UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo do perfil de resistência aos β -lactâmicos em bacilos
Gram-negativos não fermentadores isolados de solo**

João Pedro Rueda Furlan

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do perfil de resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados de solo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: João Pedro Rueda Furlan

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 06/10/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Rueda Furlan, João Pedro

Estudo do perfil de resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados de solo. Ribeirão Preto, 2017.

56 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Stehling, Eliana Guedes.

1. BGNNF. 2. Resistência. 3. β -lactâmicos. 4. β -lactamases. 5. solo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Pedro Rueda Furlan

Estudo do perfil de resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados de solo

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes
Stehling

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais João Luis Furlan (*in memoriam*) e Eloisa Marcela Rueda Furlan, ao meu irmão Caio Luis Rueda Furlan e minha avó Maria Aparecida Passaglia Rueda, que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling, pelas orientações, ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. André Pitondo da Silva, pelas colaborações e apoio na execução de diversos experimentos.

À Dra. Vânia Santos Braz pelo apoio em diversas metodologias.

À minha família, pelo apoio incondicional em busca dos meus objetivos.

À minha namorada, Mariana Bárbara Fernandes Salvarani, pelo amor, incentivo e paciência durante estes anos.

Aos meus amigos e colegas que estão ou passaram pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelos momentos agradáveis e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Vinícius Vicente Martins e à Inara Fernanda Lage Gallo, pelo auxílio técnico laboratorial.

A todos que de alguma forma colaboraram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (Proc. nº2015/18990-2).

...

Acredite no poder da palavra desistir
Tire o D, coloque o R
Que você tem Resistir.

Uma pequena mudança
Às vezes traz esperança
E faz a gente seguir.

...

Bráulio Bessa

RESUMO

FURLAN, J. P. R. **Estudo do perfil de resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados de solo.** 2017. 56f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Dentre os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF), *Acinetobacter baumannii*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* se destacam devido à ampla capacidade de adaptação, as quais podem habitar uma grande variedade de ambientes e adquirir resistência a uma grande variedade de antimicrobianos. A resistência aos β -lactâmicos ocorre principalmente pela produção de enzimas do tipo β -lactamases, as quais são capazes de clivar o anel β -lactâmico. O objetivo do presente estudo foi isolar bactérias pertencentes a esses gêneros, determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos através dos métodos de disco difusão e da concentração inibitória mínima (CIM) e investigar a presença de genes codificadores de β -lactamases. Foram isolados 60 BGNNF, sendo 24 pertencentes ao complexo *B. cepacia*, 13 *P. aeruginosa*, 13 *S. maltophilia* e 10 *A. baumannii* obtidos de diferentes amostras de solo provenientes de diferentes estados e cidades das cinco regiões do Brasil. Dentre os isolados, 50 (83,3%) foram não suscetíveis a pelo menos um β -lactâmico e altas CIMs para as cefalosporinas de amplo espectro foram detectadas. Diferentes genes codificadores β -lactamases de importância clínica foram pesquisados, e um total de 70 foram detectados, como *bla_{SHV}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-1-like}*, *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{CTX-M-Gp1}*, *bla_{CTX-M-Gp9}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* e *bla_{NDM}*, sendo que, a maior prevalência foi do *bla_{SHV}* (46%). Este é o primeiro relato no mundo de uma bactéria isolada do solo com o gene *bla_{KPC}* e o primeiro relato no Brasil e o segundo no mundo de uma bactéria isolada do solo portadora do gene *bla_{NDM-1}*. O grande número de genes codificadores de β -lactamases encontrados indica uma grande disseminação destas enzimas em bactérias isoladas do solo.

Palavras-chave: BGNNF, resistência, β -lactâmicos, β -lactamases, solo.

ABSTRACT

FURLAN, J. P. R. **Study of the resistance profile of β -lactams in Nonfermenting Gram-Negative Bacilli isolated from soil.** 2017. 56f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Among the nonfermenting Gram-negative bacilli (NFGNB), *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* stand out due to the large adaptation capacity, which can inhabit a wide variety of environments and acquire resistance to a wide variety of antibiotics. Resistance to β -lactam antibiotics occurs mainly by the production of β -lactamase, which are capable of cleaving the β -lactam ring. The aim of the present study was to isolate bacteria belonging to these genera, to determine the antimicrobial resistance profile through disc diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) methods and to investigate the presence of β -lactamase encoding genes. Sixty NFGNB were obtained, being 24 belonging to the *B. cepacia* complex, 13 *P. aeruginosa*, 13 *S. maltophilia* and 10 *A. baumannii* from different soil samples from different states and cities of the five Brazilian regions. Among the isolates, 50 (83.3%) were not susceptible to at least one β -lactam antibiotics and high MICs for the extended-spectrum cephalosporins were detected. Different β -lactamase encoding genes of clinical importance were investigated, and 70 were detected, such as *bla_{SHV}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-1-like}*, *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{CTX-M-Gp1}*, *bla_{CTX-M-Gp9}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* and *bla_{NDM}*, with the highest prevalence being *bla_{SHV}* (46%). This is the first report in the world of *bla_{KPC}* gene in bacteria isolated from soil and the first report in Brazil and the second in the world of *bla_{NDM-1}* gene in bacterium isolated from soil. A large number of β -lactamase encoding genes found indicates a large spread of these enzymes in bacteria isolated from soil.

Keywords: NFGNB, resistance, β -lactam, β -lactamases, soil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia de <i>A. baumannii</i> , complexo <i>B. cepacia</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. maltophilia</i>	3
Figura 2 - Hidrólise da benzilpenicilina por uma β -lactamase.....	8
Figura 3 - Representação esquemática da CIM.....	19
Figura 4 - Porcentagem das bactérias isoladas por local de origem e fonte de isolamento (cultura)	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antimicrobianos β -lactâmicos e seus respectivos espectros de ação	6
Tabela 2 - Mecanismos de resistência para os antimicrobianos β -lactâmicos	7
Tabela 3 - β -lactamases representativas e seus respectivos espectros de ação.....	9
Tabela 4 - Iniciadores utilizados nas reações de detecção dos genes codificadores de β -lactamases	20
Tabela 5 - Condições utilizadas nas reações de detecção dos genes codificadores de β -lactamases	21
Tabela 6 - Perfil de resistência, CIM dos β -lactâmicos e genes codificadores de β -lactamases detectados em <i>A. baumannii</i>	24
Tabela 7 - Perfil de resistência, CIM dos β -lactâmicos e genes codificadores de β -lactamases detectados em bactérias pertencentes ao complexo <i>B. cepacia</i>	26
Tabela 8 - Perfil de resistência, CIM dos β -lactâmicos e genes codificadores de β -lactamases detectados em <i>P. aeruginosa</i>	26
Tabela 9 - Perfil de resistência, CIM para ceftazidima e genes codificadores de β -lactamases detectados em <i>S. maltophilia</i>	27
Tabela 10 - Isolados de acordo com gênero/espécie, cultura, origem e estado	55

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	<i>Forward</i>
FUNDHERP	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
H ₂ O	Água
G	Guanina
LB	Luria-Bertani
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto (s)
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R	<i>Reverse</i>
seg	Segundo (s)
TAE	Tris Acetado EDTA
T	Timina
Tis	Hidroximetilaminometado
U	Unidade (s)
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
BGNF	Bacilo Gram-negativo não fermentador
MBL	Metallo-β-lactamase
ESBL	β-Lactamase de Espectro Estendido

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
g	Grama
L	Litro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molar
n°	Número
nm	Nanômetro
®	Marca Registrada
%	Porcento

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Microbiota do solo.....	2
1.2 Bacilos Gram-negativos não fermentadores.....	2
1.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
1.2.2 Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	4
1.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.2.4 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5
1.3 Antimicrobianos β -lactâmicos.....	6
1.3.1 Resistência dos BGNNF aos β -lactâmicos	7
1.4 β -lactamases	8
2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Coleta do solo	15
4.2 Obtenção dos isolados	15
4.3 Extração do DNA genômico.....	16
4.4 Caracterização molecular dos isolados.....	16
4.4.1 Gene 23S rRNA.....	16
4.4.1.1 Eletroforese em gel de agarose.....	16
4.4.1.2 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR.....	17
4.4.2 Caracterização molecular dos isolados pertencentes ao complexo <i>B. cepacia</i>	17
4.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	18
4.5.1 Teste de difusão em ágar	18
4.5.2 Teste da concentração inibitória mínima (CIM).....	18
4.6 Pesquisa dos genes codificadores de β -lactamases	19

5 RESULTADOS	23
5.1 Obtenção dos isolados	23
5.2 Perfil de resistência e Detecção dos genes codificadores de β -lactamases	24
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
APÊNDICE A - Isolados de acordo com gênero/espécie, cultura, origem e estado	55

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota do solo

A microbiota do solo é representada por quatro grupos de micro-organismos: bactérias, fungos, algas e protozoários, entretanto, são as bactérias e os fungos que respondem por aproximadamente 90% da atividade microbiana do solo. Estes micro-organismos ocupam menos de 5% do espaço poroso do solo e constituem 1-4 % do carbono disponível, contudo, a diversidade e a quantidade dos micro-organismos é bastante elevada. Esses micro-organismos são responsáveis pelos processos de mineralização que acontecem no solo, disponibilizando uma quantidade considerável de nutrientes para as plantas, principalmente fósforo, nitrogênio, cálcio e potássio. Em condições ideais, a microbiota do solo permite que os nutrientes sejam liberados gradativamente para a nutrição das plantas, sem perdas por lixiviação, portanto, a diminuição da microbiota do solo prejudica a fixação dos nutrientes, ocorrendo perdas e resultando no empobrecimento do solo (Silveira & Freitas, 2007).

Alguns fatores afetam a ocorrência e a distribuição dos micro-organismos no solo, tais como: temperatura, umidade, pH, aeração, disponibilidade de substrato orgânico (fator limitante), acúmulo de metais pesados e pesticidas. Assim, o solo é normalmente um ambiente estressante, onde apenas 15% a 30% das bactérias e 10% dos fungos encontram-se em estado ativo. A classificação e a caracterização das bactérias do solo podem ser feitas com os mesmos métodos utilizados para as bactérias clínicas, utilizando o uso de técnicas de coloração, testes bioquímicos e homologia na composição das bases de DNA, fornecendo assim, dados suficientes para a classificação em gênero e espécie (Martins, 2006; Silveira & Freitas, 2007).

1.2 Bacilos Gram-negativos não fermentadores

Os bacilos Gram-negativos não-fermentadores (BGNNF) são bactérias incapazes de obter energia da fermentação de açúcares, estritamente aeróbios e ubíquos no meio ambiente. No ambiente clínico, os BGNNF eram relatados como contaminantes ambientais ou micro-organismos de baixo potencial patogênico, entretanto, recentemente, essas bactérias têm causado um aumento significativo de casos de bacteremia, principalmente em pacientes imunocomprometidos (McGowan, 2006).

Os principais gêneros de BGNNF associados a infecções clínicas são: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, os quais estão incluídos no filo Proteobacteria, na classe Gammaproteobacteria, com exceção do gênero *Burkholderia*, que pertence à classe Betaproteobacteria (Figura 1). Essas bactérias são consideradas patógenos oportunistas, podem ser encontradas em uma grande variedade de ambientes, incluindo o solo, a água, a superfícies de plantas e animais, contudo, estão predominantemente relacionadas com infecções hospitalares. Nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), depósitos frequentes de bactérias multirresistentes, a transmissão interpacientes é elevada e as infecções adquiridas são representadas, principalmente, por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, enquanto outros BGNNF como *Stenotrophomonas maltophilia* e bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* são mais relatados em infecções nas unidades de hemodiálise (ANVISA, 2007).

Fonte: Autor

Figura 1- Taxonomia de *A. baumannii*, complexo *B. cepacia*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*

1.2.1 *Acinetobacter baumannii*

O gênero *Acinetobacter* pertence à família *Moraxellaceae*. Essas bactérias são imóveis e apresentam forma de bacilo na fase de crescimento e de cocobacilo na fase estacionária. Esse gênero tem uma taxonomia complexa, sendo descritos 21 grupos DNA-homólogos,

denominados genoespécies de *Acinetobacter*. Dentre estas espécies, a mais descrita e com maior relevância clínica é *A. baumannii* (Oliveira, 2007).

A. baumannii tem surgido como uma das principais causas de infecções hospitalares. Essas bactérias apresentam resistência a diversos antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos, e são frequentemente encontradas em UTIs, causando bacteremia, meningite, pneumonia e pneumonia associada à ventilação mecânica, infecção urinária, infecção de feridas operatórias e infecção relacionada ao cateter venoso central (Michalopoulos & Falagas, 2010). Algumas características contribuem para a patogenicidade e adaptação deste micro-organismo, como a habilidade para formação de biofilme, a presença de diferentes fatores de virulência e a alta capacidade para aquisição de genes de resistência (McConnell et al., 2013).

1.2.2 Complexo *Burkholderia cepacia*

O gênero *Burkholderia* pertence à família *Burkholderiaceae*, os quais são caracterizados como bacilos retos e móveis. O complexo *Burkholderia cepacia* é formado por 20 espécies – *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia ubonensis*, *Burkholderia latens*, *Burkholderia difusa*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia metallica*, *Burkholderia contaminans*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia stagalis*, *Burkholderia territori* e *Burkholderia pseudomultivorans* –, as quais são distribuídas na natureza e isoladas do solo, da água, de plantas e de ambientes hospitalares (Peeters et al., 2013; Abbott & Peleg, 2015; De Smet et al., 2015). Algumas linhagens do complexo *B. cepacia* têm potencial biotecnológico e são utilizadas para biorremediação e crescimento das plantas, entretanto, ao mesmo tempo, surgiram como patógenos oportunistas de difícil tratamento, principalmente em pacientes com fibrose cística (FC) (Uehlinger et al., 2009).

O complexo *B. cepacia* tem sido associado com infecções do trato respiratório, ventilação mecânica, infecção do trato urinário, meningite neonatal, peritonite, artrite séptica e infecções oculares. Nos pacientes com FC, este grupo de bactérias formam biofilmes nos pulmões, contribuindo para a redução de suscetibilidade antimicrobiana, falha do tratamento e infecção persistente. A principal patologia causada pelo complexo *B. cepacia* em pacientes com FC é a “síndrome cepacia”, com formação de um quadro séptico que evolui para bacteremia e consequente óbito destes pacientes (Pegues, 2014).

1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonadaceae*. Essas bactérias são caracterizadas como bacilos retos ou ligeiramente curvos e móveis. A *P. aeruginosa* pode causar infecções no trato urinário, no sistema respiratório, na pele, em tecidos moles, nos olhos, nos ossos, nas articulações e também pode causar outras infecções sistêmicas. A ubiquidade de *P. aeruginosa* é correlacionada a algumas de suas importantes características, entre elas, a sua grande capacidade de adaptação ao meio ambiente, a sua resistência intrínseca, a sua capacidade de sobreviver com pouca exigência nutricional e a sua habilidade de desenvolver resistência à maioria dos antimicrobianos. Esses fatores contribuíram para que esta bactéria se tornasse um importante patógeno desde o último século (Gross et al., 2009; Xavier, 2006).

As linhagens de *P. aeruginosa* também possuem um grande potencial de virulência e contam com um grande arsenal de genes responsáveis pela expressão de diversos fatores de virulência que são próprios dessas bactérias. Estes fatores podem ser estruturais ou produzidos e excretados, facilitando o rompimento e a integridade epitelial da célula hospedeira (Ferreira, 2005). Estudos mostraram que alguns genes de virulência de *P. aeruginosa* são mais frequentes em isolados clínicos e outros em isolados ambientais, indicando o potencial patogênico de todas essas linhagens (Martins et al., 2013).

1.2.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

O gênero *Stenotrophomonas* pertence à família *Xanthomonadaceae*. Essa bactéria foi descrita primeiramente em 1943 como *Bacterium bookeri* e, posteriormente, denominada *Pseudomonas maltophilia*. Anos depois, após análises do rRNA, a mesma foi denominada *Xanthomonas maltophilia* e hoje é descrita como *Stenotrophomonas maltophilia*. A *S. maltophilia* tem recebido crescente atenção devido ao seu alto nível de resistência intrínseca a diferentes classes de antibióticos, grande capacidade de adaptação a diversos ambientes e capacidade para formação de biofilmes (Brooke, 2012; Rodrigues et al., 2011).

A *S. maltophilia* é frequentemente isolada do solo, de animais, da água, de plantas e de instrumentos hospitalares. Há relatos que mostram o isolamento de bactérias dessa espécie em várias fontes no ambiente hospitalar, como água de hemodiálise, nebulizadores, sabão para lavar as mãos, cateter venoso central e endoscópios gastrointestinais (Brooke, 2012). Essa espécie tem sido associada com alta morbidade e mortalidade em pacientes

imunocomprometidos e é mais comumente relacionada com infecções respiratórias, embora existam relatos de bacteremias, endocardites, pneumonias, infecções de tecidos moles, de pele, intra-abdominais e do trato urinário, meningites, síndromes oftalmológicas, sinusites, entre outras (Rodrigues et al., 2011).

1.3 Antimicrobianos β -lactâmicos

O grupo dos antimicrobianos β -lactâmicos é o maior e o mais utilizado na prática clínica para o tratamento de diferentes infecções. Este grupo é constituído pelas penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases (Tabela 1). Esses antimicrobianos inibem a síntese dos peptídeoglicanos e possuem em comum um anel β -lactâmico, que é associado com diferentes cadeias laterais que conferem diferentes espectros de ação (Figura 2) (Suárez & Gudiol, 2009; ANVISA, 2007).

O peptídeoglicano mantém a rigidez e o formato da parede celular, além de proteger contra o choque osmótico. A síntese do peptídeoglicano envolve diferentes enzimas bacterianas e, dentre elas, as transpeptidases, que são responsáveis pela transpeptidação do peptídeoglicano. Os antimicrobianos β -lactâmicos se ligam e inibem as transpeptidases, reduzindo a quantidade de ligações cruzadas entre os peptídios de dois resíduos de ácido N-acetil murâmico, impedindo assim a síntese do peptídeoglicano e, conseqüentemente, a parede celular perde a rigidez e estabilidade, ocasionando uma lise osmótica (Suárez & Gudiol, 2009; ANVISAb, 2007; Retsch-Bogart et al., 2009).

Tabela 1 - Antimicrobianos β -lactâmicos e seus respectivos espectros de ação

Antimicrobiano		Espectro de ação
Anel tiazolidina Penicilinas	Naturais	Possuem um amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas não produtoras de β -lactamases.
	Semi-sintéticas	Possuem atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dentre essas, se destacam as penicilinas resistentes às penicilinases e as de amplo espectro associadas com inibidores de β -lactamases.
Anel di-hidrotiazina Cefalosporinas	Primeira geração	Possuem alta atividade contra bactérias Gram-positivas e baixa contra bactérias Gram-negativas.
	Segunda geração	Possuem alta atividade contra bactérias Gram-positivas e uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas, quando comparadas com as de primeira geração.
	Terceira geração	Possuem menor atividade contra bactérias Gram-positivas e maior atividade contra bactérias Gram-negativas.
	Quarta geração	Preservam a atividade das cefalosporinas de terceira geração contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e possuem atividade anti- <i>Pseudomonas</i> .

	Quinta geração	Possuem atividade semelhante às de terceira geração, alta atividade contra MRSA ¹ e não possuem atividade contra o gênero <i>Pseudomonas</i> .
<p>Anel pirrólico Carbapenêmicos</p>		Possuem alta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esta classe se destaca devido ao seu amplo espectro de ação e a facilidade de penetração em diversos sítios de infecção. Dentre os carbapenêmicos, o doripenem possui a mesma atividade anti- <i>Pseudomonas</i> que as cefalosporinas de quarta geração.
<p>Nenhum anel Monobactâmicos</p>		Possuem ação apenas em bactérias Gram-negativas e são utilizados em infecções severas, principalmente em pacientes com fibrose cística e em infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos outros β -lactâmicos.
<p>Anel oxazolidínico Inibidores de β-lactamases</p>		Essenciais para o tratamento em infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes a diferentes antimicrobianos, visto que se ligam às β -lactamases devido a sua maior afinidade e, consequentemente, o antimicrobiano associado não é hidrolisado.

Fonte: Adaptado de Suárez & Gudiol, 2009; ANVISAb, 2007

Legenda: ¹*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, MRSA

1.3.1 Resistência dos BGNNF aos β -lactâmicos

Os mecanismos de resistência utilizados pelos BGNNF são variáveis, incluindo alteração no sítio alvo de ação do antimicrobiano, aumento da expressão de bombas de efluxo e por mecanismos enzimáticos, como a produção de β -lactamases (Tabela 2). Essas bactérias apresentam resistência intrínseca a vários antimicrobianos e, além disso, diferentes mecanismos moleculares contribuem para a resistência adquirida a diferentes classes de antimicrobianos, pela aquisição de novos fragmentos de DNA através da transferência horizontal de genes (Tavares, 2009).

Tabela 2 - Mecanismos de resistência para os antimicrobianos β -lactâmicos

Micro-organismo	Mecanismos de resistência	Referência
<i>A. baumannii</i>	β -lactamases adquiridas β -lactamases intrínsecas (AmpC cromossômica, OXA-51) Bombas de efluxo Alteração no sítio de ação	Zhang et al., 2013
Complexo <i>B. cepacia</i>	β -lactamases adquiridas β -lactamases intrínsecas (PenA e PenB) Alteração no sítio de ação	Abbott & Peleg, 2015

<i>P. aeruginosa</i>	β -lactamases adquiridas β -lactamases intrínsecas (AmpC cromossômica) Bombas de efluxo Alteração de permeabilidade	Gellatly & Hancock, 2013
<i>S. maltophilia</i>	β -lactamases adquiridas β -lactamases intrínsecas (L1 e L2)	Abbott & Peleg, 2015

1.4 β -lactamases

A produção de β -lactamases em bactérias Gram-negativas é o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos. Essas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico, ocasionando a perda do efeito do mesmo (Figura 2).

Fonte: Bush, 1988

Figura 2 - Hidrólise da benzilpenicilina por uma β -lactamase

As β -lactamases foram inicialmente classificadas por Ambler em 1980. Essa classificação foi feita com base na similaridade entre as sequências de aminoácidos dessas enzimas. Em 1989, Bush, Jacoby e Medeiros propuseram outra classificação baseada nas características físicas e funcionais de cada enzima, a qual foi atualizada em 2010 por Bush & Jacoby.

De acordo com a classificação proposta por Ambler (1980), as β -lactamases são divididas em quatro classes (A, B, C e D). As classes A, C e D possuem serina no sítio de ação, enquanto a classe B utiliza o zinco (Zn) como cofator e agrupa as Metallo- β -Lactamases (MBLs). Segundo a classificação de Bush & Jacoby (2010), as β -lactamases foram classificadas de acordo com a atividade da enzima, sendo agrupadas em três grupos funcionais. O grupo 1 é composto pelas cefalosporinases, que é representado principalmente pelas enzimas AmpC plasmideal, CMY e FOX. O grupo 2 é composto pelo maior número de serina β -lactamases, o qual é representado principalmente pelas enzimas do grupo CTX-M,

SHV, TEM, OXA, KPC e GES. O grupo 3 agrupa as enzimas MBLs, sendo que as mais prevalentes são: VIM, IMP, NDM e IND (Tabela 3) (Bush & Jacoby, 2010; Junior et al., 2004; Siemann et al., 2002).

Tabela 3 - β -lactamases representativas e seus respectivos espectros de ação

Grupo funcional ¹	Similaridade ²	Nome comum	Enzimas representativas	Enzimas representativas de importância clínica	Resistência conferida aos β -lactâmicos	
					Primária ³	Secundária ⁴
1	C	Cefalosporinases	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, GC1 e CMY-37	CMY-1 a CMY-50	Penicilinas e cefalosporinas	Carbapenêmicos e monobactâmicos
2	A	Penicilinases	TEM-1, TEM-2 e SHV-1	SHV-1, SHV-11 e SHV-89	Penicilinas e cefalosporinas de primeira geração	Combinações inibidoras de β -lactamases
2	A	β -lactamases de espectro estendido	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1 e VEB-1	SHV-2, SHV-3, SHV-115, CTX-M-1, CTX-M-44 a CTX-M-92, PER-1 a PER-5, VEB-1 a VEB-7	Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e combinações inibidoras de β -lactamases	-
2	D	Cloxacilinases	OXA-1 e OXA-10	OXA-1, OXA-2 e OXA-10	Penicilinas, incluindo oxacilina e cloxacilina	-
2	D	Carbapenemases	OXA-23 e OXA-48	OXA-23, OXA-51 e OXA-58	Carbapenêmicos e outros β -lactâmicos	-
2	A	Serina Carbapenemases	KPC-2, IMI-1 e SME-1	GES-2 a GES-15, KPC-2 a KPC-10, SME-1 a 3	Todos os β -lactâmicos	-
3	B	Metalo- β -lactamases	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1, CphA e Sfh-1	IMP-1 a IMP-26, VIM-1 a VIM-23, IND-1, IND-2, IND-2a e IND-3 a IND-7	Todos os β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos	-

Fonte: Adaptado de Bush, 2010

Legenda:

¹ Classificação de acordo com Bush & Jacoby, 2010.

² Classificação de acordo com Ambler, 1980.

³ Resistência aos β -lactâmicos que são apenas pela função da β -lactamase.

⁴ Resistência aos β -lactâmicos, que além da função da β -lactamase, está associada a outros mecanismos de resistência.

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Os BGNNF são patógenos oportunistas e podem ser encontrados em diferentes ambientes. Esses patógenos se destacam principalmente pela resistência intrínseca e adquirida a diferentes antimicrobianos. A contaminação do meio ambiente com antimicrobianos seleciona as bactérias resistentes e proporciona a aquisição de genes de resistência. Em decorrência dos altos níveis de resistência aos antimicrobianos, a pesquisa dos mecanismos de aquisição e transferência de resistência por diferentes espécies de bactérias de interesse médico tem se mostrado essencial. A grande maioria dos estudos é realizada com bactérias isoladas do ambiente hospitalar, entretanto, alguns estudos têm demonstrado que os isolados ambientais também possuem tal potencial.

Os genes codificadores de β -lactamases são frequentemente relatados em isolados clínicos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e, em menor quantidade, em BGNNF, principalmente em *P. aeruginosa*. Em isolados ambientais, poucos estudos são realizados e, conseqüentemente, existem poucos relatos. Além da *P. aeruginosa*, estudos indicam que *A. baumannii*, complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia* despontam como importantes bactérias oportunistas e responsáveis por diferentes tipos de infecção, os quais são de difícil tratamento em decorrência da elevada resistência aos diferentes antimicrobianos.

Dessa forma, a caracterização de bactérias isoladas do solo quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos e à presença de diferentes genes codificadores de β -lactamases, que são muito relatados em isolados clínicos, poderão contribuir para um melhor entendimento sobre a resistência bacteriana em isolados desta fonte.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo isolar bacilos Gram-negativos não fermentadores do solo, investigar o perfil de resistência dessas bactérias e verificar a presença de genes codificadores de β -lactamases nos isolados resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar *Acinetobacter baumannii*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* de amostras de solo das cinco regiões brasileiras.
- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos através dos métodos de disco difusão e da concentração inibitória mínima.
- Investigar a presença e a diversidade de genes codificadores de β -lactamases nesses isolados e detectar a existência de possíveis mutações não descritas nos genes encontrados através do sequenciamento.
- Correlacionar os resultados obtidos no presente estudo, quanto ao perfil de resistência e a presença de genes codificadores de β -lactamases, com aqueles encontrados em linhagens clínicas.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do solo

Para o isolamento das linhagens bacterianas estudadas foram coletadas amostras de solo da região de Ribeirão Preto e foram estabelecidas parcerias com a empresa Ribersolo – Laboratório de Análise de Solo e Foliar, a qual fornece amostras de solo cultivadas com diferentes culturas provenientes de diferentes cidades e regiões do Brasil, com o Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Ribeirão Preto e com a Fazenda Experimental de Ribeirão Preto.

4.2 Obtenção dos isolados

O isolamento bacteriano foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mukherjee et al. (2011) modificado (sem diluições seriadas). A cada 1g de solo foram adicionados 5 mL de meio líquido LB (Oxoid, Reino Unido) em tubo e este incubado a 37°C por até 24 horas, sob agitação a 130 rpm. Em seguida, um volume de 200 µL foi semeado utilizando uma alça de Drigalski em placas de ágar MacConkey (Oxoid, Reino Unido), com uma concentração de 64 µg/mL de aztreonam. Dentre os BGNNF citados e alvo do projeto, todos possuem resistência intrínseca a este antimicrobiano, exceto o gênero *Pseudomonas*, sendo possível o isolamento de bactérias pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas* resistentes ao aztreonam.

Em seguida, os isolados foram semeados em Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Oxoid, Reino Unido), para diferenciação dos mesmos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás, o que permitiu a seleção apenas de BGNNF. As linhagens *Escherichia coli* ATCC® 25922, *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 foram utilizadas como controle neste experimento.

Após a confirmação da pureza das culturas, os isolados foram transferidos para caldo BHI com glicerol a 15% e mantidos a -20°C e -80°C. A reativação dos isolados foi realizada em caldo BHI com incubação a 37°C, durante 18–24 horas, para a realização dos experimentos subsequentes.

4.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos isolados foi extraído com o GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (SIGMA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi utilizado como molde nas reações de PCR.

A concentração e a pureza do DNA genômico foram determinadas em DS-11 + Spectrophotometer (DeNovix, USA) utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As extrações com razão entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade devido ao baixo nível de impurezas.

4.4 Caracterização molecular dos isolados

4.4.1 Gene 23S rRNA

Os isolados bacterianos obtidos foram identificados molecularmente através da amplificação e sequenciamento do gene 23S rRNA, utilizando os iniciadores 23SrRNA-For (5'-CYGAATGGGGVAACC-3') e 23SrRNA-Rev (5'-CGACATCGAGGTGCCAAAC-3') amplificando um fragmento de 2.361 pb (HUNT et al., 2006). Para cada reação de PCR foram utilizados 29,5 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL do tampão PCR *buffer minus* Mg-10X, 3,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de solução contendo 10 mmol.L⁻¹ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 µL de cada *primer* (25 µM) (*forward* e *reverse*), 5 µL de DNA genômico (100 ng) e 2 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (JumpStart™ Taq DNA Polimerase), obtendo um volume final de 50 µL. As condições utilizadas foram: 3 minutos a 94°C para desnaturação inicial, um total de 30 ciclos: 1 minuto a 94°C para desnaturação; 1 minuto a 57°C para anelamento; 2 minutos a 72°C para extensão e 5 minutos a 72°C para extensão final. A técnica de PCR foi realizada no termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems, Cingapura).

4.4.1.1 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% horizontal utilizando o tampão TAE 1X (solução estoque 50X – Tris 2 mol.L⁻¹, ácido acético 1 mol.L⁻¹ e EDTA 0,5 mol.L⁻¹ pH 8,0), e o mesmo utilizado para as corridas eletroforéticas. Ao término da corrida, as bandas

foram visualizadas após coloração em brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$) no transluminador E-Gel Imager (LIFE Technologies, Israel). Os fragmentos de DNA amplificados foram comparados com o marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder para determinação do tamanho dos mesmos.

4.4.1.2 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o *Kit Illustra™ GFX™ PCR* (GE Health Care, Reino Unido) e, posteriormente, foram sequenciados. Os produtos foram sequenciados com os mesmos iniciadores utilizados na reação de amplificação do respectivo produto gênico. As reações de sequenciamento foram realizadas no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP) (<http://lgmb.fmrp.usp.br/nsb/>), no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram analisadas utilizando o *software* ChromasPro versão 1.7.6 e, em seguida, utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para pesquisa da identidade com outras sequências disponíveis no Genbank. Posteriormente, as sequências foram alinhadas utilizando o Clustal Omega EMBL-EMI Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4.4.2 Caracterização molecular dos isolados pertencentes ao complexo *B. cepacia*

Reações de PCR foram realizadas para amplificação do gene *recA* utilizando os iniciadores BCR1 (5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA-3') e BCR2 (5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3') amplificando um fragmento de 1.043 pb (Mahenthiralingam et al., 2000). Os produtos amplificados foram visualizados como descrito no item 4.4.1.1. Os volumes para cada reação utilizados foram os mesmos descritos no item 4.4.1. As condições utilizadas foram: 5 min a 94°C para desnaturação inicial, um total de 30 ciclos: 30 segundos a 94°C para desnaturação; 45 segundos a 57°C para anelamento; 1 minuto a 72°C para extensão e 10 minutos a 72°C para extensão final. Os produtos foram sequenciados utilizando combinações dos iniciadores BCR1 (5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA-3') com BCR4 (5'-GCGCAGCGCCTGCGACAT-3') e BCR2 (5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3') com BCR3 (5'-GTCGCAGGCGCTGCGCAA-3') de acordo com Mahenthiralingam et al. (2000), como descrito no item 4.4.1.2.

4.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

4.5.1 Teste de difusão em ágar

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado em ágar Mueller-Hinton (MH) (Oxoid) pelo método de disco difusão, de acordo com as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Para cada gênero foram utilizados seus respectivos discos de antimicrobianos, como descrito abaixo:

A. baumannii: cefepime 30 µg, ceftazidima 30 µg, cefotaxima 30 µg, ceftriaxona 30 µg, gentamicina 10 µg, tobramicina 10 µg, ampicacina 30 µg, meropenem 10 µg, imipenem 10 µg, doxaciclina 30 µg, tetraciclina 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, levofloxacina 5 µg, ampicilina + sulbactam 10/10 µg, piperacilina + tazobactam 100/10 µg, ticarcilina + ácido clavulânico 75/10 µg, minociclina 30 µg e sulfametaxazol + trimetoprim 1.25/23.75 µg.

Complexo *B. cepacia*: ceftazidima 30 µg, meropenem 10 µg, minociclina 30 µg e sulfametaxazol + trimetoprim 1.25/23.75 µg.

P. aeruginosa: cefepime 30 µg, ceftazidima 30 µg, aztreonam 30 µg, meropenem 10 µg, imipenem 10 µg, colistina 10 µg, gentamicina 10 µg, tobramicina 10 µg, ampicacina 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, levofloxacina 5 µg, lomefloxacina 10 µg, piperacilina + tazobactam 100/10 µg e ticarcilina + ácido clavulânico 75/10 µg.

S. maltophilia: levofloxacina 5 µg, minociclina 30 µg e sulfametaxazol + trimetoprim 1.25/23.75 µg.

Os isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram classificados como *Multidrug-resistant* (MDR), *Extensively drug-resistant* (XDR) e *Pandrug-resistant* (PDR) de acordo com Magiorakos et al. (2012). As linhagens de *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e *Escherichia coli* ATCC® 25922 foram utilizadas como controle neste experimento.

4.5.2 Teste da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado em ágar MH para obtenção da CIM dos isolados que foram não suscetíveis aos β-lactâmicos. Foi utilizado o método de diluição em placa, conforme as recomendações do CLSI (2015). Foram preparadas placas do meio MH com diferentes concentrações de antimicrobiano (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL). As colônias bacterianas foram ressuspensas em solução fisiológica esterilizada

(NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com a escala 0,5 MacFarland (1×10^8 UFC/mL). Foram adicionados 5 μ L da mesma nas placas de MH e, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 18-24 horas (Figura 3). As linhagens *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e *E. coli* ATCC® 25922 foram utilizadas como controle neste experimento.

Figura 3 - Representação esquemática da CIM

4.6 Pesquisa dos genes codificadores de β -lactamases

Reações de PCR foram realizadas para detecção dos genes codificadores de β -lactamases descritos de acordo com a tabela 4. Para cada reação foram utilizados 14,75 μ L de água deionizada esterilizada, 2,5 μ L do tampão PCR *buffer minus* Mg-10X, 3,5 μ L de $MgCl_2$ (25mM), 0,5 μ L de solução contendo 10 mmol.L⁻¹ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 μ L de cada primer (25 μ M) (*forward* e *reverse*), 1 μ L (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (JumpStart™ Taq DNA Polimerase) e 2,5 μ L (100 ng) de DNA genômico, obtendo um volume final de 25 μ L. Os produtos amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0%, purificados e sequenciados como descrito no item 4.4.1.1 e 4.4.1.2. As condições utilizadas estão descritas nas tabelas 5. Neste experimento foram utilizadas linhagens controle cedidas pelo Dr. Johann D. D. Pitout, da Universidade de Calgary (Canadá).

Tabela 4 - Iniciadores utilizados nas reações de detecção dos genes codificadores de β -lactamases

Genes	Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 1	MultiCTXMGp1_for MultiCTXMGp1-2_rev	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	60	688	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 2	MultiCTXMGp2_for MultiCTXMGp1-2_rev	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	60	404	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 8	CTX-Mg8/25_for CTX-Mg8/25_rev	AACRCRCAGACGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGTYAT	60	326	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 9	MultiCTXMGp9_for MultiCTXMGp9_rev	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG	60	561	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{VEB}	MultiVEB_for MultiVEB_rev	CATTTCGCGATGCAAAGCGT CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	60	648	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{PER}	MultiPER_for MultiPER_rev	GCTCCGATAATGAAAGCGT TTCGGCTTGACTCGGCTGA	60	520	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{SHV}	MultiTSO-S_for MultiTSO-S_rev	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	60	713	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA-1-like}	MultiTSO-O_for MultiTSO-O_rev	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCTGTGAAGTG	60	564	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	MultiOXA-48_for MultiOXA-48_rev	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	57	281	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA-68B Pre-OXA-58prom+	CCAGTGGATGGATGGATAGATTATC TTATCAAAATCCAATCGGC	52	934	Heritier et al., 2005
<i>bla</i> _{KPC}	MultiKPC_for MultiKPC_rev	CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC ACGACGGCATAGTCATTTGC	55	538	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{GES}	MultiGES_for MultiGES_rev	AGTCGGCTAGACCGGAAAG TTTGTCCGTGCTCAGGAT	57	399	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{VIM}	VIM2004A VIM2004B	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	58	382	Pitout et al., 2005
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-A IMP-B	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC GTACGTTTCAAGAGTGATGC	54	587	Pitout et al., 2005
<i>bla</i> _{SPM}	SPM F SPM R	GAGAGCCCTGCTTGATTTCAT CAGTCTCATTTGCGCAACGG	59	811	Clímaco et al., 2013
<i>bla</i> _{SIM}	SIM-F SIM-R	TACAAGGGATTTCGGCATC TAATGGGGCTGTTCATGTG	52	570	Ellington et al., 2007
<i>bla</i> _{GIM}	GIM-F GIM-R	TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACCTTGCCATGC	52	477	Ellington et al., 2007

<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F1 NDM-R1	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC GGTCGCGAAGCTGAGCACC GCAT	60	782	Peirano et al., 2011
<i>bla</i> _{BEL}	Pre-BEL-A Pre-BEL-B	AGACGTAAGCCTATAATCTC GCGAATTGTTAGACGTATG	50	852	Poirel et al., 2010
<i>bla</i> _{MOX} e <i>bla</i> _{CMY}	MultiCaseMOX_for MultiCaseMOX_rev	GCAACAACGACAATCCATCCT GGGATAGGCGTAACCTCTCCCAA	60	895	Dallenne et al., 2010
<i>bla</i> _{BKC}	BKC-1-F BKC-1-R	ACATAATCTCGCAACGGGCG TCGCCGGTCTTGTTTCATCAC	60	513	Nicoletti et al., 2015
<i>bla</i> _{SME}	IRS1 IRS2	AACGGCTTCATTTTTGTTTAG GCTTCCGCAATAGTTTATCA	58	830	Queenan et al., 2000

Tabela 5 - Condições utilizadas nas reações de detecção dos genes codificadores de β -lactamases

Genes	Primeiro estágio	Segundo estágio				Terceiro estágio
	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Extensão final
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 1	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 2	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 8	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 9	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{VEB}	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{PER}	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{SHV}	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{OXA-1-like}	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 57 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{OXA-58}	5 minutos - 94 °C	30 segundos - 94 °C	45 segundos - 52 °C	1 minuto - 72 °C	35	10 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{KPC}	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 55 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{GES}	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 57 °C	1 minuto - 72 °C	30	7 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{VIM}	5 minutos - 94 °C	1 minuto - 94 °C	1 minuto - 58 °C	1 minuto - 72 °C	35	5 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{IMP}	5 minutos - 94 °C	1 minuto - 94 °C	1 minuto - 54 °C	1 minuto e 30 segundos - 72 °C	30	5 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{SPM}	5 minutos - 95 °C	1 minuto - 95 °C	1 minuto - 59 °C	1 minuto - 72 °C	30	10 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{SIM}	5 minutos - 94 °C	30 segundos - 94 °C	40 segundos - 52 °C	50 segundos - 72 °C	35	5 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{GIM}	5 minutos - 94 °C	30 segundos - 94 °C	40 segundos - 52 °C	50 segundos - 72 °C	35	5 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{NDM}	5 minutos - 95 °C	45 segundos - 95 °C	45 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	35	8 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{BEL}	5 minutos - 95 °C	1 minuto - 95 °C	1 minuto - 50 °C	1 minuto - 72 °C	30	10 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{MOX} e <i>bla</i> _{CMY}	10 minutos - 94 °C	40 segundos - 94 °C	40 segundos - 60 °C	40 segundos - 72 °C	30	10 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{BKC}	10 minutos - 95 °C	30 segundos - 94 °C	30 segundos - 60 °C	1 minuto - 72 °C	35	10 minutos - 72 °C
<i>bla</i> _{SME}	10 minutos - 95 °C	30 segundos - 94 °C	30 segundos - 58 °C	30 segundos - 72 °C	30	10 minutos - 72 °C

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos isolados

No presente estudo foram isolados 60 BGNF, dentre eles, 24 pertencentes ao complexo *B. cepacia*, 13 *P. aeruginosa*, 13 *S. maltophilia* e dez *A. baumannii*, de acordo com a amplificação e o sequenciamento do gene 23S rRNA. Dentre os isolados pertencentes ao complexo *B. cepacia*, 17 foram identificados como *B. cenocepacia*, três como *B. cepacia* e dois como *B. ambifaria* e *B. lata*, de acordo com o sequenciamento do gene *recA*.

Esses isolados foram obtidos de diferentes cidades pertencentes às cinco regiões brasileiras. A figura 4 apresenta a distribuição das bactérias isoladas de acordo com a origem e o tipo de cultura. A maior parte dos isolados (47) pertence à região Sudeste e os demais foram isolados do Centro-Oeste (5), do Norte (3), do Nordeste (3) e do Sul (2). Observa-se que 15 isolados foram obtidos de cultura de milho, 14 de cana-de-açúcar, dez de soja, oito de café e 14 de outras culturas, como de eucalipto, laranja-lima, braquiária, pastagem, de área de dessecação (anterior milho), sorgo, mamão e acerola. Todos os isolados estudados, de acordo com gênero/espécie, cultura, origem e estado estão descritos no apêndice A.

Figura 4 - Porcentagem das bactérias isoladas por local de origem e a fonte de isolamento (cultura)

5.2 Perfil de resistência e Detecção dos genes codificadores de β -lactamases

Dentre os isolados de *A. baumannii*, todos foram não suscetíveis para cefotaxima e ceftriaxona, sete para ceftazidima, cinco para piperacilina + tazobactam, quatro para imipenem, ampicilina + sulbactam e tetraciclina, três para cefepime e sulfametoxazol + trimetoprim, dois para tobramicina, gentamicina, amicacina, meropenem, minociclina e um para doxacilina e ticarciclina + ácido clavulânico. Todos os isolados foram suscetíveis para ciprofloxacina e levofloxacina (Tabela 6).

Todos os isolados de *A. baumannii* não suscetíveis para cefotaxima, ceftazidima e cefepime apresentaram CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ e CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ para ceftriaxona. Para imipenem, um isolado apresentou CIM 128 $\mu\text{g/mL}$ e três CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$. Para ampicilina + sulbactam, os isolados apresentaram diferentes CIMs, como CIM 64/32 $\mu\text{g/mL}$ e CIM $> 256/128$ $\mu\text{g/mL}$. Para meropenem e piperacilina + tazobactam os isolados apresentaram CIM 16 e $> 256/4$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dentre os dez isolados de *A. baumannii*, oito apresentaram o *bla*_{SHV}, dois *bla*_{GES} e um *bla*_{CTX-M-Gp9}. Dois isolados não apresentaram nenhum dos genes pesquisados (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil de resistência, CIM dos β -lactâmicos e genes codificadores de β -lactamases detectados em *A. baumannii*

Perfil de resistência			
Isolado	Difusão em ágar	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Genes encontrados
S389	CAZ, CRO, CTX e PIT	CAZ 64	<i>bla</i> _{SHV}
		CRO 32	
		CTX 64	
		PIT $> 256/4$	
S400	CAZ, CRO, CTX e PIT	CAZ 64	<i>bla</i> _{SHV}
		CRO 16	
		CTX 64	
		PIT $> 256/4$	
S401	CRO, CTX, APS, TET e SUT	CRO 64	<i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{GES}
		CTX 64	
		APS 64/32	
		CPM > 256	
S402	CPM, CAZ, CRO, CTX, IPM, MPM, PIT, APS, TAC, TET, SUT, GEN, TOB e AMI	CAZ 32	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{GES} e <i>bla</i> _{CTX-M-Gp9}
		CRO > 256	
		CTX > 32	
		IPM 2	
		MPM 16	
		PIT $> 256/4$	
		APS 64/32	

S447	CAZ, CRO, CTX, IPM, PIT, APS, GEN, TOB, AMI, TET, DOX e SUT	CAZ	> 256	Nenhum gene encontrado
		CRO	32	
		CTX	64	
		PIT	> 256/4	
		APS	64/32	
		IPM	1	
S448	CRO, CTX, PIT e IPM	CRO	32	<i>bla_{SHV}</i>
		CTX	64	
		IPM	1	
		PIT	> 256/4	
S449	CAZ, CRO e CTX	CAZ	64	Nenhum gene encontrado
		CRO	64	
		CTX	64	
S450	CRO e CTX	CRO	32	<i>bla_{SHV}</i>
		CTX	32	
S451	CAZ, CRO, CTX, CPM, IPM, MPM, APS, TET, DOX e MIN	CPM	64	<i>bla_{SHV}</i>
		CAZ	256	
		CRO	> 256	
		CTX	> 256	
		IPM	128	
		MPM	16	
		APS	> 256/128	
S452	CAZ, CRO, CTX e CPM	CPM	32	<i>bla_{SHV}</i>
		CAZ	64	
		CRO	64	
		CTX	32	

Legenda: Ceftazidima, CAZ; Ceftriaxona, CRO; Cefotaxima, CTX; Cefepime, CPM; Imipenem, IPM; Meropenem, MPM; Ampicilina + Sulbactam, APS; Ticarcilina + Clavulanato, TAC; Piperacilina + Tazobactam, PIT; Tetraciclina, TET; Doxacilina, DOX; Minociclina, MIN; Gentamicina, GEN; Tobramicina, TOB; Amicacina, AMI; Ciprofloxacina, CIP; Sulfametoxazol + Trimetoprim, SUT.

Dentre os isolados pertencentes ao complexo *B. cepacia*, 16 foram não suscetíveis para ceftazidima, cinco para sulfametaxazol + trimetoprim, dois para meropenem e minociclina. Para os isolados não suscetíveis à ceftazidima, dez apresentaram CIM ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ e seis apresentaram CIM entre 8 e 64 $\mu\text{g/mL}$. Para o meropenem, os isolados apresentaram CIM 1 e 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 7).

Dentre estes isolados, 14 apresentaram *bla_{SHV}*, cinco *bla_{GES}* e *bla_{OXA-1-like}*, três *bla_{KPC}*, dois *bla_{CTX-M-Gp1}* e um *bla_{VIM}*. Um isolado não apresentou nenhum dos genes pesquisados (Tabela 7).

Tabela 7 - Perfil de resistência, CIM dos β -lactâmicos e genes codificadores de β -lactamases detectados em bactérias pertencentes ao complexo *B. cepacia*

Perfil de resistência				
Isolado	Difusão em ágar	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		Genes encontrados
S404	CAZ	CAZ	64	<i>bla_{SHV}</i>
S405	CAZ	CAZ	16	<i>bla_{GES}</i> e <i>bla_{OXA-1-like}</i>
S406	CAZ e SUT	CAZ	16	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{GES}</i> , <i>bla_{CTX-M-Gp1}</i> e <i>bla_{OXA-1-like}</i>
S409	CAZ	CAZ	128	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{GES}</i> e <i>bla_{OXA-1-like}</i>
S410	CAZ e SUT	CAZ	> 256	<i>bla_{SHV}</i>
S411	CAZ	CAZ	64	<i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{GES}</i>
S412	CAZ	CAZ	32	Nenhum gene encontrado
S413	CAZ	CAZ	> 256	<i>bla_{SHV}</i>
S414	CAZ e SUT	CAZ	> 256	<i>bla_{SHV}</i>
S415	CAZ	CAZ	128	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M-Gp1}</i> e <i>bla_{KPC}</i>
S416	CAZ e MIN	CAZ	> 256	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{GES}</i> e <i>bla_{OXA-1-like}</i>
S417	CAZ	CAZ	> 256	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{OXA-1-like}</i> e <i>bla_{KPC}</i>
S420	CAZ	CAZ	> 256	<i>bla_{SHV}</i>
S422	CAZ, MPM, SUT e MIN	CAZ	8	<i>bla_{SHV}</i>
		MPM	4	
S424	CAZ e SUT	CAZ	> 256	<i>bla_{SHV}</i>
S426	CAZ, MPM	CAZ	128	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{VIM}</i>
		MPM	1	

Legenda: Ceftazidima, CAZ; Meropenem, MPM; Sulfametoxazol + Trimetoprim, SUT; Minociclina, MIN.

Dentre os isolados de *P. aeruginosa*, todos foram não suscetíveis para aztreonam, dois para ticarcilina + clavulanato, polimixina e colistina e um para ceftazidima, piperacilina + tazobactam e tobramicina. Todos os isolados foram suscetíveis para cefepime, meropenem, imipenem, gentamicina, ampicacina, levofloxacina e lomefloxacina. Para os isolados não suscetíveis ao aztreonam, todos apresentaram CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ e para ceftazidima e piperacilina + tazobactam o isolado apresentou CIM 256 e $> 256/4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 8).

Dentre estes isolados, sete apresentaram o *bla_{GES}*, três *bla_{VEB}*, dois *bla_{SHV}* e um *bla_{PER}* e *bla_{CTX-M-Gp1}*. Três isolados não apresentaram nenhum dos genes pesquisados (Tabela 8).

Tabela 8 - Perfil de resistência, CIM dos β -lactâmicos e genes codificadores de β -lactamases detectados em *P. aeruginosa*

Perfil de resistência				
Isolado	Difusão em ágar	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		Genes encontrados
S21	ATM	ATM	128	Nenhum gene encontrado
S28	ATM	ATM	> 256	<i>bla_{GES}</i>
S30	ATM	ATM	128	Nenhum gene encontrado
S43	ATM	ATM	256	<i>bla_{GES}</i>

S47	ATM	ATM	128	<i>bla</i> _{GES} e <i>bla</i> _{SHV}
S48	ATM	ATM	256	<i>bla</i> _{GES} e <i>bla</i> _{VEB}
S53	ATM	ATM	64	<i>bla</i> _{GES} e <i>bla</i> _{VEB}
S54	ATM	ATM	32	<i>bla</i> _{GES}
S81	ATM	ATM	64	<i>bla</i> _{SHV}
S106	ATM	ATM	> 256	<i>bla</i> _{CTX-M-Gp1}
S142	ATM	ATM	64	Nenhum gene encontrado
S438	ATM, TAC, POL e COL	ATM	> 256	<i>bla</i> _{GES} e <i>bla</i> _{PER}
S439	ATM, CAZ, PIT, TAC, POL, COL e TOB	ATM	> 256	<i>bla</i> _{VEB}
		CAZ	> 256	
		PIT	> 256/4	

Legenda: Aztreonam, ATM; Ceftazidima, CAZ; Piperacilina + Tazobactam, PIT; Ticarcilina + clavulanato, TAC; Tobramicina, TOB; Polimixina B, POL; Colistina, COL.

Para os isolados de *S. maltophilia*, quatro isolados foram não suscetíveis para minociclina e três para sulfametaxazol + trimetoprim. Todos foram suscetíveis para levofloxacina. Dentre os 13 isolados de *S. maltophilia*, 11 foram não suscetíveis para ceftazidima, sendo que, sete apresentaram CIM ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$, dois CIM 128 $\mu\text{g/mL}$ e CIM 32 $\mu\text{g/mL}$. Estes isolados apresentaram seis *bla*_{OXA-1-like}, quatro *bla*_{PER}, dois *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M-Gp1} e um *bla*_{NDM-1}. Dois isolados não apresentaram nenhum dos genes pesquisados (Tabela 9).

Tabela 9 - Perfil de resistência, CIM para ceftazidima e genes codificadores de β -lactamases detectados em *S. maltophilia*

Perfil de resistência				
Isolado	Difusão em ágar	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		Genes encontrados
S427	MIN	CAZ	32	<i>bla</i> _{OXA-1-like}
S428	SUT	CAZ	> 256	<i>bla</i> _{OXA-1-like}
S429	SUT	CAZ	> 256	<i>bla</i> _{PER} e <i>bla</i> _{OXA-1-like}
S430	Suscetível	CAZ	> 256	<i>bla</i> _{PER} e <i>bla</i> _{OXA-1-like}
S431	Suscetível	CAZ	> 256	<i>bla</i> _{NDM-1}
S432	Suscetível	CAZ	> 256	<i>bla</i> _{PER}
S434	Suscetível	CAZ	32	<i>bla</i> _{CTX-M-Gp1} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{PER}
S436	MIN	CAZ	128	<i>bla</i> _{CTX-M-Gp1} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{OXA-1-like}
S437	SUT	CAZ	128	Nenhum gene encontrado
S445	MIN	CAZ	> 256	<i>bla</i> _{OXA-1-like}
S446	MIN	CAZ	> 256	Nenhum gene encontrado

Legenda: Ceftazidima, CAZ; Minociclina, MIN; Sulfametoxazol + Trimetoprim, SUT.

Portanto, dentre os 60 BGNNF isolados no estudo, 50 foram não suscetíveis a pelos menos um antimicrobiano β -lactâmico. Foram pesquisados 23 diferentes genes codificadores de β -lactamases e foi detectado um total de 70, sendo 26 *bla*_{SHV}, 14 *bla*_{GES}, 11 *bla*_{OXA-1-like}, cinco *bla*_{PER} e *bla*_{CTX-M-Gp1}, três *bla*_{KPC} e *bla*_{VEB} e um *bla*_{CTX-M-Gp9}, *bla*_{VIM} e *bla*_{NDM}. Nenhum

dos isolados apresentou *bla*_{CTX-M-Gp2}, *bla*_{CTX-M-Gp8}, *bla*_{CMY}, *bla*_{MOX}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{SPM}, *bla*_{BKC}, *bla*_{SME}, *bla*_{BEL}, *bla*_{SIM} e *bla*_{GIM}.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os BGNNF são patógenos oportunistas e podem ser encontrados em diferentes ambientes, como no solo, na água e no âmbito hospitalar, onde esses patógenos estão associados principalmente a condições pulmonares crônicas, como em pacientes com FC. Os BGNNF se destacam devido à ubiquidade, resistência intrínseca e adquirida a diferentes antimicrobianos e em decorrência da grande prevalência em pacientes imunocomprometidos. O maior desafio frente a estes patógenos é a identificação, visto que, em comparação com as enterobactérias, estes patógenos são menos relatados e, consequentemente, erros na identificação podem ocasionar a escolha inadequada do antimicrobiano para fim terapêutico (Chawla et al., 2013; Malini et al., 2009).

Dentre a grande diversidade de gêneros pertencentes aos BGNNF, *A. baumannii*, complexo *B. cepacia*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* se destacam, pois são comumente relatados, sendo responsáveis por diferentes tipos de infecção. Outros BGNNF também são relatados, como diferentes espécies pertencentes aos gêneros *Ochrobactrum*, *Achromobacter* e *Sphingomonas*. No presente estudo, 60 BGNNF foram isolados de diferentes amostras de solo provenientes de diferentes estados e cidades das cinco regiões do Brasil. Bactérias pertencentes ao complexo *B. cepacia* foram as mais isoladas (40%), seguido de *P. aeruginosa* (21,7%), *S. maltophilia* (21,7%) e *A. baumannii* (16,6%). A maior parte dos isolados (78,3%) pertence a região Sudeste, tendo milho (23,3%), como maior fonte de cultura obtida.

Os antimicrobianos β -lactâmicos são amplamente utilizados para o tratamento de diferentes tipos de infecções em todo o mundo e a resistência a esses antimicrobianos cresceu acentuadamente, o que é de grande preocupação. O principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas é a produção de β -lactamases, que gera a hidrólise desses antimicrobianos e, consequentemente, a perda do efeito. Neste estudo um total de 22 antimicrobianos foram testados, sendo 12 β -lactâmicos. Dentre os isolados, 50 (83,3%) foram não suscetíveis a pelo menos um β -lactâmico. Um total de 23 genes codificadores de β -lactamases de importância clínica foram pesquisados, e 70 desses genes foram detectados em 43 isolados. O gene *bla*_{TEM} não foi pesquisado devido ao fato que, preparações comerciais da enzima Taq polimerase foram contaminadas com DNA exógeno do gene *bla*_{TEM-116} e apenas através do sequenciamento de todos os isolados, seria possível determinar a variante desse gene (Jacoby & Bush, 2016; Furlan et al., 2017).

A. baumannii é um dos BGNF nosocomiais mais importantes e, que ao passar dos anos, tem se tornado mais resistente a diferentes classes de antimicrobianos. A taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos que adquirem este patógeno é aproximadamente 30% (Wilson et al., 2004). Desde 1977, surtos por este patógeno já vinham sendo descritos (Villegas & Hartstein, 2003) e diferentes relatos de *A. baumannii* MDR no âmbito clínico foram descritos em todo o mundo, inclusive no Brasil (Perez et al., 2007).

Os isolados ambientais de *A. baumannii* deste estudo apresentaram não suscetibilidade a maioria dos antimicrobianos testados, principalmente para as cefalosporinas de espectro estendido (ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima). Estes resultados corroboram com os descritos por Zeka et al. (2014), onde todos os isolados foram não suscetíveis para todos os β -lactâmicos e outras classes de antimicrobianos, incluindo as cefalosporinas de espectro estendido e carbapenêmicos. Estudos similares também demonstraram altos MICs aos β -lactâmicos, como descritos por Zago et al. (2016), Shakil & Khan (2010), Cicek et al. (2014) e Bogaerts et al. (2010). Isolados de *A. baumannii* MDR são cada vez mais reportados em todo o mundo, principalmente em infecções nosocomiais, e dentre os isolados ambientais do presente estudo, cinco (S401, S402, S447, S448 e S451) foram classificados como MDR, de acordo com Magiorakos et al. (2012).

Diferentes genes codificadores de β -lactamase são descritos em isolados de *A. baumannii* de diferentes fontes (Perez et al., 2007). Os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{GES} e *bla*_{CTX-M-Gp9} foram detectados nos isolados ambientais de *A. baumannii* de presente estudo, sendo que, o gene mais prevalente foi o *bla*_{SHV}, em 80% dos isolados, seguido do *bla*_{GES} (20%) e *bla*_{CTX-M-Gp9} (10%). Esses genes fazem parte do grupo 2, de acordo com Bush & Jacoby (2010). O primeiro relato de *A. baumannii* produzindo SHV foi na China em 2004 (Huang et al., 2004). Em seguida, outros relatos foram reportados, como nos Estados Unidos e na Holanda, onde além de SHV, outros genes codificadores de β -lactamases foram detectados (Naiemi et al., 2005; Naas et al., 2007).

Os genes pertencentes ao grupo *bla*_{CTX-M} são muito reportados em enterobactérias, entretanto, existem poucos relatos destes genes em *A. baumannii*. Os primeiros relatos destas enzimas em *A. baumannii* foram em 2004, em um isolado clínico no Japão, que apresentou CTX-M-2 (Nagano et al., 2004). Dentre as enzimas pertencentes ao grupo CTX-M, a grande maioria dos relatos em *A. baumannii* é da CTX-M-15 (Shakil & Khan, 2010; Potron et al., 2011) e no Brasil, o primeiro relato foi em 2016, em um isolado clínico da cidade de Maringá (Zago et al., 2016). A detecção da β -lactamase do tipo GES em *A. baumannii* tem sido cada vez mais relatada em associação com diferentes elementos genéticos móveis. A β -lactamase

GES foi descrita pela primeira vez em 1998, em um isolado clínico de *K. pneumoniae* (Poirel et al., 2000) e, desde então, diversos relatos desta enzima foram descritos em *A. baumannii*, como na Bélgica, Kuwait, França, África e Turquia (Bogaerts et al., 2010; Bonnin et al., 2011; Moubareck et al., 2009; Chihi et al., 2016; Zeka et al., 2014; Cicek et al., 2014).

O complexo *B. cepacia* é um grupo de 20 espécies bacterianas estritamente relacionadas fenotipicamente e genotipicamente, o que dificulta a identificação correta dessas bactérias. A identificação de bactérias pertencentes ao complexo *B. cepacia* é realizada através da amplificação e sequenciamento do gene *recA* (RecA, proteína essencial para o reparo e recombinação de DNA) (Mahenthiralingam et al., 2000), visto que, o 16S rRNA e/ou 23S rRNA não conseguem diferenciar as espécies desse complexo (Eisen, 1995; Karlin, 1995; Hunt et al., 2006). Dentre os 24 isolados ambientais pertencentes ao complexo *B. cepacia* do presente estudo, 17 (70,9%) foram identificados como *B. cenocepacia*, três (12,5%) como *B. cepacia* e dois (8,3%) como *B. ambifaria* e *B. lata*, de acordo com o sequenciamento do gene *recA*.

Os resultados encontrados aqui, em relação ao perfil de resistência para ceftazidima, são diferentes dos encontrados por Leitão et al. (2008), visto que, 96% dos isolados clínicos pertencentes ao complexo *B. cepacia* eram suscetíveis a este antimicrobiano pelo teste de difusão do disco. Em estudos realizados por Nzula et al. (2002), os autores mostraram que a maioria dos isolados clínicos e ambientais pertencentes ao complexo *B. cepacia* eram suscetíveis à ceftazidima. Outros estudos compararam a suscetibilidade de diferentes antimicrobianos em isolados pertencentes ao complexo *B. cepacia* de pacientes com FC e não FC. Os isolados de pacientes com FC apresentaram menor suscetibilidade a diferentes antimicrobianos, incluindo os β -lactâmicos, como meropenem e ceftazidima (Spangler et al., 1996; Kurlandsky & Fader, 2000).

Dentre os poucos antimicrobianos preconizados para testes de suscetibilidade pelo CLSI (2015), estão ceftazidima, meropenem, minociclina e sulfametoxazol + trimetoprim. Todos os isolados analisados foram não suscetíveis a estes antimicrobianos, tendo uma variação de 8 a 66%. Esses isolados apresentaram um alto nível de resistência para a ceftazidima (66%), que é um dos antimicrobianos utilizados para o tratamento de pacientes infectados por este complexo, visto que o tratamento é bastante limitado devido ao alto nível de resistência intrínseca a diferentes classes de antimicrobianos.

A resistência do complexo *B. cepacia* para diferentes classes de antimicrobianos ocorre através dos diferentes mecanismos. A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos está relacionada com a indução de β -lactamases cromossômicas (Rhodes & Schweizer, 2016;

Prince et al., 1988; Trépanier et al., 1997). Tribuddharat et al. (2003) relataram que mutações na β -lactamase cromossômica PenA induz resistência a ceftazidima e ao ácido clavulânico. Este mecanismo pode estar associado ao perfil de resistência do isolado S412, visto que, os genes codificadores de β -lactamases pesquisados não foram encontrados nesse isolado.

Os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-1-like}, *bla*_{CTX-M-Gp1}, *bla*_{KPC} e *bla*_{VIM} foram detectados neste complexo e são classificados como grupos 2 e 3, de acordo com Bush & Jacoby (2010). Estes genes juntos podem hidrolisar todos os β -lactâmicos e são descritos como genes de importância clínica. Estes genes são relatados em bactérias Gram-negativas clínicas e ambientais. No entanto, não há relatos destes genes em bactérias do complexo *B. cepacia*, provavelmente, devido aos poucos estudos, visto que esse complexo possui a presença de β -lactamases cromossômicas induzíveis. Os genes codificadores de β -lactamases são descritos em diferentes elementos genéticos móveis e o estudo do genoma da *B. cenocepacia* J2315 (Holden et al., 2009) mostrou a presença de diversos desses elementos e ilhas genômicas, que são adquiridos pela transferência horizontal de genes.

Pseudomonas aeruginosa é o BGNNF mais comumente isolado em pacientes imunocomprometidos, principalmente em pacientes com FC e com queimaduras graves, ocasionando altas taxas de morbidade e mortalidade. As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno são cada vez mais limitadas, devido à emergência contínua e à disseminação de linhagens resistentes a diferentes classes de antimicrobianos (Gellatly & Hancock, 2013). Todos os mecanismos de resistência conhecidos (intrínseca, adquirida e adaptável) podem ser encontrados neste patógeno e, algumas vezes, dentro do mesmo isolado (Moore & Flaws, 2011).

Todos os isolados ambientais de *P. aeruginosa* deste estudo apresentaram não suscetibilidade ao aztreonam, e dois isolados (S438 e S439) foram não suscetíveis a outros antimicrobianos, incluindo os β -lactâmicos piperacilina + tazobactam, ticarcilina + ácido clavulânico e ceftazidima. Essa alta quantidade de isolados não suscetíveis ao aztreonam (100%), é devido ao método de isolamento utilizado neste estudo, onde o aztreonam é adicionado no meio seletivo. Hashem et al. (2016) e Goli et al. (2016) também relataram um alto nível de não suscetibilidade a este antimicrobiano em isolados clínicos. A resistência ao aztreonam em *P. aeruginosa* ocorre principalmente por bomba de efluxo (Gellatly & Hancock, 2013), entretanto, algumas β -lactamases também conferem resistência a este antimicrobiano (Bush & Jacoby, 2010). O aztreonam é muito utilizado para o tratamento em pacientes com FC, devido à sua baixa nefrotoxicidade e ototoxicidade (Oermann et al., 2011). Nenhum

desses isolados foi classificado como MDR, XDR ou PDR, de acordo com Magiorakos et al. (2012).

Muitos relatos de diferentes genes codificadores de β -lactamase são descritos em *P. aeruginosa*. Os genes detectados nos isolados ambientais de *P. aeruginosa* do presente estudo, fazem parte do grupo 2, de acordo com Bush & Jacoby (2010), sendo eles, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{SHV}, *bla*_{PER} e *bla*_{CTX-M-GpI}. A maior prevalência foi o gene *bla*_{GES}, que foi detectado em 53% dos isolados. O primeiro relato do gene *bla*_{GES} em *P. aeruginosa* foi em 2002, entretanto, a linhagem em que este gene foi detectado, foi isolado em 1999 na França (Dubois et al., 2002), um ano após a descoberta desse gene em *K. pneumoniae* (Poirel et al., 2000). Posteriormente, esse gene foi detectado em isolados de *P. aeruginosa* de diferentes países (Poirel et al., 2001; Weldhagen et al., 2004; Labuschagne et al., 2008; Malkoçoğlu et al., 2017). No Brasil, o primeiro relato da β -lactamase GES em *P. aeruginosa* foi em 2002, (Castanheira et al., 2004) e, posteriormente, outros relatos aconteceram (Pellegrino et al., 2006; Picão et al., 2009; Polotto et al., 2012; Rizek et al., 2014).

β -lactamases do tipo SHV, PER e VEB são muito relatadas em isolados de *P. aeruginosa* e surtos deste patógeno carreando estas enzimas já ocorreram (Celeza et al., 2006; Katvoravutthichai et al., 2016). Essas enzimas foram detectadas pela primeira vez em *P. aeruginosa* na década de 1990, sendo SHV em 1996, PER em 1993 e VEB em 1999 (Naas et al., 1999; Nordmann et al., 1993; Girlich et al., 2001). As β -lactamases do grupo CTX-M são menos comumente relatadas em *P. aeruginosa*, em comparação com as outras ESBL. O primeiro relato da detecção de CTX-M-1 e CTX-M-2 em *P. aeruginosa* foi em 2006, na Holanda e na Bolívia, respectivamente (Naiemi et al., 2006; Celenza et al., 2006). Posteriormente outros relatos aconteceram (Jiang et al., 2006; Katvoravutthichai et al., 2016) e, no Brasil, este grupo de enzimas já foi relatado, como descrito por Picão et al. (2009) e Polotto et al. (2012).

S. maltophilia é um patógeno associado com altas taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos e que recebeu atenção crescente dos pesquisadores devido ao alto nível de resistência intrínseca a diferentes classes de antimicrobianos, adaptação a diferentes ambientes e formação de biofilmes. Diferentes mecanismos de resistência associados com elementos genéticos móveis contribuem para a resistência às diferentes classes de antimicrobianos, incluindo os β -lactâmicos (Booke 2012; Barbolla et al., 2004). *S. maltophilia* possui duas β -lactamases codificadas cromosomicamente, L1 e L2. A β -lactamase L1 é classificada como Metallo- β -lactamase e a L2 como cefalosporinase (Walsh et al., 1994; Walsh et al., 1997).

O CLSI (2015) recomenda para *S. maltophilia* o teste de seis antimicrobianos, sendo três por disco difusão e três por MIC. Todos os isolados do presente estudo foram sensíveis para levofloxacina, entretanto, 11 apresentaram não suscetibilidade a pelo menos um dos antimicrobianos testados, incluindo a ceftazidima. Estudos realizados por Pfaller em 1999, relataram que isolados clínicos de *S. maltophilia* coletados em 1997 dos Estados Unidos, Canadá e América latina foram 64,7%, 24% e 93,3% suscetíveis para ceftazidima, respectivamente. Tatman-Otkun et al. (2005) e Jamali et al. (2011) relataram também em isolados clínicos na Turquia e Irã, 67% e 82% de suscetibilidade para ceftazidima, respectivamente. Os isolados ambientais de *S. maltophilia* do presente estudo apresentaram o oposto dos isolados clínicos descritos anteriormente, visto que, apenas 15,4% foram suscetíveis à ceftazidima.

Os genes *bla*_{OXA-1-like}, *bla*_{PER}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-Gp1} e *bla*_{NDM} foram detectados nos isolados de *S. maltophilia* deste estudo e fazem parte dos grupos 2 e 3, de acordo com Bush & Jadooby (2010). Naiemi et al. (2006) reportaram os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M-1} pela primeira vez um isolado clínico de *S. maltophilia* na Holanda. Dois anos depois, Lavigne et al. (2008), também em isolados clínicos, relataram a presença de *bla*_{CTX-M-15}. Em 2014, Maravić e colaboradores relataram a presença de *bla*_{CTX-M-15} em isolados de *S. maltophilia* de diferentes origens, como em mexilhão e água do mar. Os isolados ambientes de *S. maltophilia* deste estudo também apresentaram estes genes, entretanto, outros genes também foram detectados, como *bla*_{OXA-1-like}, *bla*_{PER} e *bla*_{NDM-1}.

New Delhi Metallo-β-Lactamase (NDM) é uma das mais importantes e preocupantes β-lactamases e possui um amplo espectro de ação sobre os β-lactâmicos, exceto para aztreonam. NDM tem sido amplamente pesquisada e, embora seja descrita principalmente em isolados clínicos, existem relatos em bactérias isoladas do solo e da água (Wang & Sun, 2015; Campana et al., 2016). Em algumas cidades da Índia e da China, NDM é considerada endêmica e em países como a Colômbia, Egito e Arábia Saudita, surtos por bactérias produtoras de NDM já foram relatados. Diversos casos esporádicos são relatados em todo o mundo, inclusive no Brasil (Dortet et al., 2014).

Dentre os patógenos oportunistas do presente estudo, bactérias pertencentes ao complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia* são intrinsecamente resistentes a uma grande variedade de antimicrobianos, portanto, a sobrevivência destes patógenos não depende da seleção de linhagens que abrigam mecanismos de resistência adquiridos, em comparação com os outros gêneros que estão associados com o ambiente nosocomial. Não se conhece a importância exata dos genes codificadores de β-lactamases para a resistência aos β-lactâmicos em

bactérias pertencentes ao complexo de *B. cepacia* e *S. maltophilia*, devido à presença de suas β -lactamases intrínsecas, porém, essas bactérias podem abrigar esses genes e transferi-los para outras bactérias, tornando-as resistentes.

Os genes codificadores de β -lactamases são cada vez mais relatados em todo o mundo, predominantemente em isolados clínicos (Bush, 2010), onde a maioria dos estudos estão concentrados. Existem poucos relatos desses genes em bactérias ambientais, provavelmente devido aos poucos estudos nessas fontes de isolamento (Furlan & Stehling, 2017; Pitondo-Silva et al., 2015; Pitondo-Silva et al., 2016). Além destas fontes de isolamento, os genes codificadores de β -lactamases já foram relatados em isolados de animais, como porcos, aves de capoeira e bovinos (Ewers et al., 2012) e vegetais (Ben Said et al., 2016).

Um dos principais diferenciais de bacilos Gram-negativos não fermentantes é a diversidade de mecanismos de resistência para diferentes classes de antimicrobianos, incluindo os β -lactâmicos. Diferentes MICs foram encontrados em diferentes isolados com os mesmos genes de resistência. Este fato está relacionado com os diferentes mecanismos de resistência aos β -lactâmicos e aos parâmetros cinéticos, como a afinidade enzimática para o substrato, taxa de rotatividade e a quantidade de enzima produzida, na qual contribuem para a determinação do MIC. Estudos realizados por Antunes et al. (2014) demonstraram a importância do gênero bacteriano para a determinação do espectro de ação de diferentes β -lactamases, sendo assim, possível realizar a associação com diferentes MICs.

A contaminação do meio ambiente com antimicrobianos seleciona as bactérias resistentes e proporciona uma oportunidade para a aquisição de genes resistência, incluindo os genes codificadores de β -lactamases, por outras bactérias. O meio ambiente é considerado um grande reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos, de modo que as mudanças nesses ecossistemas podem ser relevantes para o surgimento de determinantes de resistência previamente desconhecidos em patógenos bacterianos. Muitos dos antimicrobianos são produzidos por micro-organismos ambientais, o que leva a crer que os genes de resistência aos antimicrobianos também devem ter surgido em habitats não clínicos (Martínez, 2008). A hipótese é que esses micro-organismos produtores de antimicrobianos desempenham um papel ecológico primário para a inibição do crescimento de micro-organismos concorrentes (Waksman et al., 1940).

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- Dentre os isolados de *A. baumannii*, cinco foram classificados como MDR e nenhum foi classificado com XDR ou PDR.
- Foram detectadas altas CIMs para os antimicrobianos β -lactâmicos, principalmente para as cefalosporinas de espectro estendido.
- Diferentes genes codificadores de β -lactamases foram encontrados nos diferentes gêneros bacterianos alvo do presente estudo, como *bla*_{SHV}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-1-like}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{CTX-M-Gp1}, *bla*_{CTX-M-Gp9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} e *bla*_{NDM}, sendo que, a maior prevalência foi do *bla*_{SHV} (46%).
- Os isolados de *A. baumannii* e complexo *B. cepacia* apresentaram maior prevalência do gene *bla*_{SHV}.
- Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram maior prevalência do gene *bla*_{GES}.
- Os isolados de *S. maltophilia* apresentaram maior prevalência do gene *bla*_{OXA-1-like}.
- Este é o primeiro relato no mundo de bactérias isoladas do solo portadoras dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{PER}.
- Este é o primeiro relato no Brasil e o segundo no mundo de uma bactéria isolada do solo portadora do gene *bla*_{NDM-1}.
- Não foram detectadas possíveis mutações não descritas nos genes codificadores de β -lactamases encontrados através do sequenciamento.
- O grande número de genes codificadores de β -lactamases encontrados indica uma grande disseminação desses genes em bactérias isoladas do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott IJ & Peleg AY. 2015. *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and nonmelioid *Burkholderia* species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. *Semin Respir. Crit Care Med.* 36(1):99-110.
- Al-Agamy MH, Khalaf NG, Tawfick MM, Shibli AM, Kholyd AE. 2014. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. *Int J Infect Dis.* 22:49-54.
- Amber RP. 1980. The structure of Beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 16;289(1036):321-331.
- Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. 2014. Class D β -lactamases: are they all carbapenemases?. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(4):2119-2125.
- ANVISA, 2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes. Nota Técnica Nº 01/2013.
- ANVISAa, 2007. Investigação e controle de bactérias multirresistentes. Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (Gipea). Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES).
- ANVISAb, 2007. Antimicrobianos - Principais grupos disponíveis para uso clínico: β -lactâmicos. Bases teóricas e uso clínico.
- Avison MB, Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM, Walsh RT. 2000. A TEM-2 β -lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 46(6):879-884.
- Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, Centrón D, Piñeiro SA. 2004. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(2):666-669.
- Batista BG. 2015. New cephalosporin as an alternative for treatment of infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, Santa Cruz do Sul.* 5(2):94-99.

- Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Roller C. 1999. Discrimination of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* genomovars I, III, and IV by PCR. J Clin Microbiol. 37:1335–1339.
- Ben Said L, Jouini A, Alonso CA, Klibi N, Dziri R, Boudabous A, Ben Slama K, Torres C. 2016. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and pAmpC Beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* of water samples in Tunisia. Sci Total Environ. 550:103-1139.
- Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissioir B, Nordmann P, Glupczynski Y. 2010. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. Antimicrob Agents Chemother. 54(11):4872-4878.
- Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. 2011. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 55:349–354.
- Brooke JS. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. American Society for microbiology. Clin MicrobiolRev. 25(1):2-41.
- Bush K. 1988. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. Clin Microbiol Rev. 1(1): 109–123.
- Bush K & Jacoby GA. 2010. Updated Functional Classification of Beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54(3):969-976.
- Bush K. 2010. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. Crit care. 14(3):224.
- Campana EH, Montezzi LF, Paschoal RP, Picão RC. 2016. NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. Int J Antimicrob Agents. 49(1):119-121.
- Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. 2004. Emergence of the Extended-Spectrum β -Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* Strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 48(6): 2344–2345.
- Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. 2006. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) Beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J Antimicrob Chemother. 57(5):975-978.

Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, Sandalli C. 2014. OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. Clin Microbiol Infect. 20(5):410-425.

Chawla K, Vishwanath S, Munim FC. 2013. Nonfermenting Gram-negative Bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Causing Respiratory Tract Infections in a Tertiary Care Center. J Glob Infect Dis. 5(4):144–148.

Chihi H, Bonnin RA, Bourouis A, Mahrouki S, Besbes S, Moussa MB, Belhadj O, Naas T. 2016. GES-11-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Tunisian hospitals: Long-term dissemination of GES-type carbapenemases in North Africa. J Glob Antimicrob Resist. 5:47-50

Christopher D & Crum-Cianflone NF. 2011. Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Clin Med Rev Ther. 10(3):a2466.

Clímaco EC, Oliveira ML, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, da Costa Darini AL. 2013. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. Infect Genet Evol. 19:127-133.

CLSI. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard - Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. M. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 65(3):490-495.

De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JE, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Kidd TJ, Kaestli M, Ginther JL, Wagner DM, Keim P, Bell SC, Jacobs JA, Currie BJ, Vandamme P. 2015. *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel Burkholderia cepacia complex species from environmental and human sources. Int J Syst Evol Microbiol. 65(7):2265-2271.

Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. Biomed Res Int. 2014:249856.

Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. 2002. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of

aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 46(3):638-645.

Eisen JA. 1995. The RecA protein as a model molecule for systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. J Mol Evol. 41:1105–1123.

Ellington MJ, Kistler J, Livemore DM, Woodford N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired Metallo- β -lactamases. J Antimicrob Chemother. 59(2):321-322.

Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 2012. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clin Microbiol Infect. 18(7):646-55.

Ferreria LL. 2005. Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa*. Programa de Pós-Graduação em vigilância sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz.

Furlan JPR & Stehling EG. 2017. Presence of β -Lactamases Encoding Genes in Soil Samples from Different Origins. Water Air Soil Pollut. 228:125.

Furlan JPR, Stehling EG, Pitondo-Silva A. 2017. Importance of Sequencing To Determine Functional *bla*TEM Variants. Antimicrob Agents Chemother. 61(5):pii:e00237-17.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. J Antimicrob Chemother. 52(4):699-702.

Gellatly SL & Hancock RE. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 67(3):159-73.

Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, Nordmann P. 2001. Molecular epidemiology of the integron located VEB-1 extended-spectrum betalactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. J Clin Microbiol. 39(1):175-182.

Giulliani F, Docquier JD, Riccio ML, Pagani L, Rossolini GM. 2005. OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a *bla*VIM-1-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 49(5):1973-1980.

Goli HR, Nahaei MR, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Samadi Kafil H, Aghazadeh M. 2016. Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals, Iran. Iran J Microbiol. 8(1):62-69.

Gonçalves DCPS, Lima ABM, Leão LSNO, Filho JRC, Pimenta FC, Vieira JDG. 2009. Detecção de Metallo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Goiânia, Estado de Goiás. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 42(4):411-414.

Hashem H, Hanora A, Abdalla S, Shawky A, Saad A. 2016. Carbapenem Susceptibility and Multidrug-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Egypt. Jundishapur J Microbiol. 9(11):e30257.

Heritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. 2005. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. J. Antimicrob. Chemother. 55:115-118.

Holden MT, Seth-Smith HM, Crossman LC, Sebahia M, Bentley SD, Cerdeño-Tárraga AM, Thomson NR, Bason N, Quail MA, Sharp S, Cherevach I, Churcher C, Goodhead I, Hauser H, Holroyd N, Mungall K, Scott P, Walker D, White B, Rose H, Iversen P, Mil-Homens D, Rocha EP, Fialho AM, Baldwin A, Dowson C, Barrell BG, Govan JR, Vandamme P, Hart CA, Mahenthiralingam E, Parkhill J. 2009. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. J Bacteriol. 191(1):261-277.

Huang ZM, Mao PH, Chen Y, Wu L, Wu J. 2004. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 25(5):425-427.

Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF. 2006. Evaluation of 23S RNA PCR Primers for use Phylogenetic Studies of Bacterial Diversity. Appl Environ Microbiol. 72(3):2221-2225.

Jacoby G & Bush K. 2016. The curious case of TEM-116. Antimicrob Agents Chemother, 60:7000.

Jamali F, Boroumand MA, Yazdani F, Anvari MS, Pourgholi L, Mahfouzi S, Khak M. 2011. Minimal Inhibitory Concentration of Ceftazidime and Co-trimoxazole for *Stenotrophomonas maltophilia* using E-test. J Glob Infect Dis. 3(3): 254–258.

Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. 2006. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 50(9):2990-2995.

Junior MAS, Ferreira ES, Conceição GC. 2004. Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. Universidade Católica de Salvador. Laboratório de Análises Clínicas da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador. Hospital Universitário Professor Edgard Santos.

Karlin S, Weinstock GM, Brendel V. 1995. Bacterial classifications derived from RecA protein sequence comparisons. *J Bacteriol.* 177:6881–6893.

Katvoravutthichai C, Boonbumrung K, Tiya-wisut-sri R. Prevalence of β -lactamase classes A, C, and D among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary-level hospital in Bangkok, Thailand. *Genet Mol Res.* 23;15(3).

Keith KE, Oyston PC, Crossett B, Fairweather NF, Titball RW, Walsh TR, Brown KA. Functional characterization of OXA-57, a class D beta-lactamase from *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(4):1639-1641.

Kurlandsky LE & Fader RC. 2000. In vitro activity of minocycline against respiratory pathogens from patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology.* 29:210-212.

Labuschagne Cde J, Weldhagen GF, Ehlers MM, Dove MG. 2008. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents.* 31(6):527-30.

Lavigne JP, Gaillard J-B, Bourg G, Tichit C, Lecaillon E, Sotto A. 2008. Extended-spectrum β -lactamases-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains: CTX-M enzymes detection and virulence study. *Biol.* 56:447–453.

Leitão JH, Sousa SA, Cunha MV, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Barreto MC, Sá-Correia I. 2008. Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese treatment center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27(11):1101-1111.

Liu W, Zou D, Wang X, Li X, Zhu L, Yin Z, Yang Z, Wei X, Han L, Wang Y, Shao C, Wang S, He X, Liu D, Liu F, Wang J, Huang L, Yuan J. 2012. Proteomic analysis of clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia* with *bla*NDM-1, *bla*L1 and *bla*L2 β -lactamase genes under imipenem treatment. *J Proteome Res.* 3;11(8):4024-4033.

- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18(3):268-281.
- Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, Vandamme P. 2000. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol.* 38(9):3165-73.
- Malini A, Deepa EK, Gokul BN, Prasad SR. 2009. Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Infections in a Tertiary Care Hospital in Kolar, Karnataka. *J Lab Physicians.* 1(2):62–66.
- Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B, Otlu B, Bulut ME. 2017. VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. *Microb Drug Resist.* 23(3):328-33
- Maravić A, Skočibušić M, Fredotović Z, Cvjetan S, Šamanića I, Puizina J. 2014. Characterization of Environmental CTX-M-15-Producing *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(10):6333-6334.
- Martínez JL. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science.* 18;321(5887):365-367.
- Martins, MA. 2006. Microbiologia do Solo. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Laboratórios de Solos.
- Martins VV, Pitondo-Silva A, Manço LM, Falcão JP, Freitas SS, Silveira WD, Stehling EG. 2013. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS.* 122(2):92-100.
- McConnell MJ, Actis L, Pachón J. 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev.* 37(2):130-155.
- McGowan JE Jr. 2006. Resistance in Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multidrug Resistance to the Maximum. *Am J Med.* 119(6 Suppl 1):S29-36.

- Medeiros M, Lincopan N. 2013. Oxacillinase (OXA) - producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 49(6):391-405.
- Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S. 2007. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol*. 45(2):544-547.
- Michalopoulos A, Falagas ME. 2010. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Expert Opin Pharmacother*. 11(5):779-88.
- Mukherjee K, Tribedi P, Chowdhury A, Ray T, Joardar A, Giri S, SIL AK. 2011. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. *Biodegradation*. 22:377-388.
- Moore NM & Flaws ML. 2011. Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Lab Sci*. 24:47-51.
- Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. 2009. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(8):3579-3581.
- Naas T, Namdari F, Réglie-Poupet H, Poyart C, Nordmann P. 2007. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother*. 60(5):1174-1176.
- Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. 1999. An SHV-derived extended-spectrum B-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 43(5):1281-1284.
- Naiemi NA, Duim B, Savelkoul PH, Spanjaard L, de Jonge E, Bart A, Vandenbroucke-Grauls CM, de Jong MD. 2005. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol*. 43(9):4862-4864.
- Naiemi N, Duim B, Bart A. 2006. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol*. 55:1607-1608.

Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. J Clin Microbiol. 42(9):3978-3984.

Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolás MF, Vasconcelos AT, Oliveira V, Gales AC. 2015. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 59(9):5159-5164.

Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. 1993. Characterization of a novel extended-spectrum Beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 37(5):962-969.

Nzula S, Vandamme P, Govan JR. 2002. Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. J Antimicrob Chemother. 50(2):265-269.

Oermann CM, McCoy KS, Retsch-Bogart GZ, Gibson RL, McKevitt M, Montgomery AB. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic susceptibility during long-term use of aztreonam for inhalation solution (AZLI). J Antimicrob Chemother. 66(10):2398-2404.

Oliveira MS. 2007. Tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenem. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Doenças infecciosas e parasitárias.

Peeters C, Zlosnik JE, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Vandamme P. 2013. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. Syst Appl Microbiol 36(7):483-9.

Pegues DA. 2014. *Burkholderia cepacia* complex. Hospital Epidemiologist. Division of Infectious Diseases. Los Angeles. p. 37-121.

Peirano G, Ahmed-Bentley J, Woodford N, Pitout JD. 2011. New Delhi Metallo-beta-lactamase from traveler returning to Canada Emerging Infectious Diseases. 17:240-242.

Pellegrino FLPC, Netto-dos Santos KR, Riley LW, Moreira BM. 2006. *bla*GES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Infect Dis. 10(4):251-253.

Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. 2007. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(10): 3471–3484.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML. 1999. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 33:283–297.

Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. 2009. Further Identification of CTX-M-2 Extended-Spectrum β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(5):2225:2226.

Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. 2009. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* (9):3908-3913.

Pitondo-Silva A, Deveschio BB, Moretto JA, Stehling EG. 2016. High prevalence of blaVIM-1 gene in bacteria from Brazilian soil. *Can J Microbiol.* 62(10):820-826.

Pitondo-Silva A, Martins VV, Stehling EG. 2015. First report of the blaVIM gene in environmental isolates of *Buttiauxella* sp. *APMSI.* 62(10)-820-826.

Pitout JD, Gregson D, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 43(7):3129-3135.

Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:622–632.

Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. 2001. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(9): 2598–2603.

Poirel L, Docquier JD, De Luca F, Verlinde A, Ide L, Rossolini GM, Nordmann P. 2010. BEL-2, an extended-spectrum Beta-lactamase with increased activity toward expanded-spectrum cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(1):533-535.

Poirel L, Walsh TR, Culliver V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 70:119-123.

Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira, MG, Rubio FG, Nogueira ML, de Almeida MTG, Nogueira MCL. 2012. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla*(CTX-M-2), *bla*(GES-1) and *bla*(GES-5), *bla*(IMP-1) and *bla*(SPM-1) causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *Bmc Infectious Diseases*. London: Biomed Central Ltd. 12:8.

Potron A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L. 2011. Genetic Features of CTX-M-15-Producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(12):5946–5948.

Prince A, Wood MS, Cacalano GS, Chin NX. 1988. Isolation and characterization of a penicillinase from *Pseudomonas cepacia* 249. *Antimicrob Agents Chemother*. 32(6):838-843.

Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, Bush K. 2000. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 44(11):3035-3039.

Retsch-Bogart GZ, Quittner AL, Gibson RL, Oermann CM, McCoy KS, Montgomery AB, Cooper PJ. 2009. Efficacy and safety of inhaled aztreonam lysine for airway pseudomonas in cystic fibrosis. *Chest*. 135(5):1223-1232.

Rhodes KA & Schweizer HP. 2016. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resist. Updat*. 28:82-90.

Rizek C, Fu L, Dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF. 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2(13):43.

Rogrigues LS, Gioia TSR, Rossi F. 2011. *Stenotrophomonas maltophilia*: resistência emergente ao SMX-TMP em isolados brasileiros. Uma realidade? *Bras Patol Med Lab*. 47(5):511-517.

Siemann S, Brewer D, Clark AJ, Dmitrienko GI, Lajoie G, Viswanatha T. 2002. IMP-1 metallo- β -lactamases: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*. 1571(3):190-200.

Silveira APD & Freitas SS. 2007. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Instituto Agrônomo de Campinas, IAC, SP.

Shakil S, Khan AU. 2010. Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from urine from an Indian hospital. J Chemother. 22(5):324-327.

Sousa SA, Ramos CG, Leitão JH. 2011. *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. Int J Microbiol. 2011:pi:607575.

Spangler SK, Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. 1996. Susceptibilities of non-*Pseudomonas aeruginosa* gram-negative nonfermentative rods to ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, D-ofloxacin, sparfloxacin, ceftazidime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, and imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. 40:772-775.

Steffen GP, Steffen RB, Antonioli ZI. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. Departamento de Solos, Centro de Ciência Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Suárez C & Gudíol F. 2009. Beta-lactam antibiotics. Enferm Infecc Microbiol Clin. 27(2):116-129.

Tatman-Otkun M, Gürçan S, Ozer B, Aydoslu B, Bukavaz S. 2005. The antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates using three different methods and their genetic relatedness. BMC Microbiol. 5:24

Tavares W. 2009. Antimicrobianos e quimioterápicos para o clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora Ltda.

Trépanier S, Prince A, Huletsky A. 1997. Characterization of the PenA and PenR genes of *Burkholderia cepacia* 249 which encode the chromosomal class A penicillinase and its LysR-type transcriptional regulator. Antimicrob Agents Chemother. 41:2399-2405.

Tribuddharat C, Moore RA, Baker P, Woods DE. 2003. *Burkholderia pseudomallei* class A Beta-lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. Antimicrob Agents Chemother. 47(7):2082-2087.

Uehlinger S, Schwager S, Bernier SP, Riedel K, Nguyen DT, Sokol PA, Eberl L. 2009. Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains by using multiple infection hosts. *Infect Immun*. 77(9):4102-4110.

Villegas MV, Hartstein AI. 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 24(4):284-295.

Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM. 1994. Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta* 1218:199-201

Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM. 1997. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 41:1460-1464.

Waksman SA & Woodruff HB. 1940. The Soil as a Source of Microorganisms Antagonistic to Disease-Producing Bacteria. *J Bacteriol*. 40(4):581-600.

Wang B & Sun D. 2015. Detection of NDM-1 carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter junii* in environmental samples from livestock farms. *J Antimicrob Chemother*. 70(2):611-613.

Wilson SJ, Knipe CJ, Zieger MJ, Gabehart KM, Goodman JE, Volk HM, Sood R. 2004. Direct costs of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. *Am J Infect Control*. 32(6):342-344.

Weldhagen GF, Prinsloo A. 2004. Molecular detection of GES-2 extended spectrum Beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *Int J Antimicrob Agents*. 24(1):35-38.

Wong YP, Chua KH, Thong KL. 2014. One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection. *J Microbiol Methods*. 107:133-137.

Xavier DE. 2006. Avaliação da expressão de sistemas de efluxo para a resistência antimicrobiana entre amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Departamento de Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a

carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45(4):1151-1161.

Zago MCB, Viana GF, Ecker ABS, Nishiyama SAB, Zarpellon MN, Dias JCR, Cardoso CL, Tognim MCB. 2016. First report of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil. *J Hosp Infec*. 92(3):298-299.

Zeka AN, Poirel L, Sipahi OR, Bonnin RA, Arda B, Özinel M, Ulusoy S, Bor C, Nordmann P. 2014. GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. 69(4):1145-1146.

Zhang H, Zhang J, Qiao, L. 2013. The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review. *World J Emerg Med*. 4(3):169–174.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Isolados de acordo com gênero/espécie, cultura, origem e estado

Tabela 10 - Isolados de acordo com gênero/espécie, cultura, origem e estado

Identificação	Isolado	Cultura	Origem	Estado
<i>A. baumannii</i>	S389	Soja	Chapadinha	MA
<i>A. baumannii</i>	S400	Soja	Chapadinha	MA
<i>A. baumannii</i>	S401	Mamão	Manaus	AM
<i>A. baumannii</i>	S402	Área de dessecação (Anterior milho)	Ribeirão Preto	SP
<i>A. baumannii</i>	S447	Cana-de-açúcar	Jardinópolis	SP
<i>A. baumannii</i>	S448	Soja	Jardinópolis	SP
<i>A. baumannii</i>	S449	Cana-de-açúcar	Jardinópolis	SP
<i>A. baumannii</i>	S450	Cana-de-açúcar	Jardinópolis	SP
<i>A. baumannii</i>	S451	Braquiária	Jardinópolis	SP
<i>A. baumannii</i>	S452	Cana-de-açúcar	Jardinópolis	SP
<i>B. lata</i>	S403	Eucalipto	Formosa	GO
<i>B. cenocepacia</i>	S404	Milho	São Francisco de Sales	MG
<i>B. cenocepacia</i>	S405	Soja	Santa Juliana	MG
<i>B. cenocepacia</i>	S406	Café	São José	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S407	Cana-de-açúcar	São Carlos	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S408	Café	Cajuru	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S409	Eucalipto	Altinópolis	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S410	Soja	Centralina	MG
<i>B. cenocepacia</i>	S411	Cana-de-açúcar	Nuporanga	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S412	Milho	Cássia dos Coqueiros	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S413	Algodão	Chapadão do Sul	MS
<i>B. cenocepacia</i>	S414	Sorgo	Ribeirão Preto	SP
<i>B. lata</i>	S415	Soja	Ribeirão Preto	SP
<i>B. cepacia</i>	S416	Milho	Casa Branca	SP
<i>B. cepacia</i>	S417	Milho	Casa Branca	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S418	Cana-de-açúcar	Tambaú	SP
<i>B. cepacia</i>	S419	Milho	Casa Branca	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S420	Pastagem	Edeia	GO
<i>B. ambifaria</i>	S421	Café	Altinópolis	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S422	Cana-de-açúcar	Tambaú	SP
<i>B. ambifaria</i>	S423	Café	Altinópolis	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S424	Milho	Cássia dos Coqueiros	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S425	Cana-de-açúcar	São Carlos	SP
<i>B. cenocepacia</i>	S426	Milho	Casa Branca	SP
<i>P. aeruginosa</i>	S21	Milho	Ribeirão Preto	SP
<i>P. aeruginosa</i>	S28	Milho	Ribeirão Preto	SP
<i>P. aeruginosa</i>	S30	Milho	Ribeirão Preto	SP
<i>P. aeruginosa</i>	S43	Pastagem	São Pedro do Boaiçu	MG
<i>P. aeruginosa</i>	S47	Café	Pedregulho	SP
<i>P. aeruginosa</i>	S48	Café	Cajuru	SP
<i>P. aeruginosa</i>	S53	Acerola	Brasília	DF
<i>P. aeruginosa</i>	S54	Beterraba	Manaus	AM
<i>P. aeruginosa</i>	S81	Café	Ribeirão Preto	SP
<i>P. aeruginosa</i>	S106	Eucalipto	Formosa	GO
<i>P. aeruginosa</i>	S142	Braquiária	Porto Velho	RO
<i>P. aeruginosa</i>	S438	Cana-de-açúcar	Guariba	SP
<i>P. aeruginosa</i>	S439	Soja	Paranaíba	PI
<i>S. maltophilia</i>	S427	Café	Tabatinga	SP
<i>S. maltophilia</i>	S428	Milho	Maringá	PR
<i>S. maltophilia</i>	S429	Soja	Maringá	PR

<i>S. maltophilia</i>	S430	Cana-de-açúcar	Tambaú	SP
<i>S. maltophilia</i>	S431	Milho/Soja	Campinas	SP
<i>S. maltophilia</i>	S432	Milho	Campinas	SP
<i>S. maltophilia</i>	S433	Cana-de-açúcar	Frutal	MG
<i>S. maltophilia</i>	S434	Cana-de-açúcar	Tambaú	SP
<i>S. maltophilia</i>	S435	Milho	Casa Branca	SP
<i>S. maltophilia</i>	S436	Laranja lima	Jardinópolis	SP
<i>S. maltophilia</i>	S437	Laranja lima	Jardinópolis	SP
<i>S. maltophilia</i>	S445	Soja	Jardinópolis	SP
<i>S. maltophilia</i>	S446	Cana-de-açúcar	Jardinópolis	SP

Legenda: Amazonas, AM; Distrito Federal, DF; Goiás, GO; Maranhão, MA; Minas Gerais, MG; Mato Grosso do Sul, MS; Piauí, PI; Paraná, PR; Rondônia, RO; São Paulo, SP.