UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a
antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.**

Eduardo Carneiro Clímaco

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a
antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia como etapa obrigatória para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado: Eduardo Carneiro Clímaco

Orientadora: Profa. Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Clímaco, Eduardo Carneiro

Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Ribeirão Preto, 2011.

76 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Darini, Ana Lúcia da Costa

1. *Pseudomonas*. 2. *Acinetobacter*. 3. Multirresistência. 4. Porina. 5. Carbapenemase. 6. Sistema de efluxo. 7. Integron.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Carneiro Clímaco

Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em
Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter* spp.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientadora: Profa. Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho de pesquisa foi realizado nos seguintes centros de pesquisa:

Laboratório Principal: ***Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular*** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da FCFRP-USP.

Laboratório Maurílio Baldi do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde foram isoladas as bactérias estudadas, sob a coordenação do *Prof. Dr. Murilo Gomes de Oliveira*.

Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, do Departamento de Genética da FMRP – USP, nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, sob coordenação do *Prof. Dr. Wilson de Araújo da Silva Júnior*, onde foi realizada parte dos experimentos de sequenciamento.

Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da FCFRP-USP, sob coordenação do *Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura*, onde foram realizados os experimentos de expressão gênica.

Laboratório de Bioquímica do Departamento de Física e Química (DFQ) da FCFRP-USP, sob coordenação do *Prof. Dr. Carlos Curti*,

Dedico este trabalho

às minhas amadas,

Juliana e Beatriz

A maior riqueza do ser humano

é amar e ser amado por sua família!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini, pelas orientações, valiosos ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Murilo Gomes de Oliveira, pela colaboração e por ter disponibilizado os isolados bacterianos estudados.

Ao Prof. Dr. Wilson de Araújo da Silva Júnior, professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela disponibilização do laboratório para os experimentos de sequenciamento.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela disponibilização do laboratório para os experimentos de expressão gênica.

Ao Prof. Dr. Carlos Curti, professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela disponibilização do laboratório para os ensaios cinéticos de fluorimetria.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Sicchiroli Lavrador, professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Didier Mazel, do Instituto Pasteur, e Dr. Patrick Plésiat, Universidade de Franche-Comte, pela atenção à solicitação de linhagens controle.

À Ludmilla Tonani, colaboração e apoio na realização de várias metodologias.

À Joseane Cristina Ferreira, pelo apoio na execução de vários experimentos.

Ao Rubens Eduardo da Silva, pelo auxílio técnico laboratorial.

À Milena Locci Oliveira e Daniela Yumi Takata, bolsistas de iniciação científica, pela colaboração nos experimentos.

Aos amigos André, Leonardo, Renata, Leila, Carol, Natália e Juliana, pelas conversas descontraídas e científicas também.

À Luciana Oliveira Almeida e Renata Vilela Rodrigues pela atenção e auxílio nos experimentos referentes ao *real-time* PCR.

À Adriana Aparecida Márquez, pelos exaustivos sequenciamentos.

À Ana Lúcia Turatti, Rosana Florêncio e Henrique Theodoro, funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção dispensada.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (Proc nº 2007/04580-0) e auxílio financeiro (Proc. nº 2008/56379-0).

"Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar."

(Esopo)

RESUMO

CLÍMACO, E. C. **Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.** 2011. 76f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

P. aeruginosa e espécies de *Acinetobacter* são causas comuns de diversas infecções em pacientes hospitalizados, principalmente nos internados em centros de tratamento intensivo. Além disso, esses microrganismos se destacam por apresentarem resistência, intrínseca e adquirida, a várias classes de antibióticos, conferindo à bactéria fenótipos de multirresistência e panresistência. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação de integrons (elementos genéticos que carregam genes de resistência), de genes codificadores de metalo- β -lactamases, da perda de porinas (canais protéicos da membrana externa), e da atividade de efluxo aumentada, como determinantes do fenótipo de multirresistência e panresistência. Foram estudadas 147 *P. aeruginosa* e 57 *Acinetobacter* spp. isolados de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, no período de 2003 a 2006. O perfil de sensibilidade destes isolados foi determinado por disco de difusão e utilizado para classificá-las como multirresistentes (MDR) e não multirresistentes (n-MDR). A variabilidade clonal dos isolados foi investigada por PFGE. Os isolados pertencentes aos grupos MDR e n-MDR foram investigados quanto a presença de integrons de classe 1, 2 e 3, por PCR e análise de RFLP. Os cassetes gênicos contidos nestes integrons, assim como genes codificadores de carbapenemases (ex. IMP, VIM e SPM), foram detectados por PCR e identificados por sequenciamento. Avaliação da expressão gênica de bombas de efluxo (*mexB*, *mexY*, *mexD* e *adeB*) e de porina (OprD) foi conduzida por *real-time* RT-PCR. Os dados apresentados para os isolados do grupo MDR foram comparados àqueles do grupo n-MDR e a associação entre os determinantes de resistência e o fenótipo MDR foi calculada estatisticamente. Fenótipo de multiresistência foi observado em 42,2% e 84,2% das *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. estudadas. Nenhum isolado bacteriano apresentou fenótipo panresistente. Em 65 (44,2%) dos isolados de *P. aeruginosa*, foram detectados integrons de classe 1. Esses elementos apresentaram relação estatisticamente significativa com fenótipos MDR em *P. aeruginosa*. Entretanto, a maioria desses integrons não carregava nenhum cassete gênico (43/65) ou continham apenas cassetes gênicos de resistência a aminoglicosídeos (19/65). Entre os isolados de *Acinetobacter* spp., 11 (17,5%) apresentaram integrons de classe 1 e 30 (47,6%) integrons de classe 2. Apenas os últimos foram estatisticamente associados com fenótipos MDR. A pesquisa de metalo- β -lactamase (MBL) revelou a produção de enzimas SPM em 24 isolados de *P. aeruginosa*. Os estudos de expressão gênica demonstraram que, entre os sistemas de efluxo mais relatados para *P. aeruginosa*, MexXY-OprM foi o que mostrou maior diferença entre o nível de expressão dos grupos MDR e n-MDR, sugerindo que este sistema de efluxo desempenha importante papel no fenótipo MDR. Diminuição, em média de 66,4%, da produção de OprD também foi um padrão encontrado nos isolados MDR em relação aos n-MDR. Dois grupos clonais de *P. aeruginosa* e dois de *Acinetobacter* spp. foram predominantes e tiveram relação com presença de integrons, produção de SPM-1 e com fenótipo MDR. Portanto, esse fenótipo pode ser consequência de acúmulo de determinantes de resistência em clones específicos.

Palavras-chave: Multirresistência; *Acinetobacter*; *Pseudomonas*; integrons; porinas; efluxo; carbapenemases

ABSTRACT

CLÍMACO, E. C. **Molecular evaluation of the mechanisms that determine antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.** 2011. 76f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The non-fermenting pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. are important causes of nosocomial infections. These species are often associated with a multidrug resistance (MDR) phenotype, due to intrinsic and acquired resistance genes. Some determinants of resistance, such as integrons, carbapenemases, overexpression of efflux systems and porins loss may be associated with the MDR phenotype. The aim of this study was to evaluate the association of non-MDR and MDR phenotypes in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. to the presence of integrons and carbapenemases encoding genes, the overexpression of *mexY*, *mexB*, *mexD* and *adeB* genes and loss of the outer membrane protein, OprD. These resistance determinants were evaluated in 147 *P. aeruginosa* and 57 *Acinetobacter* spp., isolated from in-patients of University Hospital of UFJF. Isolates with different PFGE and non-susceptibility profiles were grouped according to MDR or non-MDR phenotypes. PCR and real-time RT-PCR were used to investigate the presence of class 1, 2 and 3 integrons and carbapenemase encoding genes and the expression of *mexY*, *mexB*, *mexD* and *adeB* efflux pumps and OprD porin, respectively. Class 1 integrons were one of the most common genetic elements present in MDR *P. aeruginosa* (44,2%), but the phenotype could not be attributed to these elements, since they showed empty (43/65) or only aminoglycoside gene cassettes (19/65). Class 2 integrons were the most common genetic elements in MDR *Acinetobacter* spp., and this association was statistically significant. SPM encoding gene was the only carbapenemase gene found in *P. aeruginosa* and, predominantly, in the PFGE cluster A. Expression of MexXY-OprM determined by real-time RT-PCR was the highest variable between MDR and non-MDR *P. aeruginosa* isolates (almost 10-fold). Reduction of 66.4% in OprD expression was observed in MDR *P. aeruginosa*, in comparison with non-MDR ones. It is concluded that the most important genetic determinants in the MDR phenotype of *P. aeruginosa* were SPM-1 production, followed by MexXY-OprM over expression and diminished production of OprD, while class 2 integrons was the most important genetic determinant of MDR phenotype in *A. baumannii*.

Keywords: Multidrug resistance; *Acinetobacter*; *Pseudomonas*; integrons; porin; efflux system; carbapenemases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gene <i>rpoB</i> e regiões flanqueadoras.....	12
Figura 2	Dendrograma representando a relação filogenética entre as sequências de zona 1 dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.....	24
Figura 3	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das linhagens de <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 4	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das linhagens de <i>Acinetobacter</i> spp.....	26
Figura 5	Dendrograma de similaridade genômica de <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 6	Gráfico mostrando o número de isolados de <i>P. aeruginosa</i> do grupo A e B ao longo do período estudado.....	28
Figura 7	Dendrograma de similaridade genômica de <i>A. baumannii</i>	29
Figura 8	Gráfico mostrando o número de isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. do grupo A' e B' ao longo do período estudado.....	30
Figura 9	Dendrograma mostrando os 9 perfis de RFLP das regiões de cassetes gênicos, após amplificação pela PCR e digestão com <i>RsaI</i> e <i>HinfI</i> , de 22 isolados de <i>P. aeruginosa</i>	36
Figura 10	Géis de agarose 1% demonstrando a migração eletroforética dos fragmentos de <i>bla</i> _{spm-1} amplificados por PCR.....	36
Figura 11	Boxplot da distribuição dos isolados n-MDR e MDR em relação à variância do coeficiente angular das retas geradas pelo ensaio cinético da interiorização do brometo de etídeo.....	38
Figura 12	Dados da <i>real-time</i> RT-PCR para o gene <i>mexB</i> de <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 13	Dados da <i>real-time</i> RT-PCR para o gene <i>mexY</i> de <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 14	Dados da <i>real-time</i> RT-PCR para o gene <i>mexD</i> de <i>P. aeruginosa</i>	40
Figura 15	Dados da <i>real-time</i> RT-PCR para o gene <i>adeB</i> de <i>Acinetobacter</i> spp.....	40
Figura 16	Dados da <i>real-time</i> RT-PCR para o gene <i>oprD</i> de <i>P. aeruginosa</i>	41
Figura 17	Escatergramas mostrando a distribuição dos valores de $2^{-\Delta C_t}$ da expressão dos genes codificadores das bombas de efflux MexY, MexB, MexD e AdeB.....	44
Figura 18	Escatergramas mostrando a distribuição dos valores de $2^{-\Delta C_t}$ da expressão do gene codificador da porina OprD.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens-controle, suas características e experimentos relacionados.....	11
Tabela 2	Composição da PCR.....	15
Tabela 3	Pares de <i>primers</i> utilizados no estudo.....	16
Tabela 4	Fragmentos obtidos na RFLP para genes codificadores de integrase.....	18
Tabela 5	<i>Primers</i> e condições utilizadas para as reações de <i>real-time</i> PCR.....	20
Tabela 6	Resumo da identidade dos fragmentos sequenciados do isolado Ac 17 com sequências encontradas no GenBank.....	23
Tabela 7	Relação da presença de integrons de classe 1, 2 e 3 na determinação de fenótipo MDR	31
Tabela 8	Associação entre sensibilidade e presença de integrons de classe 1 em <i>P. aeruginosa</i> ..	32
Tabela 9	Associação entre sensibilidade e presença de integrons de classe 1 em <i>A. baumannii</i>	33
Tabela 10	Associação entre sensibilidade e presença de integrons de classe 2 em <i>A. baumannii</i>	34
Tabela 11	Expressão de bombas de efluxo e porina por <i>P. aeruginosa</i> MDR e n-MDR em associação com os perfis de resistência/intermediário e de PFGE.....	42
Tabela 12	Expressão de bomba de efluxo por <i>Acinetobacter</i> spp. MDR e n-MDR em associação com os perfis de resistência/intermediário e PFGE e presença de integrons.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABC	<i>ATP-binding cassettes superfamily</i>
Ac	<i>Acinetobacter</i> spp.
AMI	Amicacina
AMS	Ampicilina com sulbactam
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZT	Aztreonam
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Citosina
CAZ	Ceftazidima
CCCP	Carbonil cianido <i>m</i> -clorofenilhidrazona
cdNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFP	Cefoperazona
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CT	Colistina
CTRL-	Controle negativo
CTRL+	Controle positivo
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Doxiciclina
ESBL	<i>Extended-spectrum β-lactamase</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FEP	Cefepime
Fig.	Figura
G	Guanina
GEN	Gentamicina
HU-UFRJ	Hospital Universitário – Universidade Federal de Juiz de Fora
I	Intermediário
IC	Intervalo de confiança
IMP	Imipenem
JF	Juiz de Fora

LB	Luria Bertani
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
LEV	Levofloxacino
Ltd.	Limitada
M	Molar
MATE	<i>Multidrug and toxic compouds extrusion</i>
MBL	Metalo- β -Lactamase
mDA	Milidaltos
MDR	Multirresistente
MER	Meropenem
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
mg	Miligrama
MH	Minociclina
min	Minutos
mL	Mililitro
n	Número
nm	Nanômetro
N-MDR	Não-multirresistente
NOR	Norfloxacino
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
P	Probabilidade
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pb	Pares de bases
PB	Polimixina B
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel eletrophoresis</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PTZ	Piperacilina com Tazobactam
R	Resistente
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleic
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
RND	<i>Resistance-nodulation-cell division superfamily</i>

Rpm	Rotações por minute
S	Sensível
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMR	<i>Small family multidrug resistance</i>
T	Timina
TAC	Ticarcilina com clavulanato
TGC	Tigeciclina
TOB	Tobramicina
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
USP	Universidade de São Paulo
μM	Micromol

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
®	Marca registrada
™	Trademark
°C	Graus Centígrados
×	Vezes
β	Beta
Y	Citosina e Timina
R	Adenina e Guanina
B	Citosina, Timina e Guanina
K	Timina e Guanina

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figures	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
Lista de símbolos	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Mecanismos de resistência.....	2
1.1.1. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em <i>Acinetobacter</i> spp.....	2
1.1.2. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.2. Definição de multirresistência e panresistência	4
1.3. Mecanismos determinantes de multirresistência.....	5
1.3.1. Integrons.....	5
1.3.2. Sistemas de efluxo.....	6
1.3.3. Perda de proteínas de membrana externa.....	7
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo geral.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Isolados bacterianas.....	11
3.2. Identificação das species de <i>Acinetobacter</i>	11
3.3. Armazenamento das bactérias.....	12
3.4. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos.....	12
3.5. Eletroforese em campo pulsado.....	13
3.6. Detecção de integrons de classe 1, 2 e 3.....	15
3.7. Reação da polimerase em cadeia.....	15
3.8. Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição.....	17
3.9. Sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados.....	17
3.10. Estudo da cinética de acúmulo intracelular de brometo de etídeo.....	18
3.11. Estudo da expressão gênica por <i>real-time</i> RT-PCR.....	19

3.12. Métodos estatísticos utilizados.....	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Identificação das espécies genômicas de <i>Acinetobacter</i>	23
4.2. Perfil de resistência.....	24
4.3. Eletroforese em campo pulsado.....	26
4.4. Detecção de integrons de classe 1, 2 e 3.....	30
4.5. Integrons vs. Resistência.....	31
4.6. Estudos dos cassetes gênicos.....	34
4.7. Pesquisa de genes codificadores de carbapenemases.....	36
4.8. Estudo da cinética de acúmulo intracelular de brometo de etídeo.....	37
4.9. Análise da expressão desistema de efluxo e porina.....	38
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	58
 APÊNDICES.....	 65
Apêndice A - Resultados fenotípicos e moleculares dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	
Apêndice B - Resultados fenotípicos e moleculares dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.	
Apêndice C - Gráficos Boxplot da distribuição dos isolados de <i>A. baumannii</i> agrupados por seu perfil de resistência, de acordo com o ensaio cinético de interiorização do brometo de etídeo.	
Apêndice D - Gráficos Boxplot da distribuição dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> agrupados por seu perfil de resistência, de acordo com o ensaio cinético de interiorização do brometo de etídeo.	

1. Introdução

Um dos principais problemas de saúde pública, na atualidade, é a escassez de alternativas terapêuticas para combater infecções por bactérias multirresistentes. Isso se deve, principalmente, a dois motivos: poucos investimentos e esforços, por parte das indústrias farmacêuticas, visando novas drogas antimicrobianas (KRESSE; BELSEY; ROVINI, 2007) e a alta versatilidade adaptativa das bactérias patogênicas perante a pressão seletiva de diversos antibióticos. Para muitos autores, estamos nos aproximando de um cenário semelhante ao vivenciado na era pré-antibiótico (KRESSE; BELSEY; ROVINI, 2007; LIVERMORE; WOODFORD, 2006). Portanto, o conhecimento detalhado dos mecanismos que tais bactérias utilizam para se tornar resistentes aos antimicrobianos se faz necessário tanto para melhor adequação de protocolos de tratamento das infecções, quanto para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Alguns trabalhos recentes destacam o importante papel de bactérias não-fermentadoras no panorama de multirresistência, principalmente em relação às infecções nosocomiais. Dentre essas bactérias, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* são os gêneros de maior importância clínica, pois são os mais isolados em laboratórios de microbiologia e frequentemente demonstram resistência, intrínseca e adquirida, a várias classes de antibióticos (BONOMO; SZABO, 2006; PATERSON, 2006).

O gênero *Pseudomonas* foi descrito pela primeira vez em 1894 e representa um dos gêneros bacterianos mais variáveis e ubíquos, cujas espécies têm sido isoladas em diversos ambientes, deste a Antártica aos Trópicos, presentes no solo, sedimentos e água de rios e lagos, plantas, fungos e em amostras clínicas (PEIX, RAMÍREZ-BAHENA, VELÁSQUEZ, 2009). As espécies que constituem esse gênero vêm passando por várias reclassificações com o decorrer do tempo e, atualmente, totalizam 128 espécies, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* a principal espécie de interesse clínico e também um dos principais patógenos de infecção hospitalar, (EUZÉBY, 2010). As características fenotípicas utilizadas para identificação de *Pseudomonas* se baseiam em aspectos morfológicos das células, tipos de flagelos, utilização de fontes de carbono como ácidos orgânicos, poliálcoois e aminoácidos, capacidade de crescimento em diferentes condições, resistência a alguns antibióticos, produção de substâncias com atividade antibióticas e de enzimas extracelulares (PEIX, RAMÍREZ-BAHENA, VELÁSQUEZ, 2009).

O gênero *Acinetobacter* é constituído de espécies amplamente disseminadas na natureza, sendo encontrado tanto em ambientes úmidos quanto secos, o que não é comum para bacilos

gram-negativos. Podem contaminar produtos alimentícios e colonizar a pele humana em pessoas saudáveis. (SCHRECKENBERGER et al., 2007). As espécies de *Acinetobacter* spp. são fenotipicamente muito parecidas e, aliado ao fato dessas bactérias serem metabolicamente pouco ativas, a identificação fenotípica torna-se difícil de ser realizada em laboratório. Estudos baseados em similaridade genômica por hibridação DNA-DNA demonstraram 24 grupos distintos que foram denominados espécies genômicas (gen. sp.) e numerados de 1 a 24 (LA SCOLA et al., 2006). Algumas espécies genômicas coincidem com algumas espécies previamente identificadas e, portanto, são mantidas as nomenclaturas iniciais de espécie. *Acinetobacter baumannii* é a principal espécie do gênero associada com infecções nosocomiais.

1.1. Mecanismos de resistência

Resumidamente, os mecanismos que conferem resistência a essas espécies bacterianas podem ser divididos em três: produção de enzimas capazes de inativar a atividade dos antimicrobianos; perda de proteínas de membrana externa (porinas), que funcionam como canais pelos quais os antimicrobianos alcançam o sítio de ação, tornando-se “impermeáveis” a tais drogas; e aumento da expressão de sistemas de efluxo, um sistema composto de proteínas capazes de expulsar os antimicrobianos do meio intracelular (BONOMO; SZABO, 2006).

1.1.1. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *Acinetobacter* spp.

As espécies de *Acinetobacter* geralmente apresentam resistência a várias classes de antibióticos. Resistência às oximino-cefalosporinas é uma característica comum em *A. baumannii* devido à produção de β -lactamase cromossômica do tipo AmpC. Apesar desta produção não ser induzível, como observado em várias enterobactérias resistentes a antibióticos β -lactâmicos, a superexpressão do gene *ampC* é decorrente da inserção da *ISAbal* à montante deste gene. Esta sequência de inserção é um elemento genético bastante disseminado entre isolados de *A. baumannii* e possui um sítio promotor bastante eficiente para a expressão de ORFs adjacentes (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Desde os anos 90, os antibióticos carbapenêmicos têm sido usados como a única classe de drogas capaz de combater diversas infecções causadas por *Acinetobacter* spp. Porém, atualmente, resistência aos carbapenêmicos tem sido observada com mais frequência pela disseminação de certos clones produtores das metalo- β -lactamases VIM e IMP e, principalmente, pela produção de diversas enzimas OXA. Similarmente às enzimas AmpC, a expressão das enzimas OXA pode ser exacerbada pela presença da sequência de inserção *ISAbal* (BONOMO; SZABO, 2006).

Sistemas de bombas de efluxo também são eficientes mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, quinolonas e, algumas vezes, aminoglicosídeos. Em *A. baumannii*, foi descrita bomba de efluxo da família RND, responsável por resistência a aminoglicosídeos e envolvida com resistência às quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim e capaz de expulsar outros componentes como o brometo de etídeo (KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

O aumento da incidência de *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos leva à necessidade de novas drogas para combater infecções causadas por essa bactéria. Atualmente, o antibiótico polimixina B tem sido utilizado por via intravenosa, porém é uma droga que apresenta grande toxicidade e baixa efetividade em pneumonias. A tigeciclina, uma glicilciclina derivada de tetraciclina, é uma alternativa para essas infecções, assim como o uso de polimixina B em nebulizações para o tratamento de pneumonias causadas por *Acinetobacter* multirresistente (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

1.1.2. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa*

Muitas enzimas β -lactamases plasmideais e cromossômicas têm sido reportadas em *P. aeruginosa*. Mas, em contraste com o que é observado em *Enterobacteriaceae*, nenhuma dessas enzimas é de ocorrência mundial (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Assim como *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* também produz AmpC cromossômica, porém, pode ter a sua expressão induzida por alguns antibióticos, como pelos carbapenêmicos e por inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico (BONOMO; SZABO, 2006). A produção de ESBL por *P. aeruginosa* não é comum, exceto na Turquia, onde uma ceftazidimase denominada PER-1 é identificada com frequência, (VAHABOGLU et al., 1997) e no leste asiático, onde foi relatada *P. aeruginosa* produtora de VEB-1, outra ESBL de classe A (GIRLICH et al., 2002). Penicilinas de classe D de espectro estendido, como a OXA-10 e a OXA-2, têm sido encontradas na Turquia e na França e são específicas de *P. aeruginosa* (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). Produção de enzimas metalcarbapenemases (IMP, VIM e SPM) é um dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos mais emergentes em *P. aeruginosa*. Enquanto as enzimas da família IMP e VIM são de ocorrência cosmopolita, a enzima SPM foi relatada apenas no Brasil e, mais recentemente, na Suíça. Os genes que codificam estas enzimas são mediados por plasmídeos transferíveis, porém, a disseminação de *P. aeruginosa* produtoras dessas enzimas parece estar mais relacionada com clones específicos que a transferência horizontal desses genes. Geralmente, genes *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} estão associados com integrons (LIVERMORE WOODFORD, 2006).

Apesar da ocorrência de metalcarbapenemases, o mecanismo mais comum pelo qual linhagens de *P. aeruginosa* se tornam resistentes ao imipenem está relacionado com a perda de proteína de membrana externa (porina), principalmente OprD (BONOMO; SZABO, 2006).

Resistência aos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos tem sido relatada como resultado da somatória de vários mecanismos de resistência como perda de porinas, atividade de efluxo aumentada e produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Entretanto, quanto às quinolonas, a resistência, na maioria das vezes, ocorre devido a mutações nos genes que codificam a enzima DNAGirase (BONOMO; SZABO, 2006).

Sistema de efluxo é um importante mecanismo que confere multirresistência em *P. aeruginosa*. MexAB-OprM é o sistema de efluxo mais comum e, quando superexpressada, resulta em resistência às quinolonas, penicilinas e cefalosporinas. A sensibilidade da bactéria ao meropenem pode ser reduzida, enquanto que ao imipenem não é afetada, assim como aos aminoglicosídeos (YOSHIHARA; EDA, 2007).

A polimixina B, antibiótico da classe das colistinas, é a alternativa para combater infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistente. Resistência a esse antimicrobiano é rara, porém tem sido eventualmente relatada. Alterações da membrana externa como ausência de 2-hidroxilaurato, presença de 4-aminoarabinose e aumento de palmitato na fração lipídica da membrana, são os prováveis responsáveis pela resistência à polimixina B (BONOMO; SZABO, 2006).

1.2. Definição de multirresistência e panresistência

Quando se trata de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, os conceitos de ‘multirresistência’ e ‘panresistência’ não são claros e esses termos têm sido utilizados em diferentes situações apresentando diversos significados, o que provoca confusão considerável entre a comunidade de microbiologistas. Inclusive, essas definições são, muitas vezes, utilizadas sem caracterização adequada do perfil de resistência bacteriano (FALAGAS; KOLETISI; BLIZIOTIS, 2006; PATERSON, 2006).

Segundo Falagas, Koletsi e Bliziotis (2006), os critérios utilizados pela maioria dos autores para classificação das linhagens de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* como multirresistentes e panresistentes, são os seguintes:

Para linhagens de *Acinetobacter* spp.:

- Multirresistentes – linhagem resistente a, pelo menos, três das seguintes classes e/ou antibióticos: aminoglicosídeos, penicilinas antipseudomonas, carbapenêmicos, cefalosporinas, quinolonas, colistina, ampicilina-sulbactam e tetraciclina.
- Panresistentes – linhagem resistente a todas as classes acima, inclusive à tigeciclina.

Para linhagens de *P. aeruginosa*:

- Multirresistentes – linhagem resistente a, pelo menos, três das seguintes classes de antibióticos: aminoglicosídeos, penicilinas antipseudomonas, carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas.
- Panresistentes – linhagem resistente a todas as classes acima, inclusive aos monobactâmicos e polimixina B.

1.3. Mecanismos determinantes de multirresistência

1.3.1. Integrans

A constante transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias de diferentes espécies levou ao estudo de elementos genéticos envolvidos na disseminação de resistência, como transposons, plasmídeos e, mais recentemente, integrans. Apesar de não serem móveis, por si só, os integrans são elementos genéticos considerados sistemas naturais de clonagem e expressão gênica, capazes de incorporar ORFs (*open reading frames*) tornando-as genes funcionais, portanto, favorecendo a aquisição e a incorporação de genes de resistência no genoma bacteriano (MAGNUS; MAZEL, 2001).

A estrutura funcional de um integron consiste em um gene codificador de uma integrase da família tirosina-recombinase seguido de um sítio de recombinação *attI*. A integrase catalisa a recombinação entre o sítio *attI* e um segundo sítio chamado *attC* (ou *59-base element*). O sítio *attC* é normalmente associado a uma ORF de fita simples circular, formando uma estrutura denominada cassete gênico. Esses cassetes gênicos são elementos móveis que podem ser incorporados e excisados dos integrans (CHANDLER, 2006; MAZEL, 2006; MICHAEL et al., 2004). Dependendo da sequência do gene codificador da integrase, o integron pode ser classificado em cinco classes denominados integrans de classe 1 (*intI1*), classe 2 (*intI2*), classe 3 (*intI3*), classe 4 (*intI4*) e classe 5 (*intI5*). As três primeiras são as mais relacionadas com genes de resistência a antibióticos (FLUIT; SCHMITZ, 2004).

Muitos dos genes que codificam as enzimas produzidas por *Acinetobacter* spp. e por *P. aeruginosa* fazem parte de diferentes integrans. Têm sido relatados integrans de classe 1 em linhagens de *P. aeruginosa* carreando genes que codificam carbapenemases (OXA, VIM, IMP), enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME) e, menos frequentemente, ESBL (VEB, PER) (FONSECA et al., 2005; GU et al., 2007; MANIATI et al., 2007; OHARA et al., 2007). Em *Acinetobacter* spp. os achados não são tão comuns, porém, há relatos de integrans

de classe 1 carreando genes que codificam serina-carbapenemases OXA, metalo-carbapenemase IMP e VIM, e enzimas AME (GU et al., 2007). Deste modo, os integrons de classe 1 podem estar extremamente relacionados com expressão de fenótipos de multirresistência em *Acinetobacter* spp. e em *P. aeruginosa* (BONOMO; SZABO, 2006).

1.3.2. Sistemas de efluxo

Muitas espécies de bactérias possuem sistemas para expulsão de substâncias nocivas à célula, sem modificá-las ou degradá-las, chamados sistemas de efluxo. Em bactérias gram-negativas, estes sistemas são formados pela associação, geralmente, de três subunidades: bomba (na membrana interna, que exerce a atividade de expelir substâncias), canal de saída (porina, na membrana externa) e uma proteína ligadora (ligando a bomba a porina). O papel natural da bomba de efluxo é a remoção de vários compostos como detergentes, solventes orgânicos e corantes. Do ponto de vista de resistência a antibióticos, esses sistemas possuem grande habilidade para expelir antibióticos β -lactâmicos, quinolonas e, em alguns casos, aminoglicosídeos (KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

Sistemas de efluxo são formados por proteína única ou por complexo de proteínas transmembrana. De acordo com a sequência de aminoácidos da proteína, os sistemas de efluxo são classificados em cinco grupos: *major facilitator superfamily* (MFS); *ATP-binding cassettes superfamily* (ABC); *small family multidrug resistance* (SMR); *resistance-nodulation-cell division superfamily* (RND) e *multidrug and toxic compounds extrusion* (MATE) (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; PAGÈS; MASI; BARBE, 2005).

Os sistemas de efluxo mais comuns em *P. aeruginosa* pertencem à superfamília RND e são formados, geralmente, por três subunidades. Entre esses sistemas de efluxo, destacam-se: MexAB-OprM (MexA – proteína ligadora; MexB – bomba; OprM – canal de saída) que, quando superexpressa, leva à resistência às penicilinas antipseudomonas (ticarcilina e piperacilina), cefalosporinas, quinolonas e sensibilidade reduzida ao meropenem; e MexXY-OprM (MexX – proteína ligadora; MexY – bomba; OprM – canal de saída) que se difere da primeira por diminuir a sensibilidade aos aminoglicosídeos, e, apesar de conferir resistência à cefepime, não o faz à ceftazidima. Outros sistemas de efluxo como MexCD-OprJ e MexEF-OprM também são frequentemente relatadas, porém não são ativas em tantos compostos como MexAB-OprM (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; MARTHA et al., 2006; YOSHIHARA; EDA, 2007).

Em *A. baumannii* dois sistemas de efluxo já foram relatados, AdeABC e, mais recentemente, AdeDE. O primeiro confere, à bactéria, resistência aos aminoglicosídeos,

fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e trimetoprim, enquanto que o segundo possui atividade contra amicacina, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, meropenem, rifampicina e tetraciclina (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; VILA; MARTÍ; CÉSPEDES, 2007).

O brometo de etídeo também é um composto que é eliminado através dos principais sistemas de efluxo presentes em *P. aeruginosa* (MexAB-OprM e MexXY-OprM) e em *Acinetobacter* spp. (AdeABC). Ensaio de monitoramento do acúmulo intracelular de brometo de etídeo são utilizados como triagem para avaliação de atividade aumentada de sistema de efluxo (CHO et al., 2001; GIRAUD et al., 2000; MINE et al. 1999).

1.3.3. Perda de proteínas de membrana externa

Antibióticos, como β -lactâmicos, cloranfenicol e fluorquinolonas, atravessam a membrana externa de bactérias gram-negativas via proteínas transmembrana que formam canais hidrofílicos denominados 'porinas'. Alterações no número de cópias, tamanho e seletividade dessas porinas podem dificultar a difusão de antibióticos, reduzindo a sensibilidade a tais compostos (DENYER; MAILLARD, 2002; KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

Em *P. aeruginosa*, o papel da permeabilidade da membrana celular no perfil de resistência bacteriana é muito discutido. Algumas proteínas de membrana externa merecem destaque: OprF tem sido relatada como uma das porinas não-específicas mais relatadas em *P. aeruginosa*, inclusive, conferindo fenótipos de multirresistência em linhagens selvagens. No entanto, o papel desta porina no mecanismo de resistência não está completamente elucidado, pois linhagens mutantes, produzidas em laboratório, apresentam apenas redução discreta do perfil de sensibilidade. A perda de OprD, uma porina específica de *P. aeruginosa*, é considerada o principal mecanismo de resistência ao imipenem, enquanto que a ausência da porina OprE é relatada em mutantes resistentes às quinolonas e cefalosporinas. Outra porina relacionada com resistência é a OprR, porém seu real papel no fenótipo de multirresistência ainda é desconhecido (BONOMO; SZABO, 2006; KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

De uma forma geral, redução da permeabilidade da membrana externa por perda de porina leva a baixos níveis de resistência. Em *P. aeruginosa*, essa resistência pode ser ampliada a fenótipos de multirresistência pelo efeito sinérgico entre perda de porinas e superexpressão de sistemas de efluxo. Em *A. baumannii*, a resistência aos carbapenêmicos geralmente é devida à perda de porina associada com produção de β -lactamase da classe D (DENYER; MAILLARD, 2002).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

- Determinar a participação de integrons, produção de carbapenemases, perda de porina e superexpressão de sistemas de efluxo no fenótipo de resistência em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar as espécies genômicas dos isolados de *Acinetobacter* utilizando sequências flanqueadoras e internas do gene *rpoB*;
- Determinar a ocorrência de multirresistentes e panresistentes entre os isolados estudados;
- Determinar a presença de integrons nos isolados estudados, identificando a classe dos integrons encontrados e sua frequência;
- Identificar os principais cassetes gênicos presentes nos integrons estudados;
- Identificar outros genes que conferem multirresistência, como o caso dos genes que codificam metalo- β -lactamase.
- Avaliar a superexpressão de sistemas de efluxo nos isolados estudados;
- Avaliar perda de porina nos isolados de *P. aeruginosa* estudados;
- Determinar o perfil clonal dos isolados estudados

3. Material e Métodos

3.1. Isolados bacterianas

Foram selecionados 147 *P. aeruginosa* e 57 *Acinetobacter* spp. isolados de todas as amostras clínicas, respectivamente, nos períodos de janeiro de 2000 a fevereiro de 2007 e de janeiro de 2006 a setembro de 2007, de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-UFJF), Minas Gerais. Os isolados foram identificados previamente, na rotina de diagnóstico microbiológico no Laboratório Maurílio Baldi do HU-UFJF, por ensaios manuais utilizando provas como OF-glicose, produção de oxidase, produção de pigmento, crescimento a 42°C e motilidade (BLONDEL-HILL; HENRY; SPEERT, 2007). Foram excluídas do trabalho bactérias isoladas do mesmo paciente em intervalo de tempo menor que seis meses e que apresentarem perfis de sensibilidade similares. As linhagens-controle utilizadas no trabalho estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Linhagens-controle, suas características e experimentos relacionados

LINHAGEM-CONTROLE	CARACTERÍSTICA	EXPERIMENTO
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Padrão de sensibilidade	determinação da CIM
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Padrão de sensibilidade	determinação da CIM
^a <i>K. pneumonia</i> 24	Presença de <i>intI1</i>	PCR
^b <i>E. coli</i> 3271	Presença de <i>intI2</i>	PCR
^b <i>E. coli</i> 3272	Presença de <i>intI3</i>	PCR
^c <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Padrão para ensaios de expressão	<i>real-time</i> RT-PCR

a. CLÍMACO et al, 2010

b. Linhagens controle cedida pelo Dr. Didier Mazel (Institut Pasteur, França)

c. Linhagem cedida pelo Dr. Patrick Plésiat (Universidade de Franche-Comte)

3.2. Identificação das espécies de *Acinetobacter*

A identificação das espécies genômicas foi conduzida, segundo proposto por La Scola e colaboradores (2006), estudando a sequência de fragmentos específicos do gene *rpoB* e das regiões flangeadoras desse gene. Para tanto, o fragmento intergênico denominado zona 1 foi amplificado por PCR e sequenciado (Figura 1). Segundo La Scola et al. (2006), a análise desta região é capaz de diferenciar/identificar 20 das 24 espécies genômicas existentes. As sequências da zona 1 de *A. junii* e de *A. grimontii* são idênticas, assim como de *A. baylyi* e de *Acinetobacter* gen. sp. 9. No primeiro caso, o sequenciamento da zona 2 (Figura 1) é capaz de diferenciar *A. junii* de *A. grimontii* e, no segundo caso, o sequenciamento da região flangeadora *rpoB-rpoC* (Figura 1) é capaz de distinguir entre as duas outras espécies

genômicas. A sequência da região flangeadora *rpIL-rpoB* (Figura 1) deve ser analisada apenas para confirmação de algum resultado.

A Figura 1 ilustra as regiões intragênicas e flangeadoras do *rpoB* que, segundo La Scola et al. (2006), são sequenciadas.

Figura 1 – Gene *rpoB* e regiões flangeadoras. As linhas tracejadas delimitam os fragmentos utilizados para a identificação das espécies genômicas de *Acinetobacter*; as setas representam os *primers* utilizados. Ilustração adaptada de La Scola et al., 2006.

3.3. Armazenamento das bactérias

Após a identificação e confirmação de espécie/gênero, colônias com 24 horas de crescimento em ágar Müeller Hinton (Oxoid) foram transferidas para caldo BHI acrescido de 15% de glicerol e estocadas a -80°C no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (LEBEM – FCFRP-USP).

A fim de permitir o isolamento de colônias puras e viáveis para os experimentos subsequentes, alíquotas das culturas estocadas foram cultivadas novamente em BHI, incubadas a 37°C , durante 18 – 24 horas e transferidas para ágar MacConkey (Oxoid), antes de serem submetidas aos experimentos.

3.4. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi previamente realizado, na ocasião do isolamento das bactérias, no Laboratório Maurílio Baldi do HU–UFJF, por disco de difusão, seguindo as recomendações, vigentes na época do isolamento, do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Devido ao fato dos antibióticos testados na rotina laboratorial dependerem do gênero/espécie da bactéria, do sítio da infecção, da

disponibilidade de antibióticos na farmácia hospitalar e da disponibilidade de discos de difusão utilizados no teste, muitos isolados não tiveram a sensibilidade avaliada frente a todos os antibióticos necessários. Por isso, os testes de sensibilidade para *P. aeruginosa* foram feitos e/ou repetidos para os seguintes antibióticos: gentamicina, tobramicina, amicacina, ticarcilina-clavulanato, piperacilina-tazobactam, meropenem, imipenem, ceftazidima, cefoperazona, cefepime, norfloxacin, ciprofloxacina, levofloxacina, aztreonam e polimixina B; e para *Acinetobacter* spp.: gentamicina, tobramicina, amicacina, ticarcilina-clavulanato, piperacilina-tazobactam, meropenem, imipenem, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, colistina, ampicilina-sulbactam, doxiciclina, minociclina, tigeciclina e polimixina B (Oxoid, Inglaterra). Os critérios de interpretação também seguiram as especificações do CLSI (2010), com exceção da tigeciclina, que teve o halo de inibição interpretado segundo Jones e colaboradores (2007).

Os isolados foram classificados em multirresistentes (MDR) e não-multirresistentes (n-MDR) seguindo os critérios utilizados pela maioria dos autores, conforme exposto no item 1.2, com algumas modificações. Portanto os critérios utilizados para fenótipo MDR, utilizados no presente estudo, foram os seguintes:

Para *P. aeruginosa*:

Resistência a todos os representantes testados de, pelo menos, três das seguintes classes/categoria de antimicrobianos: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, penicilinas associadas a inibidores de β -lactamase, carbapenêmicos, polimixina e demais β -lactâmico testados (cefalosporinas e aztreonam).

Para *Acinetobacter* spp.:

Resistência a todos os antimicrobianos testados de, pelo menos, três das seguintes classes/categorias: aminoglicosídeos, penicilinas antipseudomonas, carbapenêmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, colistina, ampicilina-sulbactam e tetraciclina.

Os isolados (*P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.) que apresentaram fenótipo de resistência diferente ao MDR foram classificados como não-multirresistente (n-MDR).

Não foi utilizada a classificação “panresistente” (PDR), pois nenhum isolado apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados.

3.5. Eletroforese em campo pulsado

A eletroforese em campo pulsado (PFGE, do inglês, *pulsed-field gel electrophoresis*) foi realizada segundo Gauton (1997) usando Gene Navigator System (Pharmacia Biotech, Suécia). Para o preparo dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano total, alíquotas de 1,5 mL de

cultura recente em caldo BHI (Difco) foram centrifugadas por 2 minutos, a 13000 xg, a 4°C. As células bacterianas foram lavadas com 500µL da solução de suspensão (10mM Tris, 1,0M NaCl), novamente centrifugadas, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi suspenso em 150µL de solução de suspensão e colocado em banho de água a 48°C, por 5 a 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150µL de agarose (1,5% Agarose Ultra Pure, Gibco BRL, Espanha) para a confecção dos blocos de agarose. Os blocos foram colocados em tubos contendo solução de lise (6mM Tris, pH 8,0; 1M NaCl; 100 mM EDTA; 0,5% Na laurylsarcosine) acrescido de RNase a concentração final de 20 µg/mL; foram incubados por 4 a 5 horas a 37°C. Ao final deste período, a solução tamponante foi retirada, foi adicionada a solução tamponante ES (EDTA pH 9; sarcosil 1%) acrescida de 1 mg/mL de proteinase K e os tubos foram incubados a 50°C por 18 a 20 horas. Os discos foram lavados 5 vezes com 13 mL da solução tamponante TE 1X (10mM Tris, pH7,5; 1mM EDTA, pH 8,0), com intervalo de 30 minutos para cada lavagem. Para a fragmentação do DNA, 30 U das enzimas de restrição *SmaI* e *SpeI* foi adicionada, respectivamente, para *A.baumannii* e *P. aeruginosa*. A reação foi incubada em banho de água a 37°C por 18 a 20 horas.

Para a corrida eletroforética, foram preparados 150 mL de gel de agarose 1% (Agarose Ultra Pure, Gibco BRL, Espanha) em TBE 0,5X (0,89M Tris; 0,89 M ácido bórico; 0,25M EDTA; pH 8,0). A eletroforese foi realizada com solução de TBE 0,5X à temperatura de 14°C. As condições de corrida foram padronizadas dependendo da espécie: para os isolados de *A. baumannii* foi usado voltagem de 164V e duração de 20 horas, sendo que os pulsos seguiram por duas fases: 5 segundos durante 20 horas, 15 segundos durante 1 minuto; para *P. aeruginosa* foi usado voltagem de 164V e duração de 22 horas, sendo que os pulsos seguiram por seis fases: 5 segundos durante 3 horas, 9 segundos durante 5 horas, 12 segundos durante 5 horas, 20 segundos durante 4 horas, 25 segundos durante 3 horas e 30 segundos durante 2 horas.. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo a 1 µg/mL por 30 minutos e descorados em água por mais 30 minutos. Em seguida, foram observados e fotografados usando o sistema de fotodocumentação AlphaImager® (Alpha Innotech, EUA).

Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando o programa Bionumerics versão 5.01 (Applied Maths, Bélgica). A similaridade genética dos isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice e dendrogramas foram construídos segundo o método UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Isolados com identidade genética superior a 85% foram considerados do mesmo grupo clonal e nomeados com a mesma letra maiúscula.

3.6. Detecção de integrons de classe 1, 2 e 3

A detecção foi realizada por amplificação dos genes *intI1*, *intI2* e *intI3* por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), descrita no item 3.7, utilizando *primers* específicos (Tabela 2). Ainda sim, alguns resultados foram confirmados por Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP, do inglês, *restriction fragment length polymorphism*), descrito no item 3.8.

3.7. Reação da polimerase em cadeia

PCRs foram utilizadas em algumas etapas do trabalho como: detecção de integrons, de cassetes gênicos e de outros genes de resistência, por exemplo, os genes codificadores de serino e metalo-carbapenemases. A extração do DNA genômico dos isolados bacterianas foi realizada segundo o método de Pitcher, Sanders e Owen (1989). Sequências específicas de DNA foram amplificadas por PCR utilizando os *primers* descritos na Tabela 3 e realizada utilizando os seguintes componentes para o volume de reação de 50 µL:

Tabela 2 – Composição da PCR

Componentes	Volume	Concentração final
Produto da extração de DNA (30 ng/µl)	2 µL	60 ng
Tampão para PCR de Alta Fidelidade (10X) ^a	5 µL	1X
Mistura dos 4 nucleotídeos – dNTP (2,5 mM) ^b	4 µL	0,2 mM
<i>Primer</i> 1 (16 pmol/µl)	1,5 µL	24 pmol
<i>Primer</i> 2 (16 pmol/µl)	1,5 µL	24 pmol
MgSO ₄ (50 mM) ^a	2,0 µL	2 mM
Taq-DNA Polimerase (5 U/µL) ^a	0,2 µL	1,0 U
Água duplamente processada “Qualidade PCR” ^c	q.s.p. 50 µl	_____

^a Platinum®Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen – Life Technologies, Brasil)

^b dNTP Set (Eppendorf, Alemanha)

^c W-3500 (Sigma, EUA)

Em seguida, o DNA foi inicialmente desnaturado por aquecimento a 95°C por 5 minutos. Em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos térmicos das etapas de desnaturação, *annealing* e extensão, nas seguintes condições:

- Desnaturação - 1 minuto a 95°C;
- *Annealing* - 1 minuto à temperatura de *annealing* de cada par de *primer*;
- Extensão - 1 minuto a 72°C (4 minutos para amplificação dos cassetes gênicos)

Após os 30 ciclos foi procedida uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72°C.

As etapas de amplificação utilizadas em todas as reações tiveram as mesmas condições, com exceção da temperatura de *annealing*. Os pares de *primers* utilizados, com as respectivas temperaturas de *annealing*, estão descritos na Tabela 3. O termociclador utilizado

para os experimentos foi o *Mastercycler Gradiente* (Eppendorf, Alemanha). Os produtos amplificados pelas PCR são analisados, após eletroforese (gel de agarose a 1%), coloração (brometo de etídeo a 1 µg/mL), e fotodocumentação (AlphaImager® - Alpha Innotech, EUA).

Tabela 3 – Pares de *primers* utilizados no estudo

<i>Primers</i>	Seqüência (5'–3')	Fragmento amplificado	Tamanho (pb)	Temperatura de <i>Annealing</i> (°C)	Referência
Int1-F Int1-R	GGT TCG TGC CTT CAT CCG TTT GCT TCG TGA TGC CTG CTT GTT	<i>int11</i>	698	59,8	este estudo
Int2-F Int2-R	GCT ACC CTC TGT TAT CTC TGC CGT TAT ACG GGT GGT TGC AGA	<i>int12</i>	393	59,8	este estudo
Int3-F Int3-R	GGA GGT TCA GAC GTT GCT TTC CCA GTG CAT GAG GCA GAT ACA	<i>int13</i>	290	59,8	este estudo
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	WHITE et al. 2000
5'CS-F 3'CS-R	GCT CAC GCA ACT GGT CCA GAA GCA ACA CCG ACA GGG ATG GAT	cassetes génicos	Var	61,7	este estudo
hep58 hep59	TCA TGG CTT GTT ATG ACT GT GTA GGG CTT ATT ATG CAC GC	cassetes génicos	Var	55,0	WHITE et al. 2000
IMP-P1 IMP-P2	CGA GAA GCT TGA AGA AGG TGT T CGG ACT TTG GCC AAG CTT CTA	<i>bla</i> _{IMP-2} , -8, -13, -19, -20, -24	512	58,0	este estudo
IMP-P3 IMP-P4	GAA GTT AAC GGG TGG GGC GTT CCT TTA ACC GCC TGC TCT AAT G	<i>bla</i> _{IMP-1} , -3, -4, -6, -10	578	60,0	este estudo
IMP-P5 IMP-P6	GAC AGT ACG GST GGA ATA GAG CCT TTA ACA GCC TGC TCC CA	<i>bla</i> _{IMP-12} , -14, -18	407	59,0	este estudo
IMP-P7 IMP-P8	GTA GCA TTA CTG CCG CAG GA GTA AGC TTC AAG AGC GAC GCA	<i>bla</i> _{IMP-11} , -16, -21, -22	643	59,0	este estudo
IMP-P9 IMP-P10	CCT AAA CAC GGC TTG GTG GTT GCC AAA CCA CTA CGT TAT CTG G	<i>bla</i> _{IMP-5} , -7, -9, -15	349	59,0	este estudo
VIM-P1 VIM-P2	GTT ATT GGT CTA TTT GAC CGC G CTA CTC AAC GAC TGA GCG ATT T	<i>bla</i> _{VIM-2} , -3, -6, -8, -9, -10, -11, -18	781	58,0	este estudo
VIM-P3 VIM-P4	GGT CTA CAT GAC CGC GTC TGT CTA CTC GGC GAC TGA GCG ATT	<i>bla</i> _{VIM-1} , -4, -5, -14	775	61,0	este estudo
VIM-P5 VIM-P6	CGA TGG YGT TTG GTC GCA TAT GAA TGC GCA GCA CCA GGA TA	<i>bla</i> _{VIM-7} , -12, -13	390	58,0	este estudo
SPM-F SPM-R	GAG AGC CCT GCT TGG ATT CAT CAG TCT CAT TTC GCC AAC GG	<i>bla</i> _{SPM-1}	811	59,4	este estudo
GES-F GES-R	GCG CTT CAT TCA CGC ACT ATT A CTA TTT GTC CGT GCT CAG GAT G	<i>bla</i> _{GES}	862	58,4	este estudo
KPC-F KPC-R	GTA TCG CCG TCT AGT TCT GCT G GTT GAC GCC CAA TCC CTC GA	<i>bla</i> _{KPC}	871	61,4	este estudo
OXA23-F OXA23-R	AAG CAT GAT GAG CGC AAA G AAA AGG CCC ATT TAT CTC AAA	<i>bla</i> _{OXA-23-like}	1066	52	Queenan; Bush, 2007
OXA24-F OXA24-R	GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT	<i>bla</i> _{OXA-24-like}	-	49,1	Queenan; Bush, 2007
OXA48-F OXA48-R	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	744	57,3	Queenan; Bush, 2007
OXA50-F OXA50-R	AAT CCG GCG CTC ATC CAT C GGT CGG CGA CTG AGG CGG	<i>bla</i> _{OXA-50-like}	869	58,8	Queenan; Bush, 2007
OXA55-F OXA55-R	CAT CTA CCT TTA AAA TTC CC AGC TGT TCC TGC TTG AGC AC	<i>bla</i> _{OXA-55-like}	-	51,2	Queenan; Bush, 2007
OXA58-F OXA58-R	TTA TCA AAA TCC AAT CGG C TAA CCT CAA ACT TCT AAT TC	<i>bla</i> _{OXA-58-like}	934	49,1	Queenan; Bush, 2007
OXA60-F OXA60-R	AAA GGA GTT GTC TCA TGC TGT CTC G AAC CTA CAG GCG CGC GTC TCA CGG TG	<i>bla</i> _{OXA-60-like}	-	63	Queenan; Bush, 2007
OXA69-F OXA69-R	CTA ATA ATT GAT CTA CTC AAG CCA GTG GAT GGA TGG ATA GAT TAT C	<i>bla</i> _{OXA-69-like}	975	50,1	Queenan; Bush, 2007

var: variável;

Y: C + T; R: A + G; B: T + C + G; K: T + G.

3.8. Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição

Análise de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) foi utilizada para dois propósitos neste estudo: confirmação da presença de integrons de classe 1, 2 e 3 nos isolados estudados; tipagem da região de cassetes gênicos dos integrons encontrados.

Para a confirmação da presença de integrons de classe 1, 2 ou 3, os produtos de amplificação por PCR, com os *primers* hep35 e hep36 (Tabela. 3), consensos para *intI1*, *intI2* e *intI3*, foram digeridos com as enzimas *RsaI* e *HinfI* (Invitrogen, EUA), separadamente, conforme descrito por White e colaboradores (2000). Dependendo do número e tamanho dos fragmentos obtidos, identificou-se *intI1*, *intI2* ou *intI3* (Tabela 4).

Tabela 4 – Fragmentos obtidos na RFLP para genes codificadores de integrase

PRODUTO DO PCR	ENZIMA DE RESTRIÇÃO	Nº DE FRAGMENTOS	TAMANHO DOS FRAGMENTOS (pb)
<i>intI1</i>	<i>RsaI</i>	1	491
	<i>HinfI</i>	1	491
<i>intI2</i>	<i>RsaI</i>	2	334, 157
	<i>HinfI</i>	2	300, 191
<i>intI3</i>	<i>RsaI</i>	3	97, 104, 290
	<i>HinfI</i>	2	119, 372

Para a tipagem das regiões de cassetes gênicos, fragmentos amplificados com os *primers* 5'CS-F e 3'CS-R (Tabela 3), específicos para a região do integron onde estão contidos os cassetes gênicos, foram digeridas com as enzimas de restrição *RsaI* e *HinfI*.

Os produtos de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e analisados utilizando o programa Bionumerics 5.10 (Applied Maths, Bélgica) com o qual dendrograma foi construído segundo o método UPGMA. Sequências amplificadas por PCR que apresentaram mesmo perfil de RFLP foram consideradas sequências idênticas e, portanto, regiões com mesmo arranjo de cassetes gênicos. Foi selecionado apenas um produto de amplificação de cada perfil de RFLP para ser melhor estudado por PCR e sequenciamento.

3.9. Sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados

Os fragmentos amplificados referentes à região de cassetes gênicos e aos genes codificadores de carbapenemases, obtidos por PCR, foram sequenciados para a identificação genética dos arranjos casséticos e os tipos de carbapenemase produzida.

Para o sequenciamento, os produtos amplificados foram purificados com o *kit* de purificação GFX-TM PCR (GE Healthcare, Reino Unido).

Todas as etapas do sequenciamento foram realizadas em placas de 96 poços. Para a etapa de amplificação foram utilizados 30 ciclos de 20 segundos a 95°C (desnaturação), 15 segundos a 50°C (*annealing*) e 1 minuto e 20 segundos a 60°C (extensão). Em seguida o produto amplificado foi precipitado com acetato de amônio 7,5M e etanol 95% e então sequenciado no MegaBACETM 1000 (Amersham Bioscience, Suécia). As seqüências obtidas foram analisadas no programa ChromasPro versão 1.33 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e comparadas às seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

3.10. Estudo da cinética de acúmulo intracelular de brometo de etídeo

O brometo de etídeo é um substrato dos principais sistemas de efluxo presentes em *P. aeruginosa* (MexAB-OprM e MexXY-OprM) e *Acinetobacter* spp (AdeABC). Ensaio de monitoramento do acúmulo intracelular de brometo de etídeo foram utilizados como triagem para identificação de atividade aumentada de sistema de efluxo.

O monitoramento da cinética de acúmulo de brometo de etídeo foi realizado por ensaios fluorimétricos, segundo descrito por Magnet e colaboradores (2001). Foram analisados 45 *P. aeruginosa*, selecionados de acordo com os perfis de sensibilidade e demacrorestrição determinado por PFGE. Todos os isolados de *Acinetobacter* spp foram avaliados por esse ensaio, exceto um que não atingiu o crescimento necessário no tempo de análise. As células bacterianas foram cultivadas em caldo LB (Luria-Bertani) a 37°C até que atingiram densidade óptica de 0,5 em 600 nm, foram centrifugadas, suspensas em solução tamponada de fosfato de sódio (pH 7,0) à densidade óptica de 0,2 em 600 nm. Para avaliar a atividade de sistemas de efluxo, foi adicionado brometo de etídeo na concentração final de 2 µg/mL e, após 7 min de incubação, foi acrescido um inibidor da bomba de efluxo, o carbonil cianido *m*-clorofenilhidrazona (CCCP), na concentração final de 100 µM. A intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}}$, 530 nm; $\lambda_{\text{emissão}}$, 600 nm) emitida pelo brometo de etídeo que se intercala ao DNA bacteriano intracelular foi monitorada por até 12 min, utilizando o espectrofluorômetro Synergy 2 (Bio-Tek Kontron Instruments, França) com sistema de injeção automatizada.

O ensaio cinético nos forneceu variações da intensidade de fluorescência, que é quantificado pelo tempo analisado que gerou duas retas por regressão linear múltipla. O coeficiente angular de cada reta – que reflete o grau de inclinação da reta – é proporcional à

taxa de interiorização do brometo de etídeo, ou seja, quanto mais rápido aumenta a concentração de brometo de etídeo intracelular, maior a variação da fluorescência por unidade de tempo e, conseqüentemente, maior o coeficiente angular da reta. A variação do coeficiente angular da primeira reta (antes da adição do inibidor da bomba de efluxo, CCCP) para o coeficiente angular da segunda reta (após a adição de CCCP) é proporcional à expressão de bombas de efluxo na bactéria.

3.11. Estudo da expressão gênica por *real-time* RT-PCR

Alguns isolados foram selecionados de acordo com o perfil de sensibilidade e de PFGE, totalizando 41 *P. aeruginosa* (18 MDR e 23 n-MDR) e 54 *Acinetobacter* spp. (48 MDR e 6 n-MDR) para os estudos de expressão gênica. Foram investigadas expressão aumentada das bombas de efluxo *mexY*, *mexB* e *mexD* (relacionadas aos sistemas de efluxo MexXY-OprM, MexAB-OprM, MexCD-OprJ) em *P. aeruginosa*, e *adeA* (relacionado com o sistema de efluxo AdeABC) em *Acinetobacter* spp. Além disso, redução da expressão da porina OprD também foi investigada em *P. aeruginosa*.

A expressão desses genes foi avaliada por *real-time* PCR após transcrição reversa (*real-time* RT-PCR). Para isso, RNA total dos isolados, em fase exponencial de crescimento, foi extraído utilizando o *kit* RNAeasy (Qiagen, EUA). O RNA foi quantificado espectrofotometricamente a 260 nm, utilizando o espectrofotômetro GeneQuant (Biochrom, Inglaterra), e o DNA contaminante foi removido com o *kit* DNaseI *treatment* (Promega, EUA). Os RNAm contidos no RNA total foram convertidos em cDNA utilizando RT-PCR utilizando a enzima SuperScript III (Invitrogen, EUA), foram quantificados e a concentração de cada amostra foi ajustada para 100ng/μL com água deionizada, esterilizada, ultrapurae livre de DNA (Sigma).

A quantificação relativa dos transcritos dos genes *mexB*, *mexY*, *mexD* e *oprD* (para *P. aeruginosa*) e *adeA* (para *Acinetobacter* spp.) foi realizada por *real-time* PCR utilizando o sistema Fast Eva[®] Green (Biotium, EUA). As amostras foram analisadas em triplicatas sendo aceitos resultados com desvio padrão menor que 0,4. Os *primers* utilizados e as condições dos ciclos de cada *real-time* PCR estão detalhados na Tabela 5.

Tabela 5 – Primers e condições utilizadas para as reações de *real-time* PCR

Gene alvo	Primers		Quantidade de cDNA (ng) / reação	Ciclos	
	designação	sequências (5'-3')		Ativação da enzima	Amplificação (45 X)
<i>mexY</i>	MxY-U	GGACCACGCCGAAACCGAACG	1,0	2min/ 96°C	10s/ 96°C; 10s/ 58°C; 30s/ 72°C
	MxY-L	CGCCGCAACTGACCCGCTACA	1,0		
<i>mexB</i>	MxB-U	CAAGGGCGTCGGTGACTTCCAG	0,5	2min/ 96°C	10s/ 96°C; 30s/ 60°C
	MxB-L	ACCTGGGAACCGTCGGGATTGA	0,5		
<i>mexD</i>	MxD-For	GGACGGCTCGTGGTCCGGCT	1,0	2min/ 96°C	10s/ 96°C; 60s/ 60°C
	MxD-Rev	CGACGAAGCGCGAGGTGTCGT	1,0		
<i>oprD</i>	OprD-For	GCTCGACCTCGAGGCAGGCCA	0,5	2min/ 96°C	10s/ 96°C; 30s/ 60°C
	OprD-Rev	CCAGCGATTGGTCGGATGCCA	0,5		
<i>adeB</i>	AdeB-For	AACGGACGACCATCTTTGAGTATT	1,0	2min/ 96°C	10s/ 96°C; 10s/ 56°C; 30s/ 72°C
	AdeB-Rev	CAGTTGTTCCATTTCACGCATT	1,0		

Os primers para os normalizadores foram:

Gene *rpsL*: Rspl-1 (5'-GCTGCAAACTGCCCGCAACG-3') e Rspl-2 (5'-ACCCGAGGTGTCCAGCGAACC-3')

Gene *rpoB*: rpoB-For (5'-GAGTCTAATGGCGGTGGTTC-3') e rpoB-Rev (5'-ATTGCTTCATCTGCTGGTTG-3')

A análise dos dados foi realizada a partir dos valores de Ct (do inglês, *cycle threshold*) observados em cada reação. O Ct corresponde ao número de ciclos requeridos para a fluorescência liberada pela reação alcançar um limiar de detecção (*threshold*). O nível do Ct é inversamente proporcional à quantidade de DNA alvo na amostra. Portanto, aumento da expressão de bomba de efluxo, por exemplo, pode ser visualizado, *a priori*, por um Ct reduzido, já a diminuição da expressão de porina, por uma bactéria, pode ser identificada com um Ct aumentado, em relação à média. Entretanto para uma quantificação mais precisa, o valor do Ct do gene estudado foi normalizado com o Ct apresentado pela amplificação do gene normalizador. Para isso usou-se o cálculo “ $2^{-\Delta Ct}$ ”, onde ΔCt é igual ao CT do gene alvo menos o Ct do normalizador. O valor de $2^{-\Delta Ct}$ é diretamente proporcional à expressão genética, ou seja, quanto maior o valor obtido de $2^{-\Delta Ct}$, maior a quantidade de ácido nucléico na amostra e, conseqüentemente, maior a expressão do gene alvo. Após esse tratamento, foi possível a comparação dos dados obtidos entre os isolados, portanto, a quantificação relativa da expressão dos genes investigados para os isolados MDR foram comparados com os isolados n-MDR.. Os genes normalizadores utilizados no estudo foram os genes *rpsL* e *rpoB* para, respectivamente, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (MANIATI et al., 2007; RUZIN; KEENEY; BRADFORD, 2007).

3.12. Métodos estatísticos utilizados

Relação entre a presença ou ausência dos integrons com os diversos fenótipos de resistência apresentados pelos isolados estudados foram avaliadas utilizando-se o Teste Exato de Fischer, quando se comparou duas variantes com duas possibilidades cada, ou o Teste Qui-

quadrado, quando se considerou variantes com mais de duas variações. Foram calculados estatisticamente o *Odds Ratio* (OR), ou seja, a razão de chance de um evento acontecer, e o intervalo de confiança (IC), que nos indica o quão confiável foi o valor calculado. Foram considerados estatisticamente significantes valores de *P* menores do que 0,05 (PAGANO; GAUVREAU, 2004),.

Para analisar se houve diferença entre os coeficientes angulares das retas geradas antes e após o acréscimo do inibidor de bomba de efluxo, no estudo da cinética de acúmulo intracelular de brometo de etídeo se diferenciam, foi aplicado o modelo estatístico do teste *t* para medidas pareadas (PAGANO; GAUVREAU, 2004), bicaudal, ao nível de significância de 5%, com 56 replicações do experimento, para *Acinetobacter* spp. e com 45 replicações de experimento, para *P. aeruginosa*.

Gráficos boxplot foram construídos com os valores da variação entre os coeficientes angulares das retas, antes e após a adição de CCCP, nos ensaio cinético da interiorização do brometo de etídeo, apresentados pelas populações bacterianas agrupadas de diferentes maneiras.

O boxplot permite avaliar a simetria dos dados, sua dispersão e a existência ou não de dados que não destoam dos mesmos (*outliers*), sendo especialmente adequado para a comparação de dois ou mais conjuntos de dados correspondentes às categorias de uma variável qualitativa.

Teste Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) foi utilizado para analisar os dados da *real-time* PCR ($2^{-\Delta CT}$) e verificar diferenças entre a expressão das bombas de efluxo MexY, MexB, MexD, AdeB e da porina OprD entre isolados MDR e n-MDR. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1. Identificação das espécies genômicas de *Acinetobacter*

A zona 1 do gene *rpoB* dos isolados de *Acinetobacter* spp. foi sequenciada e comparada com sequências registradas no GenBank, de acordo com La Scola e colaboradores (2006). Dos 57 isolados estudados, 54 foram similares à zona 1 de *A. baumannii*, com a identidade variando de 98,5 a 100%. Esses resultados confirmam que a grande maioria dos isolados pertencem à espécie *A. baumannii*.

Três isolados apresentaram outras sequências de DNA na zona 1 do gene *rpoB*: um deles (Ac14) foi similar (99%) à de *Acinetobacter* gen. sp. 13TU; a sequência de outro isolado (Ac29) foi similar (99%) à de *Acinetobacter* gen. sp. 3; e a sequência de um terceiro isolado (Ac17) foi similar à de *A. baylyi* (98%) e à de *A. guillouiae* (99%) (Figuras 2 e 3)

Para esse último isolado (Ac17), a sequência do espaçador *rpoB-rpoC* foi determinada na tentativa de identificar a espécie genômica. O fragmento obtido foi de 220 pb, superior ao esperado para as duas alternativas, e com porcentagens de identidade muito baixas em relação às sequências de *A. baylyi* e *A. guillouiae* (76% e 85%, respectivamente). Desta forma, as análises das outras duas sequências propostas por La Scola e colaboradores (2006), a zona 2 e o espaçador *rplL-rpoB*, foram também realizadas. A zona 2 do isolado Ac17 foi 99% similar à zona 2 de *A. guillouiae* (GenBank FJ754461) e 98% à zona 2 de *A. baylyi* (FJ754448). A sequência do espaçador *rplL-rpoB* da linhagem Ac17 teve 98% de identidade em relação à sequência de *A. guillouiae* (DQ207412) e 97% de *A. baylyi* (DQ207408).

A Tabela 6 resume a identidade dos fragmentos sequenciados do isolado Ac17 com sequências encontradas no GenBank. E a Figura 2 demonstra a relação entre os isolados de *Acinetobacter* spp. e sequências registradas no GenBank, de acordo com a análise apenas do gene *rpoB*.

Tabela 6 – Resumo da identidade dos fragmentos sequenciados do isolado Ac 17 com sequências encontradas no GenBank

GenBank número de acesso	<i>Acinetobacter</i> Ac17			
	Zona 1 (304 pb)	Zona 2 (397 pb)	<i>rplL-rpoB</i> (308 pb)	<i>rpoB-rpoC</i> (220 pb)
<i>A. baylyi</i> (DQ207408)	98%	98%	97%	76%
<i>A. guillouiae</i> (DQ207412)	99%	99%	98%	85%

Figura 2 – Dendrograma representando a relação filogenética entre os isolados de *Acinetobacter* spp., usando o método *neighbor-joining*. A árvore foi derivada do alinhamento das sequências referentes à zona 1 do gene *rpoB*. As marcações em vermelho são sequências registradas no GenBank representando a zona 1 da linhagem *A. baumannii* EU445603, *Acinetobacter* gen. sp. 3 EU445679, *Acinetobacter* gen. sp. 13TU EU445621 e *A. guillouiae* FJ754461. A escala 0,02 se refere a 2 mutações a cada 100 nucleotídeos.

4.2. Perfil de resistência

De acordo com o perfil de sensibilidade apresentado pelos isolados estudados no antibiograma (Apêndices A e B), estes foram classificados conforme o item 3.4. Foram

encontradas 62 *P. aeruginosa* (do total de 147) e 48 *A. baumannii* (do total de 54) que apresentaram perfil de multirresistência (MDR). As outras espécies genômicas de *Acinetobacter* identificadas no trabalho não apresentaram perfil MDR. Nenhum isolado de ambos os gêneros se mostrou panresistente.

Os antimicrobianos aos quais os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram menor sensibilidade foram as fluoroquinolonas, levofloxacina (38,1%), ciprofloxacina (40,1%) e norfloxacina (41,5%). Por outro lado, o antibiótico que se apresentou mais efetivo *in vitro* contra os isolados de *P. aeruginosa* foi a polimixina B (100%), seguida do imipenem (62,6%), amicacina (61,9%) e do meropenem (60,5%). A Figura 3 demonstra, em porcentagens, resultado dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa*.

Figura 3 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das linhagens de *P. aeruginosa*. AMI, amicacina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; LEV, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; CFP, cefoperazona; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; TAC, ticarcilina com clavulanato; PTZ, piperacilina com tazobactam; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B.

Os isolados de *A. baumannii* apresentaram perfis de resistência mais homogêneos do que os de *P. aeruginosa*. As menores porcentagens de sensibilidade entre esses isolados foram à cefotaxima (nenhum dos isolados) e, em seguida, ciprofloxacina, levofloxacina, piperacilina com tazobactam (7,4%, 7,4%, 9,3%, respectivamente). Os antimicrobianos ampicilina com sulbactam, imipenem, polimixina B, colistina, doxicilina e minociclina inibiram 100% dos isolados testados. A Figura 4 apresenta o resultado dos testes de sensibilidade dos isolados de *A. baumannii* estudados perante os antimicrobianos testados.

Figura 4 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das linhagens de *Acinetobacter baumannii*. AMI, amicacina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; AMS, ampicilina com sulbactam; PTZ, piperacilina com tazobactam; TAC, ticarcilina com clavulanato; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B; CT, colistina; DO, doxiciclina; MH, minociclina; TGC, tigerciclina.

Os 3 isolados de *Acinetobacter* que não pertencem à espécie *A. baumannii* foram mais sensíveis que aqueles que pertencem: os isolados Ac17 e Ac29 se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos com exceção da cefotaxima, que se apresentaram intermediários; o isolado Ac14 se mostrou sensível à maioria dos antimicrobianos exceto cefotaxima e cefepime, aos quais foi intermediário, e aminoglicosídeos, aos quais foi resistente.

4.3. Eletroforese em campo pulsado

De 147 *P. aeruginosa*, 144 foram tipáveis por PFGE e três tiveram o DNA degradado e não foram tipáveis. De acordo com o dendrograma construído a partir dos perfis migratórios dos fragmentos de DNA digeridos dos isolados (Figura 5), foram encontrados 20 grupos clonais; dois principais grupos, A e B, contendo, respectivamente, 44 e 28 dos isolados estudados. Os outros grupos foram compostos por 1 a 11 isolados. Dos 62 isolados MDR, 31 (50%) foram do grupo A e 13 (21%) pertencem ao grupo clonal B (Figura 5).

A Figura 6 mostra a distribuição temporal dos isolados pertencentes aos dois principais grupos clonais. Os dois grupos se alternaram na prevalência entre os isolados do período estudado. Disseminação clonal do grupo A provocou surtos desse clone durante o 1º semestre de 2004 e durante o 2º semestre de 2005. Os outros grupos clonais foram isolados ao longo do período do estudo sempre em menor quantidade que os grupos A e B.

Figura 5 – Dendrograma de similaridade genômica representativo dos perfis de PFGE apresentado pelos isolados de *P. aeruginosa*. Os grupos clonais A e B estão detalhados mostrando a ocorrência de fenótipo MDR, integron de classe 1 e SPM. Alguns grupos do dendrograma foram condensados (triângulos cinza) e o número de isolados pertencente a cada grupo está mostrado à frente do grupo clonal. A linha pontilhada representa o ponto de corte para definição de grupos clonais. * Pa110 (grupo A) apresentou *intI3*; ** Pa123 (grupo O), *intI2*; *** Pa30 (grupo H) é produtora de SPM.

Figura 6 – Gráfico mostrando o número de isolados de *P. aeruginosa* pertencentes ao grupo clonal A (vermelho) e ao grupo clonal B (azul) ao longo do período estudado. O período foi apresentado em semestres.

Dos 54 isolados de *A. baumannii* estudados, apenas um não foi tipado por PFGE, devido à degradação do DNA. De acordo com os perfis migratórios dos fragmentos de DNA digerido, foi construído um dendrograma (Figura 7) que evidenciou 8 grupos clonais distintos. Dois deles foram predominantes, A' e B', com 30 e 15 isolados, respectivamente. Os outros 6 grupos apresentaram no máximo dois isolados.

Dos 48 isolados MDR, 93,8% pertenciam aos grupos clonais A' e B': todos os 30 isolados do grupo A' e todos os 15 isolados do grupo B' eram MDR.

De acordo com a Figura 8, ocorreram surtos clonais de *Acinetobacter* spp. ao longo do período estudado, de forma que os grupos clonais foram se alternando. Primeiramente o grupo clonal B' foi responsável pelo surto ocorrido no 3º trimestre de 2006 e, em seguida, o grupo clonal A' pelo surto ocorrido no 1º trimestre de 2007.

Figura 7 – Dendrograma de similaridade genômica representativo dos perfis de PFGE apresentado pelos isolados de *Acinetobacter* spp. Os grupos clonais A' e B' estão em destaque. Isolados apresentando fenótipo MDR, integron de classe 1 e 2 estão mostrados. A linha pontilhada representa o ponto de corte para definição dos grupos clonais.

Figura 8 – Gráfico mostrando o número de isolados de *Acinetobacter* spp. pertencentes ao grupo clonal A' (vermelho) e ao grupo clonal B' (azul) ao longo do período estudado. O período foi apresentado em trimestres.

4.4. Detecção de integrons de classe 1, 2 e 3

De acordo com a pesquisa de integrons por amplificação direta dos genes *intI1*, *intI2* e *intI3* com *primers* específicos (Tabela 2), dos 147 isolados de *P. aeruginosa* investigados, 65 (44,2%) apresentaram integrons de classe 1; apenas um isolado (Pa123) apresentou integron de classe 2; e outro isolado (Pa110), que já havia apresentado integron de classe 1, apresentou também integron de classe 3. A pesquisa de integrons realizada pela análise de RFLP, após amplificação do gene *intI*, segundo White e colaboradores (2000) apresentou alguns resultados falso-negativos quando comparados à amplificação direta dos genes *intI1*. Dos 65 isolados, que apresentaram amplificação direta de *intI1* por PCR, apenas 45 apresentaram resultados positivos pelo método de White e colaboradores (2000). Por outro lado, a presença de integrons de classe 2 e 3, nos isolados Pa123 e Pa110, respectivamente, foi confirmada por essa metodologia.

Houve relação entre a presença de integrons de classe 1 e os tipos clonais A, B e J, os quais apresentaram, respectivamente, 75% (33/44), 57% (16/28) e 100% (4/4) dos integrantes contendo tais elementos (Figura 5).

Dentre a coleção de *Acinetobacter* spp., integrons foram detectados apenas em *A. baumannii*: 11 isolados apresentaram fragmento amplificado do gene *intI1* com os *primers* Int1-F e Int1-R e, apenas um desses isolados teve a confirmação da presença de integron de classe 1 segundo a metodologia proposta por White e colaboradores (2000). No entanto, por essa última metodologia integrons de classe 2 foram detectados em 30 isolados, enquanto esses elementos haviam sido evidenciados em apenas 23 isolados, utilizando PCR específico para *intI2*. Nenhum isolado apresentou integron de classe 3 por qualquer metodologia.

Assim como para *P. aeruginosa*, houve relação entre presença de integrons e grupos clonais (Figura 7). Os 30 isolados de *Acinetobacter* spp. que continham integrons de classe 2 pertenciam ao grupo clonal A', representando 100% dos isolados desse grupo. Dos 11 isolados *A. baumannii* portadores de integron de classe 1, 8 pertenciam ao grupo clonal B', representando 53,3% dos isolados deste grupo. Dos outros três isolados portadores de integron de classe 1, um apresentou perfil clonal A' e os outros, perfil clonal C' (Figura 7).

4.5. Integrons vs. Resistência

A Tabela 7 demonstra a associação da presença de integrons de classe 1, 2 e 3 com o fenótipo de multirresistência em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

Tabela 7 – Relação da presença de integrons de classe 1, 2 e 3 na determinação de fenótipo MDR

<i>P. aeruginosa</i>						<i>A. baumannii</i>					
		MDR	n-MDR	<i>P</i>	OR	IC	MDR	n-MDR	<i>P</i>	OR	IC
<i>intI1</i>	+	54	11	<0.0001	45,41	17,11 a 120,5	11	0	0,5710	3,373	0,1730 a 65,77
	−	8	74				37	5			
<i>intI2</i>	+	1	0	−	−	−	30	0	0,0052	21,43	1,139 a 403,2
	−	51	95				18	6			
<i>intI3</i>	+	1	0	−	−	−	0	0	−	−	−
	−	51	95				48	6			

MDR: fenótipo multirresistente; n-MDR: fenótipo não multirresistente.

P valor < 0,05

OR: Odds ratio

IC: Intervalo de confiança

Dos 62 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes, em 54 (87,1%) foi encontrado integron de classe 1, porém, esse elemento também foi detectado em 11 isolados não-multirresistentes. Segundo o P valor (<0,05), a relação entre a presença de integron de classe 1 e fenótipo MDR é significativa. De acordo com o Odds ratio, calculado para essa comparação, a possibilidade de encontrar tal fenótipo em *P. aeruginosa* é cerca de 45× maior para os isolados que contêm integrons de classe 1 do que para os que não contêm.

Dos 48 isolados de *A. baumannii* multirresistentes, 11 (23,4%) contêm integron de classe 1 e 30 (62,5%) contêm integrons de classe 2. De acordo com os P valores, a relação entre o fenótipo MDR e a presença de integron de classe 1 não é estatisticamente significativa ($P \geq 0,05$), enquanto a relação deste fenótipo com a presença de integrons de classe 2 é estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Os valores dos Odds ratio calculados indicam que a chance de *A. baumannii* apresentar multirresistência é cerca de 21× maior se esse possui

integron de classe 2, em comparação com os isolados que não possuem tais elementos. Tais resultados são validados pelos intervalos de confiança (Tabela 7). Nenhum dos isolados não-multirresistente apresentou integron de classe 1, 2 ou 3.

Não foi possível avaliar estatisticamente a influência de integrons de classe 2 e 3 nos fenótipos de multirresistência de *P. aeruginosa*, devido ao baixo número de isolados que continham tais elementos genéticos.

Foi analisada, também, a relação da presença de integrons de classe 1, 2 com a resistência dos isolados estudados a cada antimicrobiano testado. As Tabelas 8, 9 e 10 ilustram esses dados.

Tabela 8 – Associação entre a sensibilidade aos antimicrobianos e presença de integrons de classe 1 em 147 isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiótico	Total dos isolados (n=147)			Isolados com <i>intI1</i> (n=65)			Isolados sem <i>intI1</i> (n=82)			P valor
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
AMI	53	3	91	50	3	12	3	0	79	<0,0001
GEN	68	2	77	64	1	0	4	1	77	<0,0001
TOB	69	0	78	65	0	0	4	0	78	<0,0001
CIP	82	6	59	64	0	1	18	6	58	<0,0001
NOR	82	4	61	64	0	1	18	4	60	<0,0001
LEV	86	5	56	64	0	1	22	5	55	<0,0001
CAZ	54	7	86	40	3	22	14	4	64	<0,0001
CFP	75	11	61	56	7	2	19	4	59	<0,0001
FEP	44	17	86	40	7	18	4	10	68	<0,0001
AZT	40	43	64	26	28	11	14	15	53	<0,0001
TAC	84	0	63	61	0	4	23	0	59	<0,0001
PTZ	62	0	85	45	0	20	17	0	65	<0,0001
IMP	51	4	92	46	3	16	5	1	76	<0,0001
MER	56	2	89	51	1	13	5	1	76	<0,0001
PB	0	0	147	0	0	65	0	0	82	–

AMI, amicacina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; LEV, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; CFP, cefoperazona; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; TAC, ticarcilina com clavulanato; PTZ, piperacilina com tazobactam; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B.

Em azul são os P valores que indicam significância estatística.

Analisando os dados da Tabela 8, constata-se o quão relacionados os integrons de classe 1 estão com fenótipos de resistência em *P. aeruginosa*. De acordo com os P valores calculados, existe significância estatística entre a presença de integron de classe 1 no genoma dos isolados de *P. aeruginosa* e resistência a todos os antimicrobianos testados, com exceção da polimixina B. Dos isolados resistentes à amicacina, gentamicina e tobramicina, respectivamente, 94,3% (50/53), 94,1% (64/68) e 94,2% (65/69) apresentaram integrons de classe 1. Portanto, a resistência aos aminoglicosídeos é uma das resistências mais prováveis de ser apresentada pelos isolados que contêm tais integrons.

Analisando a presença de integrons de classe 1 e sua influência na resistência dos isolados de *A. baumannii* (Tabela 9), somente a resistência à tobramicina está estatisticamente relacionada com estes elementos. Esses integrons parecem desempenhar papel mais importante na resistência bacteriana de *P. aeruginosa* do que de *A. baumannii*.

Tabela 9 – Associação entre a sensibilidade aos antimicrobianos e presença de integrons de classe 1 em 54 isolados de *Acinetobacter baumannii*

Antibiótico	Total dos Isolados (n=54)			Isolados com <i>intI1</i> (n=11)			Isolados sem <i>intI1</i> (n=43)			P valor
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
AMI	42	4	8	11	0	0	31	4	8	0,1390
GEN	36	11	7	11	0	0	25	11	7	0,0316
TOB	33	0	21	11	0	0	22	0	21	0,0038
CIP	50	0	4	11	0	0	39	0	4	0,5707
LEV	49	1	4	11	0	0	38	1	4	0,4942
CAZ	48	0	6	11	0	0	37	0	6	0,3272
CTX	48	6	0	11	0	0	37	6	0	–
FEP	47	1	6	11	0	0	36	1	6	0,3572
SAM	0	0	54	0	0	11	0	0	43	–
PTZ	38	11	5	10	1	0	28	10	5	0,2265
TAC	47	0	7	11	0	0	36	0	7	0,3224
IMP	0	0	54	0	0	11	0	0	43	–
MER	2	5	47	1	2	8	1	3	39	0,2732
PB	0	0	54	0	0	11	0	0	43	–
CT	0	0	54	0	0	11	0	0	43	–
DO	0	0	54	0	0	11	0	0	43	–
MH	0	0	54	0	0	11	0	0	43	–
TGC	0	24	30	0	10	1	0	14	29	0,0012

AMI, amicacina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; AMS, ampicilina com sulbactam; PTZ, piperacilina com tazobactam; TAC, ticarcilina com clavulanato; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B; CT, colistina; DO, doxiciclina; MH, minociclina; TGC, tigerciclina.
Em azul são os P valores que indicam significância estatística.

Para esses isolados de *A. baumannii*, a resistência parece estar mais relacionada aos integrons de classe 2 (Tabela 10). Conforme os P valores, esses elementos têm relação estatística com resistência à amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, levofloxacina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, piperacilina com tazobactam e ticarcilina com clavulanato.

Apesar de não ter achado *A. baumannii* resistente à tigeciclina, a presença de integrons de classe 1 foi relacionada com diminuição da sensibilidade a esse antimicrobiano (fenótipo intermediário), conforme o P valor (Tabela 9).

Devido ao fato de ter encontrado poucos isolados de *P. aeruginosa* contendo *intI2* e 3 as relações destes elementos com a resistência apresentada por tais isolados não foram avaliadas estatisticamente.

Tabela 10 – Associação entre a sensibilidade aos antimicrobianos e presença de integrons de classe 2 em 54 isolados de *Acinetobacter baumannii*

Antibiótico	Total dos isolados (n=54)			Isolados com <i>intI2</i> (n=30)			Isolados sem <i>intI2</i> (n=24)			P valor
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
AMI	42	4	8	29	1	0	13	3	8	0,0007
GEN	36	11	7	24	6	0	12	5	7	0,0051
TOB	33	0	21	21	0	9	12	0	12	0,1666
CIP	50	0	4	30	0	0	20	0	4	0,0336
LEV	49	1	4	30	0	0	19	1	4	0,0336
CAZ	48	0	6	30	0	0	18	0	6	0,0052
CTX	48	6	0	30	0	0	18	6	0	0,0052
FEP	47	1	6	29	1	0	18	0	6	0,0052
MAS	0	0	54	0	0	30	0	0	24	–
PTZ	38	11	5	21	9	0	17	2	5	0,0094
TAC	47	0	7	29	0	1	18	0	6	0,0362
IMP	0	0	54	0	0	30	0	0	24	–
MER	2	5	47	0	0	30	2	5	17	–
PB	0	0	54	0	0	30	0	0	24	–
CT	0	0	54	0	0	30	0	0	24	–
DO	0	0	54	0	0	30	0	0	24	–
MH	0	0	54	0	0	30	0	0	24	–
TGC	0	24	30	0	10	20	0	14	10	0,0987

AMI, amicacina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; AMS, ampicilina com sulbactam; PTZ, piperacilina com tazobactam; TAC, ticarcilina com clavulanato; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B; CT, colistina; DO, doxiciclina; MH, minociclina; TGC, tigerciclina.

Em azul são os P valores que indicam significância estatística.

4.6. Estudo dos cassetes gênicos

Os isolados que apresentaram gene *intI1* e, portanto integrons de classe 1, foram utilizados em reações de amplificação das regiões dos cassetes gênicos, utilizando os *primers* 5'CS-F e 3'CS-R, listados na Tabela 2. De acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados e com o perfil de restrição desses fragmentos (utilizando as enzimas *RsaI* e *HinfI*), foram estimadas a quantidade e a variabilidade de integrons.

Dos 11 isolados de *A. baumannii*, nos quais foram detectados integrons de classe 1, apenas Ac50 apresentou fragmento de DNA amplificado por PCR utilizando os *primers* acima referidos de aproximadamente 3000pb. Reações de amplificação utilizando novas sequências de *primers* para região de cassetes gênicos foram testadas e mesmo assim não foi possível obter os cassetes gênicos dos outros 10 isolados.

Entre os 65 isolados de *P. aeruginosa* que continham integrons de classe 1, 62 apresentaram amplificação da região de cassetes gênicos que variaram de 400 a 4000 pb. Os isolados Pa27, Pa45 e Pa110 não apresentaram nenhum produto amplificado.

Dos 62 que apresentaram amplificação da região de cassetes gênicos, 25 *P. aeruginosa* apresentaram amplificação de 450pb e 15 amplificação de 400pb. Os outros 22 isolados apresentaram fragmentos de tamanhos variados (1300-4000pb). Os fragmentos de 400 e 450pb não apresentaram sítios de restrição para as enzimas *RsaI* e *HinfI* e foram considerados como tipo I e II, respectivamente. Três amostras representantes de cada um dos dois tipos foram

sequeenciadas a fim de identificar o cassette gênico. Dentre as outras que apresentaram amplificação diferente desses dois fragmentos, foram encontrados 9 tipos de arranjos de cassetes gênicos, quando analisados os perfis de RFLP por digestão com as enzimas *RsaI* e *HinfI*. A Figura 9 mostra o perfil de restrição da região cassette desses 22 isolados de *P. aeruginosa*.

Conforme os resultados do sequenciamento das regiões de cassetes gênicos, os genes mais encontrados conferem resistência aos aminoglicosídeos. Os tipos III, IV e VI, apesar dos RFLPs distintos, apresentaram o mesmo arranjo de cassetes constituído por um único cassette gênico conhecido como *aacA4* o qual codifica uma acetiltransferase que confere resistência aos aminoglicosídeos gentamicina e canamicina. Este cassette também pertence ao tipo XI, juntamente com outro cassette gênico, o *bla_{OXA-21}* que codifica uma β -lactamase da classe D de Ambler (1980). As sequências dos tipos VII e VIII mostraram o mesmo arranjo de cassetes gênicos (*aadA6-orfD*), o primeiro confere resistência à estreptomicina e espectimicina, e o segundo codifica uma proteína de função ainda desconhecida. Já os tipos IX e X mostraram sequências similares aos cassetes gênicos *aadB*, que codificam uma aminoglicosídeo (3') adenililtransferase, e um cassette *aadA-like*. Os I, II, que amplificaram fragmentos de tamanho pequeno, mostraram sequências que não codificam gene algum, sugerindo que estejam vazios. O tipo V não gerou sequências passíveis de análise.

Figura 9 – Dendrograma mostrando os 9 perfis de RFLP das regiões de cassetes gênicos, após amplificação por PCR e digestão com *RsaI* e *HinfI*, de 22 isolados de *P. aeruginosa*.

4.7. Pesquisa de genes codificadores de carbapenemases

Foram pesquisados genes codificadores das seguintes famílias de carbapenemases: as metalo- β -lactamases, VIM, IMP, SPM, GIM e SIM, e as serina-carbapenemases, KPC, GES e OXA. Esses genes foram pesquisados por PCR, utilizando os *primers* descritos na Tabela 3, nos isolados resistentes à ceftazidima, imipenem ou meropenem, pois, linhagens de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. que produzem tais enzimas apresentam resistência a, pelo menos, um desses antibióticos.

Figura 10 – Géis de agarose 1% demonstrando a migração eletroforética dos fragmentos de *bla*_{SPM-1} amplificados por PCR. M: marcador de massa molecular de 100pb; ctrl +: *E. coli* p2381 SPM-1, controle positivo para a presença de *bla*_{SPM-1}. Os isolados Ps32, Ps58 e Ps54 estão em duplicata.

Nenhum dos isolados de *Acinetobacter* spp. apresentou produção de MBL. Dentre os isolados de *P. aeruginosa*, 24 apresentaram fragmentos amplificados de 811pb compatíveis

com o gene *bla_{SPM-1}* (Figura 10); destes, 23 pertencem ao grupo clonal A e um (Pa30) ao grupo clonal H. Nenhum gene codificador de outra carbapenemase estudada foi detectado.

4.8. Estudo da cinética de acúmulo intracelular de brometo de etídeo

Inicialmente, como forma de controle do experimento, foi testada a hipótese de igualdade dos coeficientes angulares das retas obtidas antes e depois da adição do inibidor de bomba de efluxo, CCCP.

Para o experimento conduzido com os isolados de *Acinetobacter* spp. a média amostral das diferenças entre as retas foi 0,862, com desvio padrão 0,3301; o valor resultante do teste foi $T=19,409$ ($p<0,005$), maior que o valor tabelado 2,0003 da distribuição $t(55)$ (PAGANO; GAUVREAU, 2004), levando à rejeição da hipótese de igualdade dos coeficientes. Para os isolados de *P. aeruginosa*, a média amostral das diferenças entre as retas foi 0,679, com desvio padrão 0,3039; o valor resultante do teste foi $T=14,981$ ($p<0,005$), maior que o valor tabelado 2,0141 da distribuição $t(44)$ (PAGANO; GAUVREAU, 2004), levando novamente à rejeição da hipótese de igualdade dos coeficientes angulares das retas.

Os valores das diferenças entre os coeficientes angulares da segunda reta (após a adição de CCCP) e da primeira reta (antes da adição de CCCP) apresentado por cada isolado analisado (56 *Acinetobacte* spp. e 45 *P. aeruginosa*) são detalhados nos Apêndices A e B.

Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as variações dos coeficientes angulares apresentados pelos isolados MDR em relação aos apresentados pelos isolados n-MDR, tanto para *Acinetobacter* spp. (Figura 11-A) quanto para *P. aeruginosa* (Figura 11-B).

Comparando os resultados da cinética do brometo de etídeo apresentados pelos grupos de *Acinetobacter* spp. com diferentes perfis de resistência aos antibióticos testados, não foi encontrado nenhuma correlação evidente da resistência com o grau de variação das inclinações das retas (Apêndice C). Essa mesma análise realizada com os isolados de *P. aeruginosa*, também nos levou ao mesmo resultado (Apêndice D).

Figura 11 – *Boxplot* da distribuição dos isolados n-MDR e MDR em relação à variância do coeficiente angular das retas geradas pelo ensaio cinético da interiorização do brometo de etídeo. A, referente aos isolados de *Acinetobacter* spp.; B, referente aos isolados de *P. aeruginosa*.

4.9. Análise da expressão de sistema de efluxo e porina

O método de *real-time* RT-PCR possibilitou a quantificação relativa da transcrição dos genes *mexB*, *mexY* e *mexD*, relacionados com sistemas de efluxos em *P. aeruginosa* e do gene *adeB*, relacionado com sistema de efluxo em *Acinetobacter* spp. A expressão da porina OprD de *P. aeruginosa* também foi avaliada por esse mesmo método.

Inicialmente os genes mencionados acima, assim como os genes normalizadores utilizados (*rspL* e *rpoB*) foram amplificados por PCR convencional e visualizados após eletroforese em gel de agarose para constatar a presença dos genes alvo no genoma dos isolados estudados. Todos os isolados apresentaram os fragmentos esperados.

Pela *real-time* PCR para o cDNA derivado dos transcritos do gene *mexB*, as amostras amplificaram produtos com temperatura de *melting* (T_m) que variaram de 85,5 a 86,2°C e os valores do Ct variaram de 17,53 a 36,16. A análise da temperatura de *melting* de um produto de amplificação é útil para verificar se a reação é específica ou se há a amplificação de produtos inespecíficos. A figura 12 mostra o monitoramento da reação de amplificação e da curva de desnaturação para *mexB*.

Os produtos amplificados na *real-time* PCR específica do gene *mexY* geraram produtos de T_m que variaram de 89,8 a 90,4 °C com Ct variando de 20,18 a 36,78. Pela figura 13-A nota-se duas populações bacterianas que sugerem expressões de *mexY* distintos.

Figura 12 – Dados da *real-time* RT-PCR para o gene *mexB* de *P. aeruginosa* obtidos por monitoramento da fluorescência durante a reação de amplificação (A) e durante a curva de desnaturação (B).

Figura 13 – Dados da *real-time* RT-PCR para o gene *mexY* de *P. aeruginosa* obtidos por monitoramento da fluorescência durante a reação de amplificação (A) e durante a curva de desnaturação (B).

Pela *real-time* PCR realizada para a quantificação relativa ao gene *mexD*, produtos amplificados de Tm variando de 87,6 a 88,4°C foram obtidos. Os valores de Ct foram menos heterogênicos que os anteriores, variando deste 23,81 a 34,44 (Figura 14).

Figura 14 – Dados da *real-time* RT-PCR para o gene *mexD* de *P. aeruginosa* obtidos por monitoramento da fluorescência durante a reação de amplificação (A) e durante a curva de desnaturação (B).

Para a análise da bomba de efluxo *adeB*, presente em *Acinetobacter* spp., os produtos amplificados tiveram T_m que variaram de 77,2 a 78,0°C (Figura 15). Os valores de C_t obtidos foram de 22,89 a 35,3.

Figura 15 – Dados da *real-time* RT-PCR para o gene *adeB* de *Acinetobacter* spp. obtidos por monitoramento da fluorescência durante a reação de amplificação (A) e durante a curva de desnaturação (B).

A *real-time* PCR realizada para avaliação da porina OprD gerou produto amplificado com T_m variando de 86,3 a 87,3. Os valores de C_t sugerem populações bacterianas

apresentando expressões da porina OprD em níveis distintos, assim como foi visualizado na para *mexY* (Figura 16). A variação do Ct entre os isolados de *P. aeruginosa* foi 20,34 a 38,71.

Figura 16 – Dados da *real-time* RT-PCR para o gene *oprD* de *P. aeruginosa* obtidos por monitoramento da fluorescência durante a reação de amplificação (A) e durante a curva de desnaturação (B).

Após a obtenção dos valores de Ct da amplificação de cada gene para cada isolado, esse valor foi normalizado, ou seja, foi comparado ao Ct da amplificação de cDNA derivados do gene constitutivo (*rspL*, para *P. aeruginosa* e *rpoB*, para *Acinetobacter* spp.). O método utilizado para a normalização foi $2^{-\Delta Ct}$, onde ΔCt é a variação do Ct obtido pelo gene alvo menos o Ct obtido pelo gene normalizador.

Os valores de $2^{-\Delta Ct}$ obtidos de cada gene analisado para isolados MDR foram comparados aos valores obtidos para os n-MDR e estão discriminados nas Tabelas 11 e 12. A diferença (ou igualdade) entre esses dados foi calculada estatisticamente, conforme explicado no item 3.12

Tabela 11 – Expressão de bombas de efluxo e porina por *P. aeruginosa* MDR e n-MDR em associação com os perfis de resistência/intermediário e de PFGE

	PFGE	Isolado (Pa)	Perfil de resistência/intermediário	$2^{\Delta CT}$			
				MexY	MexB	MexD	OprD
Fenótipo MDR	A	32	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP, IPM, MEM	0,201660	0,303549	0,000043	0,113440
	A	45	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP, IPM, MEM	0,169576	0,161544	0,000307	0,054409
	A	54	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, TIM, IPM, MEM	0,236514	0,057114	0,001620	0,043586
	A	77	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, ATM, TIM, IPM, MEM	0,154963	0,269807	0,000018	0,118257
	A	98	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CFP, FEP, ATM, TIM, IPM, MEM	0,019237	0,408951	0,000005	0,000132
	A	111	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP, IPM, MEM	0,129408	0,103665	0,000063	0,025383
	A	144	CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP	0,004503	2,867910	0,000065	1,658639
	B	2	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CFP, ATM, TIM, TZP	0,152830	0,197510	0,000052	0,049721
	B	136	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP, IPM, MEM	0,127627	0,408951	0,001522	0,341510
	C	27	GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP	0,019505	0,223756	0,000074	0,000019
	C	114	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CFP, ATM, TIM, TZP, IPM, MEM	0,016980	0,148651	0,000008	0,000008
	E	129	CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP, MEM	0,016824	0,064257	0,000109	0,003521
	F	117	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP, IPM, MEM	0,002328	0,108067	0,000009	0,035649
	H	30	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP, IPM, MEM	0,204476	0,188156	0,000383	0,015410
	J	38	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, ATM, TIM, IPM, MEM	0,059954	0,870551	0,000057	0,000066
	N	31	GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP	0,031467	1,239708	0,000119	0,882703
	O	123	AMK,GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP, IPM, MEM	0,049549	0,022097	0,004876	0,046391
	P	115	GEN, TOB, CIP, NOR, LVX, CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP	0,045753	0,007977	0,000153	0,149685
Fenótipo n-MDR	A	14	-	0,000020	0,088388	0,000135	0,000581
	A	90	GEN, TOB, CIP, LVX, CFP, ATM, TIM, IPM, MEM	0,013139	0,566442	0,000066	0,070316
	A	102	CIP, LVX	0,001490	0,181747	0,000009	0,038741
	A	142	LVX, CFP, ATM, TIM	0,005154	1,424050	0,000003	0,000018
	B	22	-	0,008032	0,225313	0,000098	0,757858
	B	87	ATM	0,000132	1,189207	0,000020	0,046714
	B	99	GEN, CIP, LVX, FEP	0,102949	0,031686	0,000057	0,000138
	C	44	-	0,002182	0,858565	0,000380	0,489710
	D	24	-	0,003023	0,417544	0,000135	0,002307
	D	53	CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP	0,011359	0,081900	0,000149	0,036651
	E	113	AMK,GEN, TOB, CIP, LVX, ATM, TIM	0,021493	0,190782	0,000089	0,000006
	F	39	CAZ, CFP, ATM, TIM, TZP	0,005524	0,166086	0,000098	0,099442
	G	3	AMK,GEN, TOB, CIP, LVX, CFP, FEP, ATM, TIM, MEM	0,002631	0,329877	0,000179	0,160428
	G	18	-	0,006302	0,153893	0,000357	0,239816
	H	50	ATM	0,028360	0,615572	0,000155	0,125000
	I	15	-	0,002781	0,089622	0,000185	0,144586
	I	64	CAZ, CFP, FEP, ATM, TIM, TZP	0,004776	0,078021	0,000147	0,244855
	L	51	-	0,006045	0,301452	0,000063	0,100830
	M	12	CIP, LVX, CFP, ATM, TIM, TZP	0,287175	0,173139	0,000220	0,348686
	M	21	-	0,001460	0,376312	0,000106	0,085971
	N	83	CIP, LVX	0,174343	0,047696	0,000017	0,184284
	R	19	-	0,008729	0,293209	0,000425	0,453760
	T	9	CIP, LVX, CFP, TIM	0,068869	0,066986	0,000039	0,117440

AMK, amicacina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; LVX, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; CFP, cefoperazona; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; TIM, ticarcilina-ácido clavulânico; TZP, piperacilina-tazobactam; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

Tabela 12 – Expressão de bomba de efluxo por *Acinetobacter* spp. MDR e n-MDR em associação com os perfis de resistência/intermediário e PFGE e presença de integrons

	PFGE	Isolado (Ac)	Perfil de resistência/intermediário	2 ^{-ΔCt}	Classe de integron
				AdeB	
Fenótipo MDR	A*	007	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, TGC	1,892115	2
	A*	009	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, TGC	0,901250	2
	A*	012	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP	0,594604	2
	A*	015	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, TGC	0,510506	2
	A*	016	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, TGC	3,138336	1,2
	A*	026	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,453760	2
	A*	027	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,469761	2
	A*	031	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,163799	2
	A*	032	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,149685	2
	A*	033	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,473029	2
	A*	034	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,243164	2
	A*	035	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,323088	2
	A*	036	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,420448	2
	A*	037	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	1,853176	2
	A*	038	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	1,753211	2
	A*	039	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,747425	2
	A*	040	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,846745	2
	A*	041	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,732043	2
	A*	042	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	2,128740	2
	A*	046	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,466516	2
	A*	047	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,747425	2
	A*	049	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	1,840375	2
	A*	051	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,784584	2
	A*	052	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	3,784231	2
	A*	053	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,806642	2
	A*	055	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	2,789487	2
	A*	057	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	15,242208	2
	A*	058	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	2,584706	2
	A*	059	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	1,140764	2
	A*	063	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TZP	4,500234	2
	B*	003	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	1,602140	1
	B*	010	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,716978	-
	B*	011	GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,795536	-
	B*	013	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,307786	1
	B*	018	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	2,848100	1
	B*	019	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,993092	1
	B*	020	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,397768	1
	B*	021	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,305660	1
	B*	022	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,312083	1
	B*	023	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,312083	1
	B*	024	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	1,222640	-
	B*	030	GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,325335	-
	B*	061	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	0,812252	-
	B*	062	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	5,133704	-
	B*	064	AMK, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	2,584706	-
	C*	025	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	0,562529	1
	C*	050	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM	1,494849	1
	D*	008	AMK, GEN, CIP, LVX, CAZ, CTX, FEP, TIM, TZP, MEM, TGC	1,505247	-
n-MDR	D*	056	CTX	2,602684	-
	E*	054	CTX	0,051474	-
	F*	060	CTX	0,801070	-
	G*	043	CIP, LVX, CTX	1,064370	-
	H*	048	CTX	0,000614	-
	NT	028	CTX, TZP, MEM	0,198884	-

AMK, amicacina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; LVX, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; TIM, ticarcilina-ácido clavulânico; TZP, piperacilina-tazobactam; IPM, imipenem; MEM, meropenem. NT, não tipável.

Observando as Figuras 17 e 18, nota-se que as distribuições dos valores de 2^{-ΔCt} nos grupos analisados não seguem comportamento normal, isto é, não são distribuídos simetricamente ao redor da média. Por isso, as medianas foram comparadas nas Figuras 18 e

19 e não suas médias. A diferença entre os grupos foi estimada tendo o p valor calculado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW).

Estatisticamente, não houve diferença significativa entre os valores de $2^{-\Delta Ct}$ das *P. aeruginosa* MDR e n-MDR para *mexB* e *mexD*, pois o p valor foi $> 0,05$. Porém os valores de $2^{-\Delta Ct}$ para *mexY* e *oprD* entre os dois grupos de *P. aeruginosa* são estatisticamente diferentes, com $P=0,0017$ e $0,0302$, respectivamente. De acordo com Figura 17, a mediana apresentada pelos isolados MDR para a expressão de *mexY* (0,05475) foi quase 10X maior que a mediana apresentada pelo grupo n-MDR (0,006045). Enquanto que foi observada redução de 66,4% na mediana da expressão de *oprD* pelos isolados MDR (0,03962) em relação à mediana apresentada pelos isolados n-MDR (0,1178) (Figura 17).

Figura 17 – Escatergramas mostrando a distribuição dos valores de $2^{-\Delta Ct}$, calculados com os dados das *real-time* PCR para *mexB*, *mexY*, *mexD* e *oprD*, entre os isolados MDR e n-MDR em *P. aeruginosa*.

Figura 18 – Escatergrama mostrando a distribuição dos valores de $2^{-\Delta C_t}$, calculados com os dados das *real-time* PCR para *adeB*, entre os isolados MDR e n-MDR em *Acinetobacter* spp.

Os valores de $2^{-\Delta C_t}$, calculados para a expressão de AdeB, não foram estatisticamente distintos entre os grupos *Acinetobacter* spp. MDR e n-MDR, com $P=0,1911$ ($>0,05$).

5. Discussão

Muito tem se estudado sobre *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., dois dos mais importantes patógenos bacterianos, principalmente em relação à infecção adquirida em hospital e seus mecanismos de resistência. Porém, muitos desses trabalhos avaliam os mecanismos de resistência separadamente ou ainda pela caracterização detalhada em linhagens bacterianas específicas (KOHLER et al., 1999; OCHS et al., 1999; SILVA et al. 2011; VOGNE et al., 2004). A grande importância do presente estudo e o que o diferencia dos outros é a abordagem abrangente e a análise dos determinantes genéticos atuantes no fenótipo da população bacteriana como um todo, através de métodos estatísticos. Dessa forma, possibilitou a estimativa da contribuição dos principais mecanismos de resistência no fenótipo de multirresistência de uma coleção de *P. aeruginosa* e de *Acinetobacter* spp.

A metodologia de identificação mais aceita atualmente e que melhor reuni praticidade e confiabilidade é baseada no sequenciamento de fragmentos do gene *rpoB* e de seus flaqueadores (LA SCOLA et al., 2006). De acordo com os resultados obtidos, a metodologia empregada para a identificação de espécies de *Acinetobacter* apresentou excelente desempenho, principalmente pela análise da sequência da zona 1, pela qual foi capaz de identificar 56 dos 57 isolados de *Acinetobacter* spp., entre eles *A. baumannii* (96,4%), *Acinetobacter* gen. sp. 3 (1 isolado) e um *Acinetobacter* gen. sp. 13TU (1 isolado). Esses dados confirmam estudo prévio desenvolvido por Gundi e colaboradores (2009) o qual validaram o sequenciamento da zona 1 como método para identificação de *Acinetobacter* spp. As espécies identificadas no presente estudo também foram observadas por Gundi e colaboradores: *A. baumannii* (52,5%), *Acinetobacter* gen. sp. 3 (27,3%) e *Acinetobacter* gen. sp. 13TU (1%). No presente trabalho, não foi possível identificar 1 isolado pelo sequenciamento apenas da zona 1, pois este apresentou alta similaridade com duas espécies (*A. baylyi* e *A. guillouiae*), sendo necessário o sequenciamento de outros fragmentos (zona 2, espaçadores *rpoB-rpoC* e *rpIL-rpoB*), ainda sim a identificação destas duas espécies foi bastante imprecisa. Por isso, esta metodologia deve ser válida perante isolados de *Acinetobacter* spp. originados de diferentes partes do mundo é extremamente importante para a avaliação de tal método.

Além disso, já era esperado que a identificação de espécies genômicas raras fosse mais difícil, uma vez que este método de identificação se baseia em comparação da sequência obtida com sequências registradas em bancos de dados (GenBank). Uma vez que sequências representativas das espécies genômicas são raras nestes bancos de dados, a análise comparativa é prejudicada. Quanto mais sequências analisadas e registradas houverem, maior será a diversidade de sequências conhecidas, aumentando a eficiência e confiabilidade da metodologia.

Comparar os nossos dados em relação à frequência de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multirresistentes com os dados relatados por outros autores no mundo é difícil, pois, como publicado por Falagas, Koletsi e Bliziotis (2006), não existe um consenso em relação ao termo multirresistência (MDR) entre os autores que o usam, podendo este termo ser utilizado com diferentes significados. Estabelecer critérios para padronizar a utilização deste termo também é difícil, pois há diferentes enfoques pelos quais a resistência de um microrganismo: pode ser analisado como o enfoque clínico, o qual se preocupa com a patologia infecciosa, sua terapia e leva em considerações variáveis como o sítio anatômico; o enfoque biológico, o qual se considera a inibição *in vivo* do microrganismo e seus mecanismos de resistência etc. Para solucionar este paradigma, sempre que se usar termos como multirresistência e panresistência, o autor deve detalhar bem sobre os critérios utilizados para sua classificação (FALAGAS; KOLETSI; BLIZIOTIS, 2006).

Comparando as taxas de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos encontrados nesse estudo com dados publicados por outros autores, nota-se que *P. aeruginosa* se mostrou mais sensível à amicacina, carbapenêmicos e polimixina B, tanto neste estudo quanto em estudo realizado na Europa (MESAROS et al., 2007), porém as porcentagens de sensibilidade variam. Enquanto as taxas encontradas por Mesaros e colaboradores (2007) foram de 100% de sensibilidade à amicacina e 80% de sensibilidade ao meropenem, neste estudo, os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram 61,9% e 60,5% de sensibilidade à amicacina e ao meropenem, respectivamente. Para os demais antimicrobianos, os mesmos pesquisadores europeus acharam sensibilidade em torno de 60%. Neste estudo, essa taxa variou de 38,1% (levofloxacina) até 58,5% (ceftazidima e cefepime).

Gales e colaboradores (2001) publicaram dados do SENTRY, indicando disparidade entre as taxas de resistência de *Acinetobacter* spp. isoladas nos Estados Unidos e Canadá com as isoladas na América Latina. Os dados do presente estudo se enquadram melhor aos dados das linhagens isoladas na América Latina, o que já era esperado. Mesmo assim, para alguns antimicrobianos, as taxas de sensibilidade encontradas são ainda inferiores. Enquanto que Gales e colaboradores (2001) relataram 25,9% de sensibilidade à ceftazidima, 25% à piperacilina com tazobactam, 29,7% à ciprofloxacina, 32,2% à amicacina e 88,7% ao meropenem, o presente estudo encontrou 22%, 20%, 19%, 23,8% e 88% de sensibilidades aos antimicrobianos acima descritos.

Esta baixa sensibilidade aos antimicrobianos apresentada pelos isolados de *Acinetobacter* spp. do atual estudo, foi observada pela grande frequência de isolados MDR

(84,2%). Essa grande desproporção apresentada entre o número de isolados de *Acinetobacter* spp. MDR e n-MDR pode ter comprometido, em parte, as análises estatísticas.

Os resultados da tipagem por PFGE permitem constatar que, ao longo dos sete anos, período de obtenção dos isolados de *P. aeruginosa*, dois tipos clonais se destacaram pela multirresistência e presença de elementos genéticos associados com resistência (integrons e gene *bla_{SPM}*). Este fato sugere que tais elementos favoreçam a permanência desses clones em ambiente hospitalar explicando, em parte, a alternância desses dois tipos clonais na predominância. Outros grupos clonais menos resistentes surgiam e desapareciam ao acaso ao longo do período estudado.

No caso dos isolados de *Acinetobacter* spp., também se constatou dois grupos clonais predominantes, porém, o período de isolamento foi curto (de aproximadamente 1 ano e meio) e, portanto, não podemos concluir se a presença desses dois grupos é constante. Também, nesses dois grupos clonais se concentram os isolados mais resistentes e os que contêm integrons de classe 1 e 2, dentre os *Acinetobacter* spp. Por isso foram os dois grupos que causaram surtos ao longo do período estudado.

Os genes codificadores de enzimas integrase, essenciais ao funcionamento dos integrons e que os classificam nas três classes de interesse clínico, foram pesquisados. A investigação foi conduzida, inicialmente, por PCR com *primers* específicos para os genes *intI1*, *intI2* e *intI3*, e em seguida confirmados por RFLP gerados pela digestão, com *RsaI* e *HinfI*, do fragmento, amplificado com *primers* consenso, segundo White e colaboradores (2000). Essa segunda metodologia, descrita por White e colaboradores, vem sendo utilizada para a investigação de integrons por outros autores (BEUTLICH et al. 2010; OPINTAN et al. 2008), e foi utilizada aqui para confirmação dos resultados obtidos por PCR, como meio de validação dos dados. No presente estudo, a metodologia proposta por White e colaboradores (2000) foi eficaz na detecção de integrons de classe 2 do que a metodologia utilizando PCR convencional. Em contrapartida, o método de White e colaboradores foi menos eficiente na detecção de integrons de classe 1.

A percentagem de *P. aeruginosa* portadora de integrons de classe 1 encontrada neste estudo (44,2%) foi similar ao encontrado por Fonseca e colaboradores em estudo realizado, em 2005, no Amazonas (41,5%). No entanto, esse grupo de pesquisadores não encontrou integrons de classe 2 ou 3, e, neste estudo, foram detectados um isolado portador de integron de classe 2 e outro com integron de classe 3. Em Nanjing, China, a porcentagem de *P. aeruginosa* portadora de integron de classe 1 foi 40,8% (Gu et al., 2007).

Gu e colaboradores encontraram 52,8% de *Acinetobacter* spp. contendo integrons de classe 1 na China. No Reino Unido essa frequência foi de 60% (Gu et al., 2007). No presente trabalho foi detectada frequência bastante inferior a estes, 17,5% de *Acinetobacter* spp. continham integrons de classe 1.

De acordo com os resultados sobre a presença de integrons e os fenótipos de resistência, os integrons de classe 1 estão estatisticamente relacionados ao fenótipo MDR em *P. aeruginosa*. Entretanto, este fato implica apenas que as duas características (presença de integrons de classe 1 e fenótipo MDR) ocorrem, na maioria das vezes, de forma concomitante. Atribuir aos integrons de classe 1 a razão para o fenótipo multirresistente apresentado por tais isolados seria precipitado e para tal conclusão experimentos adicionais seriam necessários. Neste intuito foi realizada amplificação e sequenciamento dos cassetes gênicos para verificar se tais integrons carregam genes que poderiam justificar o fenótipo MDR. Pelo sequenciamento dos cassetes gênicos encontrados, genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos foram identificados na maioria das vezes. Portanto, a presença dos integrons representa importante marcador do fenótipo MDR, porém não são eles os elementos encarregados por tal fenótipo. Isto pode ser explicado pelo fato dos integrons serem, normalmente, carregados por plasmídeos que contêm outros genes de resistência localizados fora da região de cassetes gênicos, como por exemplo, genes que codificam algumas carbapenemases (como as SPM-1 identificadas no trabalho). Portanto, a relação entre presença de integrons e fenótipo MDR pode ser devido a outros genes que coexistem com os integrons no mesmo plasmídeo.

Além dos integrons de classe 2 terem sido mais frequentes que integrons de classe 1, entre os isolados de *Acinetobacter* spp., aqueles elementos parecem estar mais relacionados com o fenótipo MDR, devido os *Odds ratio* calculados em cada caso. Os valores indicaram que a chance de um isolado de *Acinetobacter* spp. ser MDR é cerca de 10× maior para os que possuem integrons de classe 2 do que para os que não possuem.

A relação encontrada entre a presença de integrons e resistência dos isolados de *P. aeruginosa* a cada antimicrobiano, foi semelhante ao encontrado por Gu et al. (2007): relação estatisticamente significativa entre integrons de classe 1 e resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cefalosporinas, penicilinas antipseudomonas, aztreonam e carbapenêmicos.

Para os isolados de *Acinetobacter* spp., essas relações foram divergentes. Enquanto Gu e colaboradores encontraram relação entre a presença de integrons de classe 1 e resistência a todos os antibióticos acima citados, incluindo sulfametoxazol e tetraciclina, neste estudo foi constatada relação apenas com resistência ao aminoglicosídeo, tobramicina e redução da

sensibilidade à tigeciclina. Porém, integrons de classe 2 apresentaram relação estatisticamente significativa com resistência aos aminoglicosídeos (exceto tobramicina), quinolonas, cefalosporinas, piperacilina com tazobactam e ticarcilina com clavulanato.

Como dito anteriormente, o estudo dos cassetes gênicos se fez extremamente importante para a elucidação da participação dos integrons como determinantes dos fenótipos MDR. As reações de sequenciamento da região de cassetes gênicos evidenciaram a predominância de genes que conferem resistência a aminoglicosídeos, similarmente ao relatado em estudo prévio (PARTRIDGE et al., 2009). Alguns destes cassetes gênicos são bastante relatados, como o caso do *aacA4* e *aadB* e outros não são comuns como *aadA6* (PARTRIDGE et al., 2009). A predominância em *P. aeruginosa* dos cassetes das famílias *aacA* e *aadA* já tinha sido descrita por Severino e Magalhães (2002). O único cassete gênico encontrado que confere resistência a antibióticos não aminoglicosídeos foi o *bla_{OXA-21}*, que codifica uma oxacilinase que não se sabe, ao certo, se sua atividade é clássica (conferindo resistência a ampicilina, cefalotina, oxacilina, cloxacilina etc), ou se sua atividade é estendida às cefalosporinas de terceira e quarta geração, como as ESBL (BRADFORD, 2001).

Além disso, a porcentagem de integrons de classe 1 vazios foi bastante alta, provando que, apesar desses elementos estarem presentes em linhagens multirresistentes, e servirem como marcados moleculares de isolados MDR, não são esses determinantes de multirresistência.

Inicialmente, não havia sido incluído no trabalho, o estudo de genes codificadores de metalo- β -lactamase que não se localizassem em integrons como cassetes gênicos, como o caso do gene *bla_{SPM-1}*. Entretanto, as MBL são enzimas que têm capacidade de hidrolisar β -lactâmicos de diferentes categorias (cefalosporinas, penicilinas antipseudomonas, carbapenêmicos, etc), o que já seria capaz de conferir fenótipo MDR à bactéria que produz tais enzimas.

Foram pesquisadas enzimas dos principais grupos das MBL (VIM, IMP, SPM, SIM e GIM) e a serino-carbapenemase KPC. Apenas genes *bla_{SPM}* foram detectados em *P. aeruginosa* deste estudo, a maioria delas pertencentes ao mesmo grupo clonal A, indicando uma disseminação de perfil clonal no hospital durante o período estudado. Como relatados em alguns estudos (PELLEGRINO et al., 2006; DOI et al., 2007), a produção de MBL por *P. aeruginosa* isolada no Brasil é, na maioria das vezes, devida a um clone endêmico brasileiro produtor da enzima SPM-1, apesar das enzimas VIM e IMP já terem sido descritas no Brasil (MENDES et al., 2004; SADER et al., 2005). A enzima SPM-1, que é facilmente detectada por possui grande potencial de hidrólise a todos os β -lactâmicos com exceção do aztreonam,

tinha sido isolada apenas no Brasil, entretanto, Salabi e colaboradores (2010) identificaram esta enzima pela primeira vez na Europa, produzida por *P. aeruginosa* isolada de paciente suíço.

Os resultados apresentados no presente trabalho estão em acordo com outros estudos no Brasil que relatam a disseminação de uma linhagem produtora de SPM comum ao território nacional (GALES et al., 2003; SILVA et al, 2011) Trabalhos com *multilocus sequence typing* (MLST) mostraram que o ST referente ao clone brasileiro produtor de SPM-1 já havia sido reportado na Áustria, China e Austrália (FONSECA; FREITAS; VICENTE, 2010). No entanto, além dos isolados pertencentes ao grupo clonal A, houve um isolado do grupo clonal H (Pa30) que também apresentou o gene *bla_{SPM-1}*. Fato semelhante foi publicado por Silva e colaboradores (2011), que caracterizou linhagens produtoras de SPM-1 com perfis de PFGE relacionados, mas de ST não relacionados. Isto sugere que, apesar de ser um evento raro, a transmissão de plasmídeo contendo *bla_{SPM-1}* entre as linhagens pode ocorrer e que é alarmante para a ocorrência de disseminação não só de clones, mas também de plasmídeos que conferem MDR.

O aumento da expressão de sistema de efluxo é mais um mecanismo pelo qual algumas bactérias se tornam resistentes a diversos antimicrobianos. A pesquisa de efluxo aumentado foi conduzida pela análise cinética da interiorização de brometo de etídeo e por *real-time* RT-PCR.

Na primeira metodologia, a fluorescência emitida por esse composto aumenta à medida que alcança o espaço intracelular e se intercala ao genoma bacteriano. A atividade de sistemas de efluxo, que é inversamente proporcional à interiorização do brometo de etídeo, é também inversamente proporcional à emissão de fluorescência. Porém, não se deve comparar diretamente a quantidade de fluorescência entre duas células bacterianas, pois, esse sinal não reproduz com exatidão atividade dos sistemas de efluxo, sofrendo influência de variáveis como a quantidade de células, concentração de brometo de etídeo etc. Por isso, foi usado inibidor de bomba de efluxo e observado a mudança de comportamento da taxa de interiorização antes e após a adição desse composto. Desta forma, A variação sofrida na inclinação da reta desenhada com as medidas das fluorescências emitidas, com a adição do inibidor é diretamente proporcional ao nível de expressão de bombas de efluxo.

Apesar dessa relação entre a variação da cinética de interiorização do brometo de etídeo e atividade de sistema de efluxo, os dados obtidos no presente estudo não mostram nenhuma relação entre a variação da interiorização do brometo de etídeo e multirresistência; ou ainda, entre variação da interiorização do brometo de etídeo e resistência a qualquer um dos

antimicrobianos analisados. Duas hipóteses podem justificar esses resultados: i. a percentagem de isolados que apresentam expressão aumentada de sistemas de efluxo pode ser baixa na coleção estudada; ii. a interiorização do brometo de etídeo pode ser influenciada por outros fatores ou até mesmo por sistemas de efluxo que não têm associação com resistência bacteriana que podem estar presente em alguns isolados.

Vários trabalhos na literatura científica citam essa metodologia para a análise da atividade de sistema de efluxo, porém, a grande maioria deles aplicou tal método na comparação entre o fenótipo selvagem e mutante de uma mesma linhagem bacteriana (MAGNET, COURVALIN, LAMBERT, 2001; MINE et al., 1999). Para essa finalidade, o aumento da interiorização do brometo é uma resposta mais precisa da inibição do sistema de efluxo, pois as linhagens (selvagens e mutante) possuem as mesmas características e menos variáveis.

Apenas Vogne e colaboradores (2004) relataram a utilização desta metodologia para pesquisa de atividade aumentada de efluxo em uma população bacteriana isolada de amostras clínicas, como a investigada no presente trabalho, porém os autores obtiveram resultados inconclusivos. Desta forma, métodos mais sensíveis e mais específicos são necessários para o estudo da expressão desses sistemas de efluxo. Uma alternativa, que foi conduzida neste trabalho, é a utilização de *real-time* RT-PCR para quantificar RNAm específicos destes sistemas de efluxo.

Muitos estudos de expressão de sistema de efluxo e porinas, realizados por *real-time* RT-PCR, baseiam-se a análise na comparação dos resultados de expressão das linhagens investigadas com os da linhagem padrão PAO1. A partir dessa comparação, pontos de cortes foram definidos e resultados acima destes são considerados como expressão aumentada (HOCQUET et al, 2006; QUALE et al, 2006; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ; POIREL; NORDMANN, 2009; XAVIER et al. 2010;). Devido à heterogeneidade dos isolados estudados, ou seja, isolados provenientes de diferentes clones, possuindo diferentes genomas, foi preferido, para o presente trabalho, que a análise comparativa dos dados obtidos por *real-time* PCR fosse entre os grupos MDR e n-MDR. Desta forma minimizaria as variações ocorridas naturalmente, já que ambos os grupos foram formados por isolados pertencentes a diferentes grupos clonais (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Muitos autores destacam a importância da atividade dos sistemas de efluxo no fenótipo de resistência bacteriana (HOCQUET et al, 2006; MIDDLEMISS; POOLE, 2004; XAVIER et al. 2010). O sistema MexAB-OprM está envolvido em resistência a quinolona, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol, novobiocina e muitos β -

lactâmicos, exceto imipenem (MIDDLEMISS; POOLE, 2004). Rodríguez-Martínez, Poirel e Nordmann (2009) relataram 28% de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapênicos superexpressando a bomba *mexB* (expressão, pelo menos, 2X aumentada em relação à PAO1). Estudo com isolados brasileiros mostrou 27,1% das linhagens com expressão aumentada de MexXY-OprM (Xavier et al., 2010). De acordo com a análise estatística realizada no presente trabalho, não houve diferença entre a expressão da bomba *mexB* dos grupos MDR e n-MDR, ainda que isolados expressando *mexB* em níveis 2X maior que a PAO1, tenha sido encontrada no grupo MDR e n-MDR. Isso indica que, apesar dessa bomba de efluxo conferir resistência a algumas linhagens, para outras a expressão aumentada não reflete em multirresistência.

O sistema MexXY-OprM é capaz de expulsar antimicrobianos como cefepime, cefotaxima, levofloxacina, ciprofloxacina, amicacina, gentamicina, tobramicina, eritromicina, tetraciclina e meropenem. Isolados superexpressando a bomba *mexY* (expressão, pelo menos, 4X aumentada em relação a PAO1) representaram 37.5% de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, estudados por Rodríguez-Martínez, Poirel e Nordmann (2009). Xavier e colaboradores (2010) relataram 50,8% de *P. aeruginosa* isoladas de septicemia, em hospital brasileiro, superexpressando esse sistema de efluxo. Os resultados do presente estudo indicam uma diferença significativa de expressão de *mexY* entre os isolados MDR e os n-MDR, de acordo com as medianas, a expressão de *P. aeruginosa* MDR foi quase 10X maior que as n-MDR, sugerindo que essa bomba de efluxo desempenha papel importante no fenótipo de resistência.

Rodríguez-Martínez, Poirel e Nordmann (2009) relataram 31% de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos com expressão aumentada de *mexD* (aumento de, pelo menos, 2X em relação à PAO1). Em linhagens isoladas no Brasil não foi observado aumento da expressão desta bomba de efluxo (Xavier et al, 2010). Em concordância com esse resultado, o nível de expressão de *mexD* foi semelhante entre o grupo MDR e n-MDR, apesar que três linhagens apresentaram expressão aumentada mais que 2X em relação à PAO1. Isso sugere que, apesar de haverem algumas linhagens com expressão aumentada, o aumento da expressão do sistema de efluxo MexCD-OprJ não é um mecanismo de resistência frequente e, portanto, de baixo impacto para a determinação de MDR em isolados de *P. aeruginosa* MDR.

Alguns autores salientaram o papel do sistema AdeABC no fenótipo de resistência em *Acinetobacter* spp. (RUZIN et al, 2009; VILA; MARTÎ; CÉSPEDES, 2007; HIGGINS et al, 2004), agindo principalmente nos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim e tigeciclina (HORNSEY et al., 2010). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo não evidenciaram a relação de tal mecanismo com o fenótipo

MDR nos isolados de *Acinetobacter* spp., mesmo que alguns isolados MDR apresentaram elevados níveis de expressão da bomba de efluxo AdeB.

Impermeabilidade a múltiplos antimicrobianos devido à redução da produção de porina OprD é um mecanismo importante na determinação de multirresistência em *P. aeruginosa*, principalmente quando associado a outros mecanismos de resistência (BONOMO; SZABO, 2006). Os níveis de expressão de oprD apresentados pelos isolados MDR caracterizados no presente estudo foram significativamente diferentes aos apresentados pelos n-MDR, mostrando redução de 66,4% na produção de tal porina. Essa porcentagem de redução foi similar ao constatado por Quale e colaboradores (2006) que verificaram redução de 70% na expressão de OprD em linhagens resistentes em relação à *P. aeruginosa* ATCC27853.

Tanto para os isolados de *P. aeruginosa* quanto para *Acinetobacter* spp., o fenótipo MDR esteve bastante relacionado com certos grupos clonais bastante persistente em ambiente hospitalar, já que tais clones foram recuperados ao longo de todo o período estudado. A expressão desse fenótipo multirresistente por isolados pertencentes a esses grupos deve ser devido à presença de diversos determinantes de resistência, que possam ter se acumulado como consequência do processo evolutivo de um microrganismo que habita ambientes hospitalares e sofre pressão seletiva dos mais variados antimicrobianos. Dentre esses determinantes, genes codificadores de carbapenemases estão entre os mais importantes, especialmente no território brasileiro, onde *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 está disseminada de forma endêmica. Além deste, o aumento da expressão do sistema de efluxo MexXY-OprM é outro mecanismo que desempenha papel importante na resistência de *P. aeruginosa*, assim como a redução da produção da porina OprD.

No cenário atual, em que a disseminação de bactérias multirresistentes está limitando, cada vez mais, as opções terapêuticas para combater as infecções bacterianas, o conhecimento do papel dos mecanismos de resistência no fenótipo bacteriano é de extrema importância para traçar estratégias de tratamento mais eficientes e medidas adequadas ao controle de infecções. Deste modo, estudos similares a este devem ser incentivados com o propósito de fornecer aos órgãos de saúde pública, às comissões de controle de infecção hospitalar e aos profissionais da saúde as informações necessárias ao combate das infecções bacterianas.

6. Conclusões

- O sequenciamento da zona 1 do gene *rpoB* foi eficiente para a identificação de *A. baumannii*, *Acinetobacter* gen. sp. 13TU e *Acinetobacter* gen sp. 3 e pode ser recomendado. Para a diferenciação entre as espécies *A. guillouiae* e *A. baylyi* o sequenciamento deste único fragmento é insuficiente, sendo necessárias outras análises.
- Panresistência não foi um fenótipo encontrado entre os isolados estudados, enquanto que multirresistência foi um fenótipo frequente entre os isolados estudados e relacionados com grupos clonais específicos.
- A presença de integrons de classe 1 pode ser usada como marcador genético de fenótipo MDR em *P. aeruginosa*, no entanto, nem sempre os integrons são responsáveis por este fenótipo, pois estes podem estar vazios ou conterem genes de resistência apenas aos aminoglicosídeos.
- Integrons de classe 2 foram mais importantes que os de classe 1 como determinantes de fenótipo MDR em *Acinetobacter* spp.
- Produção de SPM-1 foi um dos mecanismos mais importantes na determinação de fenótipo MDR, devido à alta frequência de gene *bla*_{SPM-1} em *P. aeruginosa* MDR.
- O estudo da cinética de acúmulo intracelular de brometo de etídeo não foi eficiente na detecção de atividade de efluxo aumentada nos isolados pesquisados.
- MexXY-OprM foi o sistema de efluxo mais associado ao fenótipo MDR, tendo sua expressão aumentada entre os isolados de *P. aeruginosa* MDR. Enquanto AdeABC não teve relação significativa com fenótipo MDR em *Acinetobacter* spp.
- Diminuição da produção de OprD foi mais observada em *P. aeruginosa* MDR que n-MDR, sugerindo importante papel na expressão deste fenótipo.
- A disseminação de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* esteve relacionada com grupos clonais MDR predominantes, que persistiram como fonte de infecção durante o período estudado.

7. Referências

- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, vol.289, p.321-331, 1980.
- BEUTLICH, J.; RODRÍGUEZ, I.; SCHROETER, A.; KÄSBOHRER, A.; HELMUTH, R.; GUERRA, B. A Predominant Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Saintpaul Clonal Line in German Turkey and Related Food Products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3657–3667, 2010.
- 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**, 9th ed. Washington: ASM Press, 2007, cap.48, p.734-748.
- BONOMO, R.A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, vol.43, p.49-56, 2006.
- BRADFORD, P.A. Extend-spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Microbiology Reviews**, v. 14, p. 933-951, 2001.
- CHANDLER, M. Singled out for integration. **Nature – News and Views**, vol.440, p.1121-1122, 2006.
- CHO, Y.; OH, Y.; PARK, S.; LEE, Y. Concentration of CCCP should be optimized to detect the efflux system in quinolone-susceptible *Escherichia coli*. **The Journal of Microbiology**, v.39, p. 62-66, 2001.
- CLÍMACO, E.C; MINARINI L.A.R; DARINI, A.L.C. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has change in 6 years? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, p.186-189, 2010.
- DENYER, S.P.; MAILLARD, J.Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, vol.92, p.35S-45S, 2002.
- DOI, Y.; GARCIA, D.O.; ADAMS, J.; PATERSON, D.L. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol.51, p.852-856, 2007.
- EUZÉBY, J.P. LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acesso em: 01 nov. 2010.
- 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**, vol.55, p.1619-1629, 2006.
- FLUITZ, A.C.; SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super-integrons. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, vol.10, p.272-288, 2004.
- FONSECA, E.L.; FREITAS, F.S.; VICENTE, A.C.P. The colistin-only-sensitive Brazilian *Pseudomonas aeruginosa* clone SP (sequence type 277) is spread worldwide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 2743, 2010.
- FONSECA, E.L.; VIEIRA, V.V.; CIPRIANO, R.; VICENTE, A.C.P. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, vol.44, p.303-309, 2005.

- GALES, A.C.; JONES, R.N.; FORWARD, K.R.; LIÑARES, J.; SADER, H.S.; VERHOEF, J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens on seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). **Clinical Infectious Diseases**, vol.32, p.104-113, 2001.
- GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 699–702, 2003.
- GAUTON, R.K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2448-2453, 1997.
- GIRAUD, E.; CLOECKAERT, A.; KERBOEUF, D.; CHASLUS-DANCLA, E. Evidence for active efflux as primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.1223-1228, 2000.
- GIRLICH, D.; NAAS, T.; LEELAPORN, A.; POIREL, L.; FENNEWALD, M.; NORDMANN, P. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*-like cassette encoding an extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, vol.34, p.603-611, 2002.
- GU, B.; TONG, M.; ZHAO, W.; LIU, G.; NING, M.; PAN, S.; ZHAO, W. Prevalence and characterization of class I integron among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.45, p.241-243, 2007.
- GUNDI, V.A.K.B.; DIJKSHOORN, L.; BURIGNAT, S.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Validation of partial *rpoB* gene sequencing analysis for the identification of clinical important and emerging *Acinetobacter* species. **Microbiology**, v.155, p.2333-2341, 2009.
- HIGGINS, P.G.; WISPLINGHOFF, H.; STEFANIK, D.; SEIFERT, H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 821–823, 2004.
- HOCQUET, D.; NORDMANN, P.; GARCH, F.EL.; CABANNE, L.; PLÉSIAT, P. Involvement of the MexXY-OprM Efflux System in Emergence of Cefepime Resistance in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4. p. 1347–1351, 2006.
- HORNSEY, M.; ELLINGTON, M.J.; DOUMITH, M.; THOMAS, C.P.; GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W.; QUINN, J.; LOLANS, K.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1589–1593, 2010.
- JONES, R.N.; FERRARO, M.J.; RELLER, L.B.; SCHRECKENBERGER, P.C.; SWENSON, J.M.; SADER, H.S. Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.45, p.227-230, 2007.
- KÖHLER, T.; MICHEA-HAMZEHPOUR, M.; EPP, S.F.; PECHERE, J.-C. Carbapenem Activities against *Pseudomonas aeruginosa*: Respective Contributions of OprD and Efflux Systems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, 1999.
- KRESSE, H.; BELSEY, M.; ROVINI, H. The antibacterial drugs market. **Nature Reviews**, vol.6, p.19-20, 2007.

- KUMAR, A.; SCHWEIZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol.57, p.1486-1513, 2005.
- LA SCOLA, B.; GUNDI, V.A.K.B.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.827-832, 2006.
- LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, vol.14, p.413-420, 2006.
- MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol.45, p.3375-3380, 2001.
- MAGNUS, D.A.R.; MAZEL, D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. **Current Opinion in Microbiology**, vol.4, p.565-569, 2001.
- MANIATI, M.; IKONOMIDIS, A.; MANTZANA, P.; DAPONTE, A.; MANIATIS, A.N.; POURNARAS, S. 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**, p.1-4, 2007.
- MARTHA, B.; CROISIER, D.; DURAND, D.; HOCQUET, D.; PLESIAT, P.; PIROTH, L.; PORTIER, H.; CHAVANET, P. In-vivo impact of the MexXY efflux system on aminoglycoside efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia treated with tobramycin. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, vol.12, p.426-432, 2006.
- MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews**, vol.4, p.608-620, 2006.
- MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.A.; RIBEIRO, J.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla_{IMP-16}*, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol.48, p.4693-4702, 2004.
- MESAROS, N.; NORDMANN, P.; PLÉSIAT, P.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; ELDERE, J.V.; GLUPCZYNSKI, Y.; VAN LAETHEM, Y.; JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULKENS, P.M.; VAN BAMBEKE, F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology Infections**, vol.13, p.560-578, 2007.
- MICHAEL, C.A.; GILLINGS, M.R.; HOLMES, A.J.; HUGHES, L.; ANDREW, N.R.; HOLLEY, M.P.; STOKES H.W. Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. **The American Naturalist**, vol.164, p.1-12, 2004.
- MINE, T.; MORITA, Y.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.415-417, 1999.
- OCHS, M.M.; MCCUSKER, M.P.; BAINS, M.B.; HANCOCK, R.E.W. Negative Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Porin OprD Selective for Imipenem and Basic Amino Acids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1085–1090, v. 43, n. 5, 1999.

- OHARA, M.; KOUHA, S.; ONODERA, M.; FUJIE, Y.; SASAKI, M.; KOHARA, T.; KASHIYAMA, S.; HAYASHIDA, S.; KADONO, M.; KOMATSUZAWA, H.; GOTOH, N.; USUI, T.; ITAHA, H.; KUWABARA, M.; YOKOYAMA, T.; SUGAI, M. Molecular characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.271-277, 2007.
- OPINTAN, J.; NEWMAN, M.J.; NSIAH-POODOH, O.A.; OKEKE, I.N. *Vibrio cholerae* O1 from Accra, Ghana carrying a class 2 integron and the SXT element. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 929–933, 2008.
- PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística**, 2ª ed. Cengage Learning: São Paulo, 2008.
- PAGÈS, J.M.; MASI, M.; BARBE, J. Inhibitors of efflux pumps in gram-negative bacteria. **TRENDS in Molecular Medicine**, vol.11, p.382-389, 2005.
- PARTRIDGE, S.R.; TSAFNAT, G.; COIERA, E.; IREDELL, J.R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiology Reviews**, vol.33, p.757-784, 2009.
- PATERSON, D.L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Clinical Infectious Diseases**, vol.43, p.43-48, 2006.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p. 1132-1147, 2009.
- PELLEGRINO, F.L.; CASALI, N.; DOS SANTOS, K.R.; NOUÉR, S.A.; SCHEIDEGGER, E.M.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. *Pseudomonas aeruginosa* epidemics strain carrying *bla*(SPM) metallo- β -lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Chemotherapy**, vol.18, p.151-156, 2006.
- PITCHER, D.G.; SANDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters Applied Microbiology**, v.8, p.151-156, 1989.
- QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J.; LANDMAN, D. Interplay of Efflux System, *ampC*, and *oprD* Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, p. 1633–1641, v. 50, n. 5, 2006.
- QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.440-458, 2007.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J-M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 4783–4788, v. 53, n. 11, 2009.
- RUZIN, A.; IMMERMANN, F.W.; BRADFORD, P.A. RT-PCR and Statistical Analyses of adeABC Expression in Clinical Isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* Complex. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 2, 2010.
- RUZIN, A.; KEENEY, D.; BRADFORD, P.A. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigercycline in *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol.59, p.1001-1004, 2007.
- SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, vol.11, p.73-76, 2005.

- SALABI, A.E.; TOLEMAN, M.A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T.; FREI, R.; WALSH, T.R. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.582, 2010.
- SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, 2008.
- SCHRECKENBERGER, P.C.; DANESHVAR, M.I.; HOLLIS, D.G. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. In: MURRAY, P.R.. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. Washington: ASM Press, 2007, cap.50, p. 770-802.
- SEVERINO, P.; MAGALHÃES, V.D. The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. **Research in Microbiology**, vol.153, p.221-226, 2002.
- SILVA, F.M.; CARMO, M.S.; SILBERT, S.; GALES, A.C. SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of the Ancestor Relationship Using Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Automated Ribotyping. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 2, 2011.
- SPEIJER, H.; SAVELKOUL, P.H.M.; BONTEN, M.J.; STOBBERINGH, E.E.; TJHIE, J.H.T. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.37, p.3654-3661, 1999.
- VAHABOGLU, H.; OZTURK, R.; AYGUN, G.; COSKUNKAN, F.; YAMAN, A.; KAYGUSUZ, A.; LEBLEBICIOGLU, H.; BALIK, I.; AYDIN, K.; OTKUN, M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol.41, p.2265-2269, 1997.
- VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDÉS, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol.59, p.1210-1215, 2007.
- VOGNE, C.; AIRES, J.R.; BAILLY, C.; HOCQUET, D.; PLÉSIAT, P. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p.1676-1680, 2004.
- WHITE, P.; MCIVER, C.; DENG, Y.; RAWLINSON, W. Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. **FEMS Microbiology Letters**, vol.182, p.265-269, 2000.
- XAVIER, D.E.; PICÃO, R.C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, R.C.C.; GALES, A.C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BioMed Central Microbiology**, v. 10, n. 217, p. 1-7, 2010.
- YOSHIHARA, E.; EDA, S. Diversity in the oligomeric channel structure of the multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Immunology**, vol.51, p.47-52, 2007.

Apêndices

Apendice A – Dados fenotípicos e moleculares dos isolados de *P. aeruginosa*

<i>P. aeruginosa</i>	antibióticos															MDR	classe integron	bla _{SPM}	Tipo cassetes	PFGE	diferença entre coef. angulares
	AC	GN	TOB	CIP	NOR	LEV	CAZ	CFP	FEP	ATM	TIM	TZP	IMP	MER	PB						
001JF	S	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	R	S	S	S	+	1		XI	B	0,448
002JF	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	R	S	S	S		1		I	B	
003JF	I	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	S	R	S		1		III	G	
004JF	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	S	S	S		1		I	B	
005JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					D	
006JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					F	0,740
007JF	S	S	S	I	S	S	S	I	S	I	R	S	S	S	S					I	
008JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					A	
009JF	S	S	S	R	R	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S					T	
010JF	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S		1		VI	K	
011JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					A	
012JF	S	S	S	R	R	R	S	R	S	I	R	R	S	S	S					M	
013JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					H	
014JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					A	
015JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					I	
016JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					C	0,832
017JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					C	
018JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					G	
019JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					R	
020JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					B	
021JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					M	
022JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					B	
023JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					F	
024JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					D	
025JF	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S					G	
026JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	1				Q	0,640
027JF	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S					C	
028JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					L	
029JF	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S		1		IX	H	
030JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S		1	+	I	H	
031JF	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	+	1		IX	N	0,796
032JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S		1	+	I	A	
033JF	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S		1	+	II	A	
034JF	R	R	R	R	R	R	S	I	S	I	R	S	S	S	S		1		VIII	C	
035JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					H	
036JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					A	

continua

continuação

Apendice A – Dados fenotípicos e moleculares dos isolados de *P. aeruginosa*

<i>P. aeruginosa</i>	antibióticos																MDR	classe integron	bla _{SPM}	Tipo cassetes	PFGE	diferença entre coef. angulares
	AC	GN	TOB	CIP	NOR	LEV	CAZ	CFP	FEP	ATM	TIM	TZP	IMP	MER	PB							
037JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	+	1		I	K	0,753	
038JF	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	S	R	R	S	+	1	+	VII	J	0,388	
039JF	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S			+		F	0,610	
040JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	+	1		II	A		
041JF	S	R	R	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S		1		IX	B		
042JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	+	1		I	B		
043JF	R	R	R	R	R	R	S	R	I	I	R	R	S	S	S	+	1		IV	B		
044JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					C	0,418	
045JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1	+		A	0,285	
046JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1		II	A		
047JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					C		
048JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A		
049JF	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	+	1		II	A		
050JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S					H	0,527	
051JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					L	0,747	
052JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	+	1		I	B		
053JF	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I	R	R	S	S	S					D	1,025	
054JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	+	1	+	II	A	0,231	
055JF	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S					C		
056JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	+	1	+	II	A		
057JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A		
058JF	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	+	1		II	A	0,546	
059JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A		
060JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A		
061JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A		
062JF	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S					E		
063JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A		
064JF	S	S	S	S	S	S	R	R	I	R	R	R	S	S	S				I		0,500	
065JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	S	+	1	+	II	A		
066JF	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S					E		
067JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	1		XI	B		
068JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S							
069JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	+	1		II	A		
070JF	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S					D		
071JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					F		
072JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					G		

continua

continuação

Apendice A – Dados fenotípicos e moleculares dos isolados de *P. aeruginosa*

<i>P. aeruginosa</i>	antibióticos															MDR	classe integron	bla _{SPM}	Tipo cassetes	PFGE	diferença entre coef. angulares
	AC	GN	TOB	CIP	NOR	LEV	CAZ	CFP	FEP	ATM	TIM	TZP	IMP	MER	PB						
073JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					I	
074JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					F	
075JF	S	S	S	R	R	R	Y	R	S	Y	R	R	S	S	S					E	
076JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Y	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A	
077JF	R	R	R	R	R	R	Y	R	S	Y	R	S	R	Y	S					A	0,390
078JF	S	S	S	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S					B	
079JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Y	S	S	S	S	S					B	
080JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					D	
081JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					D	
082JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					N	0,847
083JF	S	S	S	Y	Y	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S					A	
084JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	+		+		J	1,468
085JF	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S		1		X	D	
086JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					B	0,517
087JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Y	S	S	S	S	S					A	
088JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					H	
089JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Y	S	S	S	S	S					A	0,676
090JF	S	R	R	R	R	R	S	Y	S	R	R	S	R	R	S		1		IX	D	
091JF	S	S	S	R	R	R	S	Y	S	R	R	S	S	S	S					A	
092JF	S	R	R	R	R	R	S	Y	S	R	R	S	R	R	S		1		IX	A	
093JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	1		II	A	
094JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Y	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A	
095JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Y	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A	
096JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					E	
097JF	Y	R	R	R	R	R	S	R	S	Y	R	S	R	R	S		1		V	J	
098JF	R	R	R	R	R	R	S	R	Y	R	R	S	R	R	S	+	1		VIII	A	0,639
099JF	S	Y	S	Y	Y	R	S	S	Y	S	S	S	S	S	S					B	0,508
100JF	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Y	S	S	+				C	
101JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					F	
102JF	S	S	S	Y	Y	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S					A	0,815
103JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					B	
104JF	R	R	R	R	R	R	S	Y	S	R	R	S	Y	R	S		1		VIII	C	
105JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	+	1	+	I	A	0,665
106JF	R	R	R	R	R	R	S	Y	S	Y	R	S	Y	R	S		1		VIII	B	
107JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S					B	
108JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Y	R	R	R	R	S	+	1	+	I	A	
109JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Y	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A	
110JF	S	R	R	R	R	R	R	R	R	Y	R	R	R	R	S	+	1/3	+		A	

continua

continuação

Apêndice A – Dados fenotípicos e moleculares dos isolados de *P. aeruginosa*

<i>P. aeruginosa</i>	antibióticos															MDR	classe integron	bla _{SPM}	Tipo cassetes	PFGE	diferença entre coef. angulares
	AC	GN	TOB	CIP	NOR	LEV	CAZ	CFP	FEP	ATM	TIM	TZP	IMP	MER	PB						
111JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A	0,344
112JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				D		
113JF	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S		1		VII	E	0,677
114JF	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R	R	R	R	S	+	1		VIII	C	0,526
115JF	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S				P		0,896
116JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	1		I	B	
117JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	1		I	F	0,130
118JF	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	S	S	S	+	1		I	B	
119JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				B		
120JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	1		I	B	
121JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				C		
122JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1		II	A	
123JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	2		O		1,442
124JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				B		
125JF	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	S	R	R	R	S	+	1		I	B	
126JF	I	R	R	R	R	R	S	I	S	I	R	S	S	S	S		1		VII	J	
127JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S						
129JF	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S				E		0,687
130JF	S	S	S	S	S	S	I	I	S	I	R	S	S	S	S				S		
131JF	S	S	S	R	R	R	I	R	I	R	R	R	S	S	S				E		
132JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				G		
133JF	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S				B		1,474
134JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				G		
135JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A	
136JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	1		I	B	
137JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1		XI	B	
138JF	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	+	1		II	A	
139JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S				I		
140JF	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S				D		
141JF	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S				E		
142JF	S	S	S	S	S	I	S	R	S	I	R	S	S	S	S				A		0,231
143JF	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S				E		
144JF	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S				A		0,626
145JF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	+	1	+	II	A	
146JF	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S	+	1		VIII	B	
147JF	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S				A		0,917
148JF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				B		

AC, ampicilina; GN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; LEV, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; CFP, cefoperazona; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; TAC, ticarcilina com clavulanato; PTZ, piperacilina com tazobactam; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B.

S: sensível; I: intermediário; R: resistente;

MDR: multirresistente;

Apêndice B – Dados fenotípicos e moleculares dos isolados de *Acinetobacter* spp.

Acinetobacte spp.		antibióticos																	MDR	classe integron	PFGE	diferença entre coef. angulares
		AC	GN	TOB	CIP	LEV	CAZ	CTX	FEP	SAM	TZP	TIM	IMP	MER	PB	CT	DO	MH				
003JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	I	+	1	B'	1,110
007JF	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,772
008JF	I	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	I	+		D'	0,776
009JF	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,000
010JF	I	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	I	+		B'	0,917
011JF	S	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	I	+		B'	0,000
012JF	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	0,192
013JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	I	+	1	B'	0,969
014JF	R	R	R	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I			C'	0,890
015JF	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,580
016JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	1/2	A'	1,036
017JF	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			E'	0,556
018JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	I	+	1	B'	1,052
019JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	1	B'	0,921
020JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	1	B'	1,211
021JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	1	B'	1,080
022JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	1	B'	1,215
023JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	1	B'	0,942
024JF	I	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+		B'	0,933
025JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	1	F'	1,251
026JF	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	0,077
027JF	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,919
028JF	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S			C'	0,998
029JF	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			H'	0,954
030JF	S	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+		B'	0,354
031JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,657
032JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,979
033JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,994
034JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,420
035JF	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	2	A'	0,231

continua

continuação

Apêndice B – Dados fenotípicos e moleculares dos isolados de *Acinetobacter* spp.

antibióticos																			MDR	classe integron	PFGE	diferença entre coef. angulares
Acinetobacte spp.																						
	AC	GN	TOB	CIP	LEV	CAZ	CTX	FEP	SAM	TZP	TIM	IMP	MER	PB	CT	DO	MH	TGC				
036JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	0,498
037JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,181
038JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	0,907
039JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,191
040JF	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,084
041JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,115
042JF	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,281
043JF	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			E'	0,747
046JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	0,755
047JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	0,964
048JF	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			I'	
049JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,142
050JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	1	C'	0,974
051JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	0,928
052JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,048
053JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,072
054JF	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			C'	0,886
055JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,079
056JF	S	S	S	R	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			D'	0,839
057JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	0,853
058JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,010
059JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	2	A'	1,084
060JF	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			G'	0,743
061JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+		B'	0,959
062JF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+		B'	1,155
063JF	I	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S		2	A'	1,023
064JF	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+		B'	1,111

AC, ampicilina; GN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; AMS, ampicilina com sulbactam; PTZ, piperacilina com tazobactam; TAC, ticarcilina com clavulanato; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B; CT, colistina; DO, doxiciclina; MH, minociclina; TGC, tigerciclina.

S: sensível; I: intermediário; R: resistente

MDR: multirresistente.

Apêndice C – Gráficos Boxplot da distribuição dos isolados de *A. baumannii* agrupados por seu perfil de resistência aos antimicrobianos, de acordo com a variação da inclinação das retas apresentadas no ensaio cinético de interiorização do brometo de etídeo.

continua

continuação

Apêndice C – Gráficos Boxplot da distribuição dos isolados de *A. baumannii* agrupados por seu perfil de resistência aos antimicrobianos, de acordo com a variação da inclinação das retas apresentadas no ensaio cinético de interiorização do brometo de etídeo.

continua

continuação

Apêndice C – Gráficos Boxplot da distribuição dos isolados de *A. baumannii* agrupados por seu perfil de resistência aos antimicrobianos, de acordo com a variação da inclinação das retas apresentadas no ensaio cinético de interiorização do brometo de etídeo.

Apêndice D – Gráficos Boxplot da distribuição dos isolados de *P.aeruginosa* agrupados por seu perfil de resistência aos antimicrobianos, de acordo com a variação da inclinação das retas apresentadas no ensaio cinético de interiorização do brometo de etídeo.

continua

continuação

Apêndice D – Gráficos Boxplot da distribuição dos isolados de *P.aeruginosa* agrupados por seu perfil de resistência aos antimicrobianos, de acordo com a variação da inclinação das retas apresentadas no ensaio cinético de interiorização do brometo de etídeo.

continuação

Apêndice D – Gráficos Boxplot da distribuição dos isolados de *P.aeruginosa* agrupados por seu perfil de resistência aos antimicrobianos, de acordo com a variação da inclinação das retas apresentadas no ensaio cinético de interiorização do brometo de etídeo.