69, n. 4, p. 393–403, ago. 2011.

KHATTAB, Mona A.; NOUR, Mona S.; ELSHESHTAWY, Nadia M. Genetic Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes among Different Isolates. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 2015, 2015.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, n. 2, p. 301–307, 1 ago. 1954.

KITCHEL, Brandon et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3365-3370, 2009.

KOELEMAN, Johannes GM et al. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 1, p. 8-13, 2001.

KONG, Kok-Fai et al. Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. **Gene**, v. 358, p. 82-92, 2005.

KOR, Sue-Bee; CHOO, Quok-Cheong; CHEW, Choy-Hoong. New integron gene arrays from multiresistant clinical isolates of members of the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from hospitals in Malaysia. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 3, p. 412-420, 2013.

LAUPLAND, Kevin B. et al. Population-Based Epidemiological Study of Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Importance of Metallo- β -Lactamase (MBL)-Producing Strains. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 9, p. 1606-1612, 2005.

LAURETTI, Laura et al. Cloning and characterization of *bla* VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LIM, King Ting et al. Characterization of multidrug-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Malaysian hospitals. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1463-1469, 2009.

LIU, Yang et al. Efflux system overexpression and decreased *OprD* contribute to the carbapenem resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Chinese university hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 6, p. 463-468, 2013.

LUCE, Edward. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 125, n. 1, p. 414-415, 2010.

LAURETTI, Laura et al. Cloning and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999

LEE, Kyungwon et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485-4491, 2005.

LEE, Jung Hun; LEE, Sang Hee. Carbapenem resistance in gram-negative pathogens: Emerging non-metallo-carbapenemases. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 607-628, 2010.

LEVIN, A. S. et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 28, n. 5, p. 1008–1011, maio 1999.

LI, X.-Z.; NIKAIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. **Drugs**, v. 69, n. 12, p. 1555–1623, 20 ago. 2009.

LIM, Lauren M. et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 30, n. 12, p. 1279-1291, 2010.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413–420, Setembro 2006.

LOLANS, K. et al. First nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo- β -lactamase (VIM-2) in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3538-3540, 2005.

MACGOWAN, Alasdair P. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. suppl 2, p. ii105-ii114, 2008.

MAGALHÃES, MJTL. **Caracterização fenotípica e similaridade genética de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de efluentes hospitalares e água superficial do**

igarapé do Mindu/Manaus – AM. 2013. 76p. Dissertação de Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia apresentada a Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MAMMERRI, Hedi et al. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4556-4560, 2010.

MANIATI, M. et al. A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel *bla_{VIM-4}/bla_{PIb}* integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 132–135, 1 jul. 2007.

MARRA, Alexandre R. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.

MARSCHALL, Jonas et al. Strategies to prevent central line-associated bloodstream infections in acute care hospitals: 2014 update. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. S2, p. S89-S107, 2014.

MARTINEZ-FREIJO, P. et al. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 689-696, 1998.

MARTINS, A. F. et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in hospitals from southern Brazil. **Infection**, v. 35, n. 6, p. 457-460, 2007.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 608–620, Agosto 2006.

MENDES, Rodrigo Elisandro et al. Metallo-beta-lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MCNEIL, S. A. et al. Outbreak of Sternal Surgical Site Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa* Traced to a Scrub Nurse with Onychomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 317–323, 1 ago. 2001.

MICEK, Scott T. et al. An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 1, 2015.

MIGULA, N. Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe. v. 1, p. 235–238, 1894.

MILLER, Amanda K. et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5761-5769, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Lei nº 9.431 de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. 6 jan. 1997, Sec. 1, p. 265.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Portaria GM/MS 2.616 de 12/5/1998**, 5 dez. 1998L. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html>. Acesso em: 22 jul. 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Uso racional de medicamentos: temas selecionados / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

MONTEIRO, Jussimara et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

MOOLENAAR, R. L. et al. A Prolonged Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a Neonatal Intensive Care Unit Did Staff Fingernails Play a Role in Disease Transmission? **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 02, p. 80–85, Fevereiro 2000.

MUGNIER, P. et al. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2488-2493, 1996.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Medical microbiology**. Elsevier Health Sciences, 2015.

NAAS, Thierry; NORDMANN, Patrice. OXA-Type p-Lactamases. **Current pharmaceutical design**, v. 5, n. 11, p. 865-879, 1999.

NAAS, Thierry; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Molecular characterisation of In51, a class 1 integron containing a novel aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette, aadA6, in *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1489, n. 2, p. 445-451, 1999.

NAAS, Thierry et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla_{KPC}* gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008.

NEVES, P. R. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, ago. 2011.

NÓBREGA, M.S.; DO CARMO FILHO, José Rodrigues; PEREIRA, Milca Severino. Evolução da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 15, n. 3, p. 694-701, 2013.

NORDMANN, P. et al. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 962-969, 1993.

NORDMANN, Patrice; CUZON, Gaelle; NAAS, Thierry. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.

NORDMANN, Patrice. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla_{KPC}* gene mobilization. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5370-5373, 2011.

ODUMOSU, Bamidele T.; ADENIYI, Bolanle A.; CHANDRA, Ram. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

OHARA, M. et al. Molecular Characterization of Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 3, p. 271–277, 1 mar. 2007.

OTSUKI, Koko; GUAYCURÚS, Thania V.; VICENTE, Ana Carolina P. *Bacillus sphaericus* entomocidal potential determined by polymerase chain reaction. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, p. 107-108, 1997.

PAGANO, Marcello; GAUVREAU, Kimberlee. Princípios de bioestatística. Thomson Learning, 2004.

PALLERONI, N. J. et al. Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, n. 4, p. 333–339, 1 out. 1973.

PALLERONI, N. J. *Pseudomonas* classification. v. 64, n. 3-4, p. 231–251, 9 set. 1993.

PALLERONI, Norberto J. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. **Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology**, p. 1-18, 2008.

PALLERONI, Norberto J. The *Pseudomonas* story. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1377-1383, 2010.

PAPAGIANNITSIS, Costas C. et al. Biochemical Characterization of VIM-39, a VIM-1-Like Metallo- β -Lactamase Variant from a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Greece. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7811-7814, 2015.

PARTRIDGE, Sally R. et al. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 4, p. 757-784, 2009.

PATERSON, David L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. Supplement 2, p. S43-S48, 2006.

PAUL, Deepjyoti et al. Occurrence of co-existing *bla*_{VIM-2} and *bla*_{NDM-1} in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.

PEIX, Alvaro; RAMÍREZ-BAHENA, Martha-Helena; VELÁZQUEZ, Encarna. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1132-1147, 2009.

PEREIRA, Andrea S. et al. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 40-43, 2007.

PEREIRA, Polyana Silva et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312-316, 2013.

PÉREZ-PÉREZ, F. Javier; HANSON, Nancy D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153-2162, 2002.

PEYMANI, Amir et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-1} in Qazvin and Alborz educational hospitals, **Iran. Iranian journal of microbiology**, v. 7, n. 6, p. 302, 2015.

PICÃO, Renata Cristina; GALES, Ana Cristina. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação?. **Prática Hospitalar**, n. 49, p. 79-84, 2007.

POIREL, Laurent et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid-and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 891-897, 2000.

POIREL, Laurent et al. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3743-3748, 2005.

POIREL, Laurent et al. Class II transposon-borne structure harboring metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas putida*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2889-2891, 2006.

POIREL, L. et al. Characterization of *bla*_{DIM-1}, a novel integron-located metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. In: **19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Helsinki, Finland**. 2009.

POTRON, Anaïs; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015.

PRICKETT, Michelle H. et al. Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis results from convergent evolution in the *mexZ* gene. **Thorax**, p. thoraxjnl-2015-208027, 2016.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 1 jul. 2007.

REDGRAVE, Liam S. et al. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in microbiology*, v. 22, n. 8, p. 438-445, 2014.

REEVES, Analise Z. et al. Aminoglycoside cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* due to mutations in the 5' untranslated region of *whiB7*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1857-1865, 2013.

RIZEK, Camila et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

ROBLEDO, Iraida E. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, 2010.

ROE, Matthew T.; VEGA, Everardo; PILLAI, Suresh D. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 7, p. 822-826, 2003.

ROMANOWSKA, Julia; REUTER, Nathalie; TRYLSKA, Joanna. Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 81, n. 1, p. 63-80, 2013.

SADER, H. S. et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect*, v. 11, n. 1, p. 73-6, 2005.

SANSCHAGRIN, Sylvie; YERGEAU, Etienne. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 90, p. e51709-e51709, 2014.

SANTOS, C. et al. Tn5090-like class 1 integron carrying *blaVIM-2* in a *Pseudomonas putida* strain from Portugal. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 10, p. 1558-1561, 2010.

SAUVAGE, Eric et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 234-258, 2008.

SCHEFFER, M. C. et al. Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 367–371, ago. 2010a.

SCHEFFER, Mara Cristina et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 508-509, 2010b.

SEKIGUCHI, Jun-ichiro et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194-4197, 2008.

SHAHCHERAGHI, Fereshteh; BADMASTI, Farzad; FEIZABADI, Mohammad M. Molecular characterization of class 1 integrons in MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical settings in Iran, Tehran. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 421-425, 2010.

SHARMA, Anukriti et al. Pan-genome dynamics of *Pseudomonas* gene complements enriched across hexachlorocyclohexane dumpsite. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.

SHEIKH, Ahmad Farajzadeh et al. Detection of metallo-beta lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 7, n. 11, 2014.

SILVA, C. H. P. D. M. **Bacteriologia: Um texto ilustrado**. 1. ed. Teresópolis: Eventos, 1999.

SILVA, N. D.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SOW, Amy Gassama et al. High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 04, p. 207-212, 2010.

SPIPKER, T. et al. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2074–2079, maio 2004.

STOVER, C. K[†] et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959-964, 2000.

SUÁREZ, Cristina; GUDIOL, Francesc. [Beta-lactam antibiotics]. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SUNG, Ji Youn et al. Epidemiological characterizations of class 1 integrons from multidrug-resistant *Acinetobacter* isolates in Daejeon, Korea. **Annals of laboratory medicine**, v. 34, n. 4, p. 293-299, 2014.

TAM, Vincent H. et al. Outcomes of bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to piperacillin-tazobactam: implications on the appropriateness of the resistance breakpoint. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 6, p. 862-867, 2008.

TÄNGDÉN, Thomas et al. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkt044, 2013.

TOVAL, Francisco et al. Predominance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying *bla_{IMP}* and *bla_{VIM}* metallo- β -lactamases in a major hospital in Costa Rica. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 1, p. 37-43, 2015.

TAVARES, Carolina Padilha et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 82, n. 4, p. 326-330, 2015.

TAYEB, Lyneda Ait et al. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5, p. 763-773, 2005.

TAYEB, Lineda Ait et al. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. **Research in microbiology**, v. 159, n. 3, p. 169-177, 2008.

TEIXEIRA, Bertinellys et al. Aminoglycoside resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cumana, venezuela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

TESS, B. H. et al. Incidence of hospital-acquired infection and length of hospital stay. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 81-86, 1 fev. 1993.

THOMSON, Kenneth S. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

TOLEMAN, Mark A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TOLEMAN, Mark A. et al. blaVIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2636-2638, 2007.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. . 4. ed. Atheneu, 2004.

VALLET, I. **Formation de biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa*: mise en évidence de nouveaux gènes impliqués dans le processus d'adhérence**. Thèse de doctorat—Paris: Université Pierre et Marie Curie, 2003.

VAZIRI, Farzam et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2'')-I, aph (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinics**, v. 66, n. 9, p. 1519-1522, 2011.

VILLEGAS, Maria Virginia et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, 2007.

VINCENT, J.-L. et al. Reducing mortality in sepsis: new directions. **Critical Care (London, England)**, v. 6 Suppl 3, p. S1–18, dez. 2002.

VINCENT, Jean-Louis et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Jama**, v. 302, n. 21, p. 2323-2329, 2009.

VOETS, Guido M. et al. Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 3, p. 359-362, 2013.

VOS, Paul et al. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. Springer Science & Business Media, 2011.

WACHINO, Jun-ichi et al. SMB-1, a novel subclass B3 metallo- β -lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5143-5149, 2011.

WAKSMAN, Selman Abraham et al. Isolation of Antibiotic Substances from Soil Micro-Organisms, with special reference to Streptothricin and Streptomycin. In: **Proceedings of Staff Meetings of the Mayo Clinic**. 1944. p. 537-48.

WALTHER-RASMUSSEN, Jan; HØIBY, Niels. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373-383, 2006.

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147-151, 1991.

WENDLANDT, Sarah et al. Identification of the novel spectinomycin resistance gene *spd* in a different plasmid background among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and methicillin-susceptible *S. aureus* ST433. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dku067, 2014.

WHITE, Peter A. et al. Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, n. 2, p. 265-269, 2000.

WHITE, Peter A.; MCIVER, Christopher J.; RAWLINSON, William D. Integrons and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2658-2661, 2001.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, v. 12, p. S3-S7, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Summary of the evidence on patient safety : implications for research** Ashish Jha, , 2008a. Disponível em: <http://www.who.int/patientsafety/information_centre/20080523_Summary_of_the_evidence_on_patient_safety.pdf>. Acesso em: 3 fev. 2015

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Nota informativa: Aliança mundial pela segurança dos pacientes: o primeiro desafio global da segurança dos pacientes. Cuidado limpo é cuidado mais seguro**. Yaoundé, Camarões: WHO, 9 mar. 2008b. Disponível em: <http://www.who.int/gpsc/events/2008/Briefing_Note_AFRO_POR.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. 2011. Disponível em:
http://www.who.int/gpsc/country_work/summary_20100430_en.pdf

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action**. 1. ed. WHO, 2012. v. 1. Disponível em:
http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf?ua=1. Acesso em: 22 ago. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Health care-associated infections fact sheet. **WHO** [http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf], p. c2013, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO (WHO). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014**, abr. 2014. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2014

WRIGHT, Gerard D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, n. 14, p. 4055-4061, 2011.

WOESE, Carl R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221, 1987.
XAVIER, D. E. et al. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 217, 12 ago. 2010.

XIA, Ruirui et al. qnrVC-like gene located in a novel complex class 1 integron harboring the ISCR1 element in an *Aeromonas punctata* strain from an aquatic environment in Shandong Province, China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3471-3474, 2010.

XU, Zhenbo et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Southern China. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 1, p. 230-234, 2009.

XU, Zhenbo et al. Class 1 integron in staphylococci. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 8, p. 5261-5279, 2011a.

XU, Zhenbo. et al. Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001–2006. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 5, p. 714-718, 2011b.

YAMAMOTO, Satoshi; HARAYAMA, Shigeaki. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of gyrB, rpoD and 16S rRNA genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 813-819, 1998.

YAMANE, K. et al. 16S rDNA Methylase-producing, Gram-Negative Pathogens, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 642-646, abr. 2007.

YAN, Jing-Jou; KO, Wen-Chien; WU, Jiunn-Jong. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2368-2371, 2001.

YANG, Bo; WANG, Yong; QIAN, Pei-Yuan. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 1, 2016.

YANG, Youjun et al. Kinetic properties and metal content of the metallo- β -lactamase CcrA harboring selective amino acid substitutions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 22, p. 15706-15711, 1999.

YAYAN, Josef; GHEBREMEDHIN, Beniam; RASCHE, Kurt. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-Year period. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0139836, 2015

YONG, D. et al. A novel subgroup Metallo- β -lactamase (MBL) AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. In: **47th Interscience Conference on AAC, Chicago, IL, Abstract C1-593. American Society for Microbiology. Washington, DC, USA. 2007.**

YONG, Dongeun et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

YU, Hak Sun et al. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5429-5433, 2003.

YU, Yun-Song et al. Integrons containing the VIM-2 metallo- β -lactamase gene among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from different Chinese hospitals. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4242-4245, 2006.

ZAFER, Mai Mahmoud et al. Dissemination of VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* ST233 at tertiary care hospitals in Egypt. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015.

ZAMORANO, Laura et al. VIM-47, a new variant of the autochthonous metallo- β -lactamase VIM-13 from the Balearic Islands in Spain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 03081-15, 2016.

ZAVASCKI, Alexandre P. et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International journal of antimicrobial agents**, v. 34, n. 3, p. 286-288, 2009.

ZHAO, Shaohua et al. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1558-1564, 2001.

ZHAO, Wei-Hua et al. Relevance of resistance levels to carbapenems and integron-borne *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-7}, *bla*_{IMP-10} and *bla*_{VIM-2} in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 8, p. 1080-1085, 2009.

11. ANEXOS

Anexo 1 - Análise e comparação das sequências do gene 16s rRNA dos isolados estudados com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI.

Gene	Isolados (n)	Max score	Gene	Query Cover	E value	Ident.	Gaps	Accession
16S	83 isolados (contig)	2004	2004	99%	0.0	1087/1089 (99%)	0/1089 (0%)	KC999061.1

Legenda: Os 83 isolados identificados fenotipicamente como *P. aeruginosa* foram submetidos a detecção e sequenciamento do gene 16s rRNA. As sequências geradas formaram um *contig*, que foi comparada as sequências depositadas no banco de dados da NCBI (BLAST); “**Max Score**” (pontuação máxima) e “**Total Score**” (Contagem Total) valores iguais indicam que apenas um único alinhamento está presente; “**Query Coverage**” (“Cobertura da Pergunta ou Questão”): Porcentagem de alinhamento das sequências submetidas com as depositadas, ou se seja, dos 1089 nucleotídeos submetidos ao alinhamento, 1087 foram alinhadas à sequência disponível no banco de dados; “**E value**” (valor E ou valor esperado): representa o número de visitas que se espera achar por acaso dada a qualidade do alinhamento e do tamanho do banco de dados. Um número próximo de zero significa que o alinhamento é significativo e não devido ao acaso; **Ident (identidade máxima)**: percentagem de identidade entre a consulta e a sequência disponível no banco de dados num alinhamento de nucleotídeos-para-nucleotídeos; “**Gaps**” (intervalos): um “Gap” (-) é inserido quando há bases extras, ou seja, se a consulta tiver uma base extra, um intervalo (-) é inserido na sequência de referência a esta posição. **Accession** (acesso): Número de acesso da sequência referência no banco de dados da NCBI; Descrição da sequência referência: *Pseudomonas aeruginosa* strain TP6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Anexo 2 - Sequência contig dos 83 isolados submetidos a amplificação e sequenciamento do gene 16s rRNA.

>Contig_1|Genes 16S_83 isolados

```
TCATAGaGTGCCACCCSAGGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACC
CAHCATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCA
ATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
AAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA
CTCCAGGCGGTGCGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTC
GACATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCT
CAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTCA
CCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTTCC
CAGGTTGAGCCCCGGGGATTTACATCCAACCTTGTGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTA
ATTCCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTT
ATTCTGTTGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTG
CTTTACAATCCGAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCA
AATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCA
TCTCTCAGACAGTTACCGATCGTCGCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCGAC
CTAGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCCACTTTCTCCCTCAGGACGTATGCG
GTTATTAGCGCCCCTTCCGGACGTTATCCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTACCC
GTCGCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTTCATCCGCTCGACTtGCAC
```

Anexo 3 – Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* estudados.

CEPA	HOSPITAL	FONTE	AMOSTRA	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA													FENÓTIPO
				AMINOGLIC.			PEN.	CEFALOSP.		CARBAP.		MON	FLUOROQUIN.			POL	
				GEN	AMI	TOB	PIT	CPM.	CAZ	IMP	MPM	ATM	LEV	NOR	CIP	POB	
Pa02	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa05	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa08	HPS28	PACIENTE	AXILA	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa10	HPS28	PACIENTE	TRAQUEOSTOMIA	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa12	HPS28	PACIENTE	URINA	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	MDR
Pa17	HPS28	ESTRUTURA	COLCHÃO	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	I	S	MDR
Pa20	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	I	S	S	MDR
Pa21	HPS28	PACIENTE	AXILA	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa22	HPS28	PACIENTE	AXILA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa23	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa24	HPS28	PACIENTE	LEITO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa30	HPS28	ESTRUTURA	PRONTUARIO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa31	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa32	HPS28	ESTRUTURA	PORTA	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	n-MDR
Pa33	HPS28	PACIENTE	CANULA	R	S	R	R	R	R	I	R	S	R	R	I	S	MDR
Pa36	HPS28	PACIENTE	CANULA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PDR
Pa37	HPS28	PACIENTE	LEITO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa39	HPSJL	PACIENTE	URINA	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	MDR
Pa40	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa41	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa42	HPS28	PACIENTE	LEITO	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	MDR

Legenda: **HPS28:** Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto; **HPSJL:** Hospital e Pronto Socorro João Lúcio; **HUFM:** Hospital Universitário Francisca Mendes. Fonte de isolamento (**Paciente**, profissional, estrutura hospitalar); Tipo de amostras fonte de isolamento; Antimicrobianos testados: Aminoglicosídeos (**GEN:** Gentamicina; **AMI:** Amicacina; **TOB:** Tobramicina); Penicilinas (**PIT:** Piperacilina/tazobactam); Cefalosporinas (CPM: Cefepime; CAZ: Ceftazidima); Carbapenêmicos (**IMP:** Imipeném; **MPM:** Meropeném); Monobactâmicos (**ATM:** Aztreonam); Fluoroquinolonas (**NOR:** Norfloxacin; **LEV:** Levofloxacin; **CIP:** Ciprofloxacina); Polimixinas (**POB:** Polimixina B); **S:** Sensível; **I:** Sensibilidade intermediária; **R:** Resistente; **n-MDR:** não Multirresistente **MDR:** Multirresistentes; **PDR:** Panresistente; Em **NEGRITO** cepas MDR/PDR.

Anexo 3 – Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* estudados (continuação).

CEPA	HOSPITAL	FONTE	AMOSTRA	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA													FENÓTIPO	
				AMINOGLIC.			PEN.	CEFALOSP.		CARBAP.		MON	FLUOROQUIN.			POL		
				GEN	AMI	TOB	PIT	CPM.	CAZ	IMP	MPM	ATM	LEV	NOR	CIP	POB		
Pa43	HPS28	PROFISSIONAL	UNHA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	n-MDR
Pa45	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa48	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa50	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	MDR
Pa51	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa52	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	n-MDR
Pa53	HPSJL	PACIENTE	AXILA	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa54	HPSJL	PACIENTE	LEITO	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa55	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa56	HPSJL	PACIENTE	LEITO	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa57	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa58	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa59	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa60	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa61	HPS28	PROFISSIONAL	UNHA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa62	HPSJL	ESTRUTURA	PIA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa63	HPSJL	ESTRUTURA	PIA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa64	HUFM	PACIENTE	TRAQUEOSTOMIA	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa65	HUFM	PACIENTE	TRAQUEOSTOMIA	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa66	HUFM	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa67	HUFM	PACIENTE	LEITO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa68	HUFM	PACIENTE	TRAQUEOSTOMIA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa70	HUFM	PACIENTE	AXILA	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	MDR

Legenda: **HPS28:** Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto; **HPSJL:** Hospital e Pronto Socorro João Lúcio; **HUFM:** Hospital Universitário Francisca Mendes. Fonte de isolamento (**Paciente**, profissional, estrutura hospitalar); Tipo de amostras fonte de isolamento; Antimicrobianos testados: Aminoglicosídeos (**GEN:** Gentamicina; **AMI:** Amicacina; **TOB:** Tobramicina); Penicilinas (**PIT:** Piperacilina/tazobactam); Cefalosporinas (CPM: Cefepime; CAZ: Ceftazidima); Carbapenêmicos (**IMP:** Imipeném; **MPM:** Meropeném); Monobactâmicos (**ATM:** Aztreonam); Fluoroquinolonas (**NOR:** Norfloxacin; **LEV:** Levofloxacin; **CIP:** Ciprofloxacina); Polimixinas (**POB:** Polimixina B); **S:** Sensível; **I:** Sensibilidade intermediária; **R:** Resistente; **n-MDR:** não Multirresistente **MDR:** Multirresistentes; **PDR:** Panresistente; Em **NEGRITO** cepas MDR/PDR.

Anexo 3 – Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* estudados (continuação).

CEPA	HOSPITAL	FONTE	AMOSTRA	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA													FENÓTIPO	
				AMINOGLIC.		PEN.	CEFALOSP.	CARBAP.	MON	FLUOROQUIN.		POL						
				GEN	AMI	TOB	PIT	CPM.	CAZ	IMP	MPM	ATM	LEV	NOR	CIP	POB		
Pa71	HUFM	PACIENTE	TRAQUEOSTOMIA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	n-MDR
Pa72	HUFM	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa73	HUFM	PACIENTE	AXILA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa74	HUFM	PACIENTE	LEITO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa75	HUFM	PACIENTE	URINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa76	HUFM	PACIENTE	AXILA	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa77	HUFM	PACIENTE	LEITO	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa78	HUFM	PACIENTE	AXILA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa79	HUFM	ESTRUTURA	PORTA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa80	HUFM	ESTRUTURA	CHÃO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa81	HUFM	ESTRUTURA	PIA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa82	HUFM	ESTRUTURA	PORTA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa83	HUFM	ESTRUTURA	PIA	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa84	HUFM	ESTRUTURA	TORNEIRA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa85	HUFM	ESTRUTURA	PORTA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa86	HUFM	ESTRUTURA	CHÃO	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa87	HUFM	PROFISSIONAL	NARIZ	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa88	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa89	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa90	HPS28	PACIENTE	AXILA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa92	HUFM	PACIENTE	SANGUE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR

Legenda: **HPS28:** Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto; **HPSJL:** Hospital e Pronto Socorro João Lúcio; **HUFM:** Hospital Universitário Francisca Mendes. Fonte de isolamento (**Paciente**, profissional, estrutura hospitalar); Tipo de amostras fonte de isolamento; Antimicrobianos testados: Aminoglicosídeos (**GEN:** Gentamicina; **AMI:** Amicacina; **TOB:** Tobramicina); Penicilinas (**PIT:** Piperacilina/tazobactam); Cefalosporinas (**CPM:** Cefepime; **CAZ:** Ceftazidima); Carbapenêmicos (**IMP:** Imipeném; **MPM:** Meropeném); Monobactâmicos (**ATM:** Aztreonam); Fluoroquinolonas (**NOR:** Norfloxacin; **LEV:** Levofloxacin; **CIP:** Ciprofloxacina); Polimixinas (**POB:** Polimixina B); **S:** Sensível; **I:** Sensibilidade intermediária; **R:** Resistente; **n-MDR:** não Multirresistente **MDR:** Multirresistentes; **PDR:** Panresistente; Em **NEGRITO** cepas MDR/PDR.

Anexo 3 – Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* estudados (continuação).

CEPA	HOSPITAL	FONTE	AMOSTRA	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA													FENÓTIPO	
				AMINOGLIC.			PEN.	CEFALOSP.	CARBAP.		MON	FLUOROQUIN.		POL				
				GEN	AMI	TOB	PIT	CPM.	CAZ	IMP	MPM	ATM	LEV	NOR	CIP	POB		
Pa93	HUFM	PACIENTE	SANGUE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa94	HUFM	PACIENTE	SANGUE	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa95	HPSJL	PACIENTE	LEITO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa96	HPSJL	PACIENTE	TRAQUEOSTOMIA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa97	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa98	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa99	HPSJL	PACIENTE	TRAQUEOSTOMIA	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa100	HPSJL	PACIENTE	URINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa101	HPSJL	PACIENTE	CANULA	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	MDR
Pa102	HPSJL	ESTRUTURA	TORNEIRA	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	n-MDR
Pa103	HUFM	PACIENTE	SANGUE	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa104	HUFM	PACIENTE	SANGUE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa105	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa106	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	n-MDR
Pa107	HPS28	PACIENTE	AXILA	S	S	R	S	I	S	S	R	I	R	R	R	R	R	MDR
Pa109	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	n-MDR
Pa110	HPS28	PACIENTE	AXILA	S	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S	S	MDR
Pa111	HPS28	PACIENTE	CANULA	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	I	S	S	n-MDR

Legenda: **HPS28:** Hospital e Pronto Socorro 28 de Agosto; **HPSJL:** Hospital e Pronto Socorro João Lúcio; **HUFM:** Hospital Universitário Francisca Mendes. Fonte de isolamento (**Paciente**, profissional, estrutura hospitalar); Tipo de amostras fonte de isolamento; Antimicrobianos testados: Aminoglicosídeos (**GEN:** Gentamicina; **AMI:** Amicacina; **TOB:** Tobramicina); Penicilinas (**PIT:** Piperacilina/tazobactam); Cefalosporinas (CPM: Cefepime; CAZ: Ceftazidima); Carbapenêmicos (**IMP:** Imipeném; **MPM:** Meropeném); Monobactâmicos (**ATM:** Aztreonam); Fluoroquinolonas (**NOR:** Norfloxacin; **LEV:** Levofloxacina; **CIP:** Ciprofloxacina); Polimixinas (**POB:** Polimixina B); **S:** Sensível; **I:** Sensibilidade intermediária; **R:** Resistente; **n-MDR:** não Multirresistente **MDR:** Multirresistentes; **PDR:** Panresistente; Em **NEGRITO** cepas MDR/PDR.

Anexo 4 – Integrons e Cassetes Gênicos

Cepas	Integrons		Cassetes Gênicos		
	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	Tamanho do amplicon (pb)	Grupo RFLP	Tipo de Cassete
Pa05	+	-	500	I	-
Pa17	+	-	1,2/1,6	VIII	<i>aadA6/dfrA12</i>
Pa20	+	-	1,2/1,6	VIII	<i>aadA6/dfrA12</i>
Pa22	+	-	-	-	-
Pa24	+	-	500	I	-
Pa33	+	-	1,2/1,6	VIII	<i>aadA6/dfrA12</i>
Pa36	+	-	1,2/1,6	VIII	<i>aadA6/dfrA12</i>
Pa37	+	-	1,8	II	<i>dhfrA1</i>
Pa39	+	-	1,2/1,6	VIII	<i>aadA6/dfrA12</i>
Pa41	+	-	500	I	-
Pa42	+	-	-	-	-
Pa43	+	-	500/1,2	VII	<i>aadA6</i>
Pa56	+	-	500/1,2	VII	<i>aadA6</i>
Pa58	+	-	500/1,2	VII	<i>aadA6</i>
Pa61	+	-	1,8	II	<i>dhfrA1</i>
Pa62	+	-	1,2	III	<i>aadA2/qacEdelta1</i>
Pa63	+	-	1,8	VI	<i>dfrA15/qacEdelta1</i>
Pa64	+	+	2,0	IX	<i>dfrA12/aadA2</i>
Pa66	+	-	-	-	-
Pa67	+	-	500	I	-
Pa68	+	-	-	-	-
Pa70	+	+	2,0	IX	<i>dfrA12/aadA2</i>
Pa71	+	-	500	I	-
Pa87	+	+	2,0	IX	<i>dfrA12/aadA2</i>
Pa95	+	-	500	I	-
Pa98	+	-	500	I	-
Pa99	+	-	500	I	-
Pa102	+	-	500/1,2	IV	<i>aadA6/orfD</i>
Pa104	+	-	-	-	-
Pa106	+	-	1,2	IV	<i>aadA6/orfD</i>
Pa107	+	-	1,8	VI	<i>dfrA15/dhfrA1</i>
Pa110	+	-	1,2	V	<i>aadA2/qacEdelta1</i>

Legenda: *intI1* e *intI2*: genes codificadores de integrase 1 e 2, respectivamente; + = positivo para o gene pesquisado; - = negativo para o gene pesquisado; Tamanho dos amplicons gerados utilizando iniciadores para cassetes gênicos; Em **NEGRITO** cepas MDR e PDR. **Grupo RFLP:** I a IX. Tipo de Cassete identificado após sequenciamento; Isolados com amplicons de 500bp para cassetes gênicos representaram integrons vazios.

Anexo 5 - Análise de Primers - Programa OligoAnalyzer 3.1

Gene	Primers	Sequências	Auto-Dímero (ΔG)	Hetero-Dímero (ΔG)	CG%	HAIPIN (ΔG)	Tamanho	T_m °C			
								TM°C	MIN.	MÉD.	MÁX.
<i>int11</i>	Int1-F	GGT TCG TGC CTT CAT CCG TTT	-3.61	-4.95	52.4 %	0.13	698	64.5 °C	-	-	-
	Int1-R	GCT TCG TGA TGC CTG CTT GTT	-3.61	-4.95	52.4 %	0.42		65 °C	-	-	-
<i>int12</i>	Int2-F	GCT ACC CTC TGT TAT CTC TGC	-3.61	-7.48	52.4 %	0.09	393	60.3 °C	-	-	-
	Int2-R	CGT TAT ACG GGT GGT TGC AGA	-7.05	-7.48	52.4 %	-0.6		57.2 °C	-	-	-
<i>int13</i>	Int3-F	GGA GGT TCA GAC GTT GCT TTC	-6.3	-6.3	52.4 %	0.6	290	62.4 °C	-	-	-
	Int3-R	CCA GTG CAT GAG GCA GAT ACA	-7.05	-6.3	52.4 %	-1.76		63.4 °C	-	-	-
int11, 2 e 3	hep35	TGC GGG TYA ARG ATB TKG ATT T	-12.56	-7.91	41.7 %	2.92	491	-	59.4 °C	62.5 °C	66.1 °C
	hep36	CAR CAC ATG CGT RTA RAT	(-5.54)	-7.91	41.7 %	0.85		-	52.7 °C	55.6 °C	59.2 °C
cassetes gênicos	5'CS-F	GCT CAC GCA ACT GGT CCA GAA	-6.62	-6.6	57.1 %	-2.05	Var	66 °C	-	-	-
	3'CS-R	GCA ACA CCG ACA GGG ATG GAT	(-3.61)	-6.6	57.1 %	-2.05		65.8 °C	-	-	-
cassetes gênicos	hep58	TCA TGG CTT GTT ATG ACT GT	(-5.38)	(-3.43)	40%	(-0.39)	Var	58.7 °C	-	-	-
	hep59	GTA GGG CTT ATT ATG CAC GC	(-5.38)	(-3.43)	50%	(-0.8)		60 °C	-	-	-
<i>bla</i> _{IMP-2,-8,-13,-19,-20,-24}	IMP-P1	CGA GAA GCT TGA AGA AGG TGT T	-10.23	(-15.35)	45.5 %	(-0.77)	512	62.1 °C	-	-	-
	IMP-P2	CGG ACT TTG GCC AAG CTT CTA	(-17.07)	(-15.35)	52.4 %	(-0.8)		63.8 °C	-	-	-
<i>bla</i> _{IMP-1,-3,-4,-6,-10}	IMP-P3	GAA GTT AAC GGG TGG GGC GTT	(-7.53)	(-9.82)	57.1 %	(-2.66)	578	66.2 °C	-	-	-
	IMP-P4	CCT TTA ACC GCC TGC TCT AAT G	(-4.85)	(-9.82)	50%	(2.31)		62.4 °C	-	-	-
<i>bla</i> _{IMP-12,-14,-18}	IMP-P5	GAC AGT ACG GCT GGA ATA GAG	(-3.65)	(-9.6)	52.4 %	(1.05)	407	-	60.8 °C	60.6 °C	61 °C
	IMP-P6	CCT TTA ACA GCC TGC TCC CA	(-4.85)	(-9.6)	55%	(0.64)		63.5 °C	-	-	-
<i>bla</i> _{IMP-11,-16,-21,-22}	IMP-P7	GTA GCA TTA CTG CCG CAG GA	(-6.69)	(-6.75)	55%	(-2.19)	643	63.4 °C	-	-	-
	IMP-P8	GTA AGC TTC AAG AGC GAC GCA	(-10.23)	(-6.75)	52.4 %	(-1.88)		64.1 °C	-	-	-
<i>bla</i> _{IMP-5,-7,-9,-15}	IMP-P9	CCT AAA CAC GGC TTG GTG GTT	(-3.61)	(-9.65)	52.4 %	(-1.98)	349	64.3 °C	-	-	-
	IMP-P10	GCC AAA CCA CTA CGT TAT CTG G	(-6.3)	(-9.65)	50%	(-0.57)		62.3 °C	-	-	-
<i>bla</i> _{VIM-2,-3,-6,-8,-9,-10,-11,-18}	VIM-P1	GTT ATT GGT CTA TTT GAC CGC G	(-10.36)	(-6.75)	45,50%	(-3.08)	781	60.8 °C	-	-	-
	VIM-P2	CTA CTC AAC GAC TGA GCG ATT T	(-10.36)	(-6.75)	45.5 %	(-3.08)		61.5 °C	-	-	-
<i>bla</i> _{VIM-1,-4,-5,-14}	VIM-P3	GGT CTA CAT GAC CGC GTC TGT	(-10.36)	(-6.75)	45.5 %	(-2.72)	775	61.5 °C	-	-	-
	VIM-P4	CTA CTC GGC GAC TGA GCG ATT	(-5.19)	(-6.75)	57.1 %	(-2.27)		65 °C	-	-	-

Anexo 5 - Análise de Primeres - Programa OligoAnalyzer 3.1 (continuação)

Gene	Primers	Sequências	Auto-Dímero (ΔG)	Hetero-Dímero (ΔG)	CG%	HAIPIN (ΔG)	Tamanho	$T_M^{\circ}C$			
								TM $^{\circ}C$	MIN.	MÉD.	MÁX.
<i>bla</i> _{VIM-7, -12, -13}	VIM-P5	CGA TGG YGT TTG GTC GCA TAT	(-6.75)	(-10.18)	50%	(-0.66)	390	-	62.5 °C	63.4 °C	64.9 °C
	VIM-P6	GAA TGC GCA GCA CCA GGA TA	(-13.8)	(-10.18)	55%	(-2.88)		64 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{SPM-1}	SPM-F	GAG AGC CCT GCT TGG ATT CAT	(-4.74)	(-6.97)	52,40%	(-2.88)	811	63.5 °C	-	-	-
	SPM-R	CAG TCT CAT TTC GCC AAC GG	(-3.61)	(-6.97)	55%	(-1.11)		62.5 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{GES}	GES-F	GCG CTT CAT TCA CGC ACT ATT A	(-9.89)	(-6.91)	45,50%	(-2.51)	862	62.6 °C	-	-	-
	GES-R	CTA TTT GTC CGT GCT CAG GAT G	(-4.64)	(-6.91)	50%	(-0.4)		62,1°C	-	-	-
<i>Bla</i> _{KPC}	KPC-F	GTA TCG CCG TCT AGT TCT GCT G	(-4.16)	(-6.76)	54,50%	(-0.38)	871	63.4 °C	-	-	-
	KPC-R	GTT GAC GCC CAA TCC CTC GA	(-6.76)	(-6.76)	60%	(-0.92)		65.6 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{OXA-23-like}	OXA23-F	AAG CAT GAT GAG CGC AAA G	(-9.89)	(-5.13)	47.4 %	(-0.58)	1066	60.5 °C	-	-	-
	OXA23-R	AAA AGG CCC ATT TAT CTC AAA	(-9.28)	(-5.13)	33.3 %	(0.17)		57.9 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{OXA-24-like}	OXA24-F	GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA	(-3.9)	(-5.84)	30%	(-0.49)	-	52.8 °C	-	-	-
	OXA24-R	TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT	(-5.38)	(-5.84)	35%	(0.06)		56.7 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{OXA-48-like}	OXA48-F	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG	(-9.71)	(-5)	50%	(-1.43)	744	61.5°C	-	-	-
	OXA48-R	GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC	(-3.3)	(-5)	47.6 %	(-1.66)		61.2 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{OXA-50-like}	OXA50-F	AAT CCG GCG CTC ATC CAT C	(-9.89)	(-6.75)	57,9	(0.14)	869	63.7 °C	-	-	-
	OXA50-R	GGT CGG CGA CTG AGG CGG	(-6.53)	(-6.75)	77.8 %	(-0.74)		68.3 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{OXA-55-like}	OXA55-F	CAT CTA CCT TTA AAA TTC CC	(2.39)	(-1.95)	35%	(2.39)	-	53.2 °C	-	-	-
	OXA55-R	AGC TGT TCC TGC TTG AGC AC	(-6.69)	(-1.95)	55%	(-1.78)		64.1 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{OXA-58-like}	OXA58-F	TTA TCA AAA TCC AAT CGG C	(-8.74)	(-5.36)	35%	(2.39)	934	53.2 °C	-	-	-
	OXA58-R	TAA CCT CAA ACT TCT AAT TC	(-5.36)	(-5.36)	30%	(1.96)		52.3 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{OXA-60-like}	OXA60-F	AAA GGA GTT GTC TCA TGC TGT CTC G	(-5.38)	(-4.89)	48%	(-1.97)	-	65.6 °C	-	-	-
	OXA60-R	AAC CTA CAG GCG CGC GTC TCA CGG TG	(-17.11)	(-4.89)	65.4 %	(-2.53)		73.7 °C	-	-	-
<i>Bla</i> _{OXA-69-like}	OXA69-F	CTA ATA ATT GAT CTA CTC AAG	(-5.47)	(-5.85)	28.6 %	(-1.65)	975	50.7 °C	-	-	-
	OXA69-R	CCA GTG GAT GGA TGG ATA GAT TAT C	(-5.02)	(-5.85)	44%	(-2.31)		61.5 °C	-	-	-

Anexo 6 – Matriz de similaridade pelo método de Dice para dendograma RFLP de Cassetes Gênicos

Rows\Cols	Pa37	Pa61	Pa63	Pa107	Pa43	Pa56	Pa58	Pa64	Pa70	Pa87	Pa62	Pa102	Pa106	Pa110	Pa17	Pa20	Pa33	Pa36	Pa39
Pa37	1.0000000																		
Pa61	1.0000000	1.0000000																	
Pa63	0.3333333	0.3333333	1.0000000																
Pa107	0.0000000	0.0000000	0.8000000	1.0000000															
Pa43	0.3333333	0.3333333	0.6666667	0.4000000	1.0000000														
Pa56	0.3333333	0.3333333	0.6666667	0.4000000	1.0000000	1.0000000													
Pa58	0.3333333	0.3333333	0.6666667	0.4000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000												
Pa64	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	1.0000000											
Pa70	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	1.0000000	1.0000000										
Pa87	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000									
Pa62	0.3333333	0.3333333	0.3333333	0.0000000	0.3333333	0.3333333	0.3333333	0.4000000	0.4000000	0.4000000	1.0000000								
Pa102	0.3333333	0.3333333	0.3333333	0.0000000	0.3333333	0.3333333	0.3333333	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.6666667	1.0000000							
Pa106	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.4000000	0.8000000	1.0000000						
Pa110	0.0000000	0.0000000	0.4000000	0.5000000	0.4000000	0.4000000	0.4000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.4000000	0.4000000	0.5000000	1.0000000					
Pa17	0.0000000	0.0000000	0.2500000	0.2857143	0.5000000	0.5000000	0.5000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.2857143	1.0000000				
Pa20	0.0000000	0.0000000	0.2500000	0.2857143	0.5000000	0.5000000	0.5000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.2857143	1.0000000	1.0000000			
Pa33	0.0000000	0.0000000	0.2500000	0.2857143	0.5000000	0.5000000	0.5000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.2857143	1.0000000	1.0000000	1.0000000		
Pa36	0.0000000	0.0000000	0.2500000	0.2857143	0.5000000	0.5000000	0.5000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.2857143	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	
Pa39	0.0000000	0.0000000	0.2500000	0.2857143	0.5000000	0.5000000	0.5000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.2857143	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000

Anexo 8 – Matriz de similaridade pelo método de Dice para dendograma PFGE.

Rows\Co	Pa17	Pa33	Pa36	Pa39	Pa42	Pa20	Pa70	Pa50	Pa101	Pa107	110
Pa17	1.00000										
Pa33	1.00000	1.00000									
Pa36	1.00000	1.00000	1.00000								
Pa39	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000							
Pa42	0.68571	0.68571	0.68571	0.68571	1.00000						
Pa20	0.50000	0.50000	0.50000	0.50000	0.60606	1.00000					
Pa70	0.50000	0.50000	0.50000	0.50000	0.60606	1.00000	1.00000				
Pa50	0.50000	0.50000	0.50000	0.50000	0.60606	1.00000	1.00000	1.00000			
Pa101	0.42424	0.42424	0.42424	0.42424	0.40000	0.32258	0.32258	0.32258	1.00000		
Pa107	0.57894	0.57894	0.57894	0.57894	0.62857	0.50000	0.50000	0.50000	0.42424	1.00000	
110	0.35000	0.35000	0.35000	0.35000	0.59459	0.42105	0.42105	0.42105	0.51428	0.60000	1.00000

Anexo 9 – Sequências dos genes de resistência analisados (*bla_{KPC-2}*, *bla_{VIM}* e *bla_{OXA-50}*)

Gene	Isolado	Sequência
<i>bla_{KPC-2}</i>	Pa36	CTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCACTTCGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTACCG CGCTGAGGAGCGCTTCCCCTGTGACGCTCATCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAGCAGGCCGGCTTGTGGACACACCCATCCGTTACGGCAAAAAT GGCGTGGTTCCGTGGTCAACCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCCGCGTGAATACAGTGATAACGCCGCCGCAATTTGTTGCTGA AGGAGTTGGGCGGCCCGGCCGGCTGACGGCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGCTGTGGACCCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGCCATCCAGGCGATGCGCGCGA TACCTCATCGCCGCGCGCGTACGGAAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGACGCGGAGCAGTTTGTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAA CCACCGCATCCGCGCGGGCGGTGCCGGCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAAACCGGAACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAAATGACTATGCCGTCGTTGGCCCACTGGGCGCGCAC TATTGTGTTGGCGTCTACACCCGGGCGCCTAAC
	Pa70	GCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCACTTCGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTCAGGCGCAACTG TAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCCTGTGACGCTCATCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAGGCCGGCTTGTGGACACACCCATCCGTTAC GGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCAACCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTCCNCGGCCGCGTGAATACAGTGATAACGCCGCCGCAAT TTGTTGCTGAAGGAGTTGGGCGGCCCGGCCGGCTGACGGCTTCATGCNCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGCTGTGGACCCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGCCATCCAGGCG ATGCGCGGATACCTCATCGCCGCG
	Pa101	GCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCACTTCGCTAAACTCGAAAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTCARGCGCAACTGT AAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCCTGTGACGCTCATCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAGGCCGGCTTGTGGACACACCCATCCGTTACG GCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCAACCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCCGCTGCAATACAGTGATAACGCCGCCGCAAT TGTGCTGAAGGAGTTGGGCGGCCCGGCCGGCTGACGGCTTCATGCGCTCTATCGGCGATAC
	Pa110	GATGACGGCCTCGCTGTGCTTGTATCCTTGTAGGCGCCGGGTGTAGACGGCCAAACAATAGNCGCGCCAGTGGGCCAGACGACGGCAGTATTCATTGCGCTGCCATACACTC CGCAGGTTCCGGTTTTGTCTCCGACTGCCAGTCTGCCGGCACCGCCGCGCGGATGCGGTGGTTGCCGGTCTGTTCCCTTTAGCCAATCAACAAAAGTGTGCCGCTGCCGCGCAGCC AGTGCAGAGCCCAGTGTCACTTTTGTAAAGCTTCCGTCACGGCGCGCGGGGATGAGGTATCGCGCGCATCGCTGGGATGGCGGAGTTCAGCTCCAGCTCCAGCGGTCCAGACGGA ACGTGGTATCGCCGATAGAGCGCATGAAGGCCGTACGCCGGCCGGCCGCAACTCCTTACGCAACWAATTTGGCGGCGGGTATCACTGTATTGACGGCGGCCGCGGACAGCT CCGCCACCGTCATGCCTGTGTGATGATATTTTTCCGAGATGG
<i>bla_{OXA-50}</i>	Pa12	CGAGCCATGCGCCCTCTCCTCTCAGTGCCTTCTCCTGCTTTCCGGGCATACCCAGGCCAGGAAATGGAACGACAGCCAGGCCGCTGGACAAGCTATTCCGGCGGCCCGGGGTGAAAG GCACCTTCGCTCTACGATGTGCANCGGNGCGCTATGTGCGCCATGACCGGGAGCGCGGAAACCCGCTTCGGTTCGCCCTTCCACCTACNAGGTGGCGAACNGCTGATNGNT TATNACAGGGGCGGTTAGATCCCCAAAGAGGGTCTNCCCTATGGCGGC
	Pa39	CTTGAGACTGGCCTTGCCAGTTCGACGCGCTTGGCGATGTCGGCTCGCCGCGGCGCATGCTGATGTTACGGGCGAAGCCGTAGAGCCGCTCGTTGCGCTTACCCAGCCACCCAC CAGCCGAGTTCGGCGGTGACGTCGAAGCACAGCCGGTCTTGGCGTGCAGTCCAGCCCGGGCCGCTTTCACAGCAGGGTTCATGGCGCGCACGGTGGACTGCACCGGGCGGGGA ATGGCAATTCTCCCTGCGCCAGTCGGAGCAGAAAGCGGGTCTGTTCCATCGCGCTGATCTTACGCGGTCCACCAACNAGAAGTTATCCACAACCTGGCCGATTTCCGCGTTCGCGTA ACCCAGGCGCGAGACATTGGCGCGCATCCGCTCCAGGCCGATGCGCCGCGCAGTTCCTGGT
	Pa50	CATGCGCCCCCTCTCTCAGTGCCTTCTCCTGCTTTCCGGGCATACCCAGGCCAGCGAATGGAACGACAGCCAGGCCGCTGGACAAGCTATTCCGGCGGCCCGGGGTGAAAGGCACC TTCTCCTCTACGATGTGCAGCGCAGCGCTATGTGCGCCATGACCGGGAGCGCGGAAACCCGCTTCGTTCCCGCTTCCACCTACAAGGTGGCGAACAGCCTGATCGGCTTATCCA CAGGGGCGGTTAGATCCACCGACGAGGTTCTCCCTCTGGCGGCA
	Pa70	GACGAGCCATGCGCCCCCTCTCTCAGTGCCTTCTCCTGCTTTCCGGGCATACCCAGGCCAGCGAATGGAATGACAGCCAGGCCGCTGGACAAGCTATTCCGGCGGCCCGGGGTGAA AGGCACCTTCGCTCTACGATGTGCAGCGCCAGCGCTATGTGCGCCATGACCGGGAGCGCGGAAACCCGCTTCGGTTCGCCCTTCCACCTACAAGGTGGCGAACAGCCTGATC GGCTTATCCACAGGGGCGGTTAGATCCGCCGACGAGGTTCTCCCTCTGGCGGCA
<i>bla_{VIM}</i>	Pa29	GGGAGGTCCGGCTTACACAGATTGCCGATGGTGTGGTGCATATCGCAACGACGCTGTTGATGGCGCAGTCTACCCGTTCAATGGTCTCATT GTCCGTTGATGGTATGAGTTGCTTTTATTGATACAGCGTGGGTGCGAAAAACACAGCGCACTTCTCGCGGAGATTGAGAAGCAAAATGGACTTCTGTAAACCGTGCAGTCTCCA CGCACTTTCATGACGACCGCTGCGCGGCTTGTATGCTTCCGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATACCGTTCGACACGCCGGCTAGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCCA CGCACTTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACGCGAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAACTTCTATCTTGGTGTGCGCATTTCGACCGACAACCTAGTTGTGATCGTCCCGTCTGCG AGTGTGCTCTATGGTGGTGTGCGA